

Toxins and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical SpecimensKeun Sik Baik<sup>1</sup>, Gwang Seo Ki<sup>1,2</sup>, Han Na Choe<sup>1</sup>, Seong Chan Park<sup>1</sup>, Eun Cho Koh<sup>1</sup>, Hyung Rak Kim<sup>1,2</sup> and Chi Nam Seong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Saint Carlo Medical Center, Suncheon 540-718, Korea

Received October 28, 2010 / Accepted November 28, 2010

Seventy five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains and 24 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) were isolated from clinical specimens obtained from a hospital in Suncheon, Jeonnam province, Korea, from July to December, 2009. Antibiotic resistance was determined using the disc diffusion method. Genes encoding enterotoxin (SE), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), exfoliative toxin (ET) and Panton-Valentine leukocidin (PVL) were detected by multiplex PCR-mediated amplification using specific primers. Sixty (80%) MRSA isolates possessed either one or more toxin genes and the most common pattern that coexisted in MRSA was *seb*, *sec*, *seg*, *sei* and *tst* (22.7%) followed by coexistence of *sec*, *seg*, *sei* and *tst* genes (18.7%). Gene *pvl* encoding leukocidin was not found. Significant correlation between the production of *sec*, *seg*, *sei* and *tst* genes was found. MRSAs were resistant to erythromycin (89% of the isolates), gentamicin (70.7%), ciprofloxacin (69.3%), clindamycin (61.3%) and tetracycline (58.7%), while MSSAs were susceptible to the antibiotics with the exception of erythromycin. Toxin genes *seb*, *sec* and *tst* were related to the tetracycline resistance of MRSA.

**Key words** : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antibiotic resistance, enterotoxin, tetracycline resistance

## 서 론

*Staphylococcus aureus*는 원내감염과 접촉감염의 원인이 되는 병원성 세균 중 하나이다[1]. 이 세균은 여러 종류의 세포외 단백질성 독소, 즉, 장독소(enterotoxin; SE), 독성 쇼크 증상 독소 1(toxic shock syndrome toxin-1; TSST-1), 피부박탈성 독소(exfoliative toxin; ET), 백혈구 용해 독소(Panton-Valentine leukocidin; PVL), 용혈 독소(hemolysin) 그리고 응집소(coagulase)를 분비한다[12]. 특히 장독소는 *S. aureus*가 식품 내에서 증식하는 과정 중에 생성되며 1 µg 이하의 양으로도 식중독을 야기시킬 수 있으며 심한 장 연동의 주요인이 된다[3,15]. 장독소는 항원성에 근거를 둔 혈청학적 분석에 의해 5 종류(SEA, SEB, SEC, SED, SEE)가 확인되었다[3]. 이 장독소들은 저분자 펩티드로서 아미노산 조성이 매우 유사하다[24]. 최근에는 새로운 형의 장독소(SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO)들이 보고되었으나 식중독과의 연관성은 정확하지 않다[29]. TSST-1은 발열, 혈압저하, 발적 등을 일으키는 독소이며, PVL은 피부에 종기나 괴저를 유발한다[15,10]. 이러한 독소 양상은 *S. aureus*의 유전형과 연관이 있으며, 각 균주별 특성을 나타내므로 이를 분자생물학적 역학 분석에

사용할 수 있다[5,8,27,31,33].

Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 methicillin이 쓰이기 시작한 이후로 즉시 나타났으며[14], 이 내성은 β-lactamase에 의한 것이 아니고 내인성유전자에 기인한다. MRSA의 내성 기전은 세균이 선천적으로 염색체 내에 *mecA* (methicillin resistant determinant A) 유전자를 획득하여 약제에 친화성이 적은 세포벽합성단백인 PBP (penicillin binding protein) 2a 또는 2'에 의하여 생긴다[4,9]. 또한 methicillin의 내성을 증가시키는 보조 유전자인 *fenA* (factor essential for methicillin resistance A) 유전자는 *mecA*와 협조하여 β-lactam 항균제에 대한 내성을 나타낸다. MRSA는 β-lactam계 외에도 아미노글리코시드(aminoglycoside)와 퀴놀론(quinolone)계 그리고 테트라사이클린(tetracycline) 계의 항생제에도 흔히 내성을 나타낸다[2,19]. 이러한 MRSA의 감염은 유럽에서 처음 발생한 이래 전세계적으로 증가하고 있으며, 원내 감염의 중요한 문제로 대두되어 1960년대 말 국내에서 처음 분리된 이후 점점 증가하여 *S. aureus* 중 MRSA의 비율은 1995년 이후 70% 정도로 일정 비율을 유지하고 있으며 특히 중환자실에서 분리된 균주들에서는 90%에 달하여 세계적으로 가장 높은 수준의 MRSA 비율을 보인다[2,21,30].

본 연구는 2009년 7월부터 2009년 12월까지 순천 한 병원의 환자 검체로부터 분리된 MRSA와 methicillin 감수성 *Staphylococcus aureus* (MSSA) 균주를 대상으로 장독소를 비롯

**\*Corresponding author**

Tel : +82-61-750-3613, Fax : +82-61-750-5469

E-mail : scnu@scnu.ac.kr

하여, 표피박탈성독소, 독성 쇼크 증상 독소 1, leukocidin 유전자들을 분자생물학적 기술인 PCR 기술을 이용하여 검색하였다. 또한 독소 유전자 분포를 통해 이들 균주들 간의 분자생물학적 연관성을 파악하고 독소 유전자와 항생제에 대한 내성과의 관계를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* 분리

2009년 7월부터 12월까지 전남 순천 소재 1개 병원의 내원 및 입원환자로부터 채취한 4가지 검체(혈액, 객담, 농, 소변)로부터 세균을 분리하였다(Table 1). 세균의 분리는 혈액한천(6% 혈액 함유) 배지를 이용하여 37°C에서 16 - 18시간 배양하여 사용하였다. 분리된 세균 중 coagulase 및 catalase 시험[32]에 양성을 나타내는 균주들을 선별하였다. 선별된 균주들을 Vitek 32 GPI kit (BioMerieux, France)를 이용하여 동정하였다. 대조균주로는 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213을 사용하였다. 이 때 동일 환자로부터 반복 분리된 균주는 제외하였다. Methicillin 내성 균주(MRSA)의 판정은 디스크 확산법과 Vitek 2 kit (BioMerieux, France)를 이용한 최소억제 농도(MIC) 판정을 이용하여 실시하였다. 디스크 확산법에서의 판정 기준은 CLSI [7]를 따랐으며, oxacillin (1 µg)에 의한 억제대 직경이 10 mm 이하이면 내성, 13 mm 이상이면 감수성인 균주(MSSA)로 판정하였다. Oxacillin에 대한 MIC 판정기준은 4 µg/ml 이상을 사용하였다. MRSA로 판명된 균주 중 *mecA*가 검출되지 않은 2개 균주를 제외한 75개 균주를 MRSA로 최종 확인하였다. 순수 분리된 세균의 계대 배양은 tryptic soy agar (TSA, Becton Dickinson) 배지를 이용하였다.

#### DNA 추출, *mecA* 및 독소 유전자 분석

TSA 배지에 자란 세균 집락으로부터 Choe 등의 방법[6]을 이용하여 DNA를 추출하였으며 실험에 사용할 때까지 -20°C에 냉동 보관하였다.

*mecA* 및 독소 유전자의 검사는 기존에 알려진 primer (Table 2)을 이용하여 multiplex PCR 조건으로 증폭하였다 [25]. PCR 반응은 PCR thermal cycler TP 600 (TaKaRa, Japan)를 이용하였으며, PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 확인하였다.

증폭된 산물이 기존에 알려진 독소 유전자와 동일한 염기서

열인지 확인하기 위해 염기서열을 분석하였으며 결정된 독소 유전자 염기서열의 유사도는 Genbank (NCBI)에 등록된 기존의 독소 유전자의 염기서열과 비교하였다.

#### 항생제 감수성 검사

분리균의 항생제 감수성 조사는 디스크 확산법을 사용하여 측정하였다. McFarland 0.5관에 맞춘 세균현탁액을 Mueller Hinton II agar (MHA; Becton Dickinson) 배지에 접종한 후 각각의 항생제가 함유된 디스크를 올려놓고 37°C에서 16-18시간 배양한 후 억제대의 직경을 측정하였다. 감수성, 중간내성, 저항성 기준은 CLSI [7] 기준으로 하였으며 매 시험마다 양성 대조 균주로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 사용하였다.

### 결 과

#### *mecA* 및 독소 유전자 분석

독소 유전자와 항생제 내성을 분석하기 위해 사용된 *Staphylococcus aureus*는 혈액, 객담, 소변과 농에서 분리한 99개 균주를 사용하였다. Oxacillin에 대한 내성과 *mecA* 유전자의 보유여부를 이용하여 MRSA와 MSSA 균주를 확인하였다. MRSA는 75개 균주(혈액과 객담, 각각 20균주; 소변, 19균주; 농, 16균주)를 그리고 MSSA는 24개 균주(혈액, 8균주; 객담, 4균주; 소변, 10균주; 농, 2균주)를 사용하였다(Table 1).

*mecA* 및 독소유전자에 특이적인 primer를 사용하여 multiplex PCR 실시한 결과 Fig. 1과 같은 DNA 절편을 확인할 수 있었다. 그리고 증폭된 산물의 염기서열은 기존에 알려진 독소 유전자 염기서열과 99.4-100% 일치하였다.

MRSA와 MSSA의 독소 유전자 검출 결과는 Table 3에 나타나 있다. 일반적으로 MRSA 균주들이 MSSA 균주들에 비해 높은 비율로 독소 유전자를 보유하고 있었다.

장독소 중 식중독을 유발한다고 알려진 5개의 독소 유전자 중 *sec*는 MRSA 39개 균주(52%)가 보유하고 있었으며, *setB*와 *setC*는 각각 17개(22.7%)와 1개 균주에서 확인되었으나 *sea*와 *see* 유전자는 검출되지 않았다. 그러나 MSSA에서는 5개 균주(20.8%)가 *sea* 유전자를 보유하고 있었다. 최근에 알려진 장독소 *seg*와 *sei* 유전자는 MRSA에서는 각각 43개(57.3%)와 41개 균주(54.7%), 그리고 MSSA에서는 각각 5개 균주(20.8%)가 확인되었다.

Table 1. Sources of *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Hospital ward /specimens	MRSA					MSSA				
	Blood (n=20)	Sputum (n=20)	Urine (n=19)	Pus (n=16)	Total (n=75)	Blood (n=8)	Sputum (n=4)	Urine (n=10)	Pus (n=2)	Total (n=24)
Outpatient	3	2	13	3	21	7		10	2	19
General ward	10	11	6	9	36	1	4			5
Intensive care unit	7	7		4	18					

Table 2. Nucleotide sequences and anticipated sizes of PCR product for the *Staphylococcus aureus* gene-specific oligonucleotide primers used in this study

Target gene	Primer*	Nucleotide sequence (5'→3')	GenBank accession no.	Product length (bp)	Multiplex PCR set	Reference	
Methicillin resistant determinant A	<i>mecA</i> -F	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	Y00688	162	A	28	
	<i>mecA</i> -R	CCACTTCATATCTTGTAACG					
Toxic shock syndrome toxin-1	<i>tst</i> -F	GCTTGGGACAACCTGCTACAG	J02615	559	C	26	
	<i>tst</i> -R	TGGATCCGTCATTTCATTGTTAT					
Panton-Valentine leukocidin	<i>pvl</i> -F	ATCATTAGGTAAAAATGCTGGACATGATCC	X72700	433	C	22	
	<i>pvl</i> -R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC					
Staphylococcal enterotoxins	<i>sea</i> -F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	M18970	521	A	26	
	<i>sea</i> -R	GTTCTGTAGAAGTATGAAAACACG					
	<i>seb</i> -F	ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG	M11118	667	B	23	
	<i>seb</i> -R	TGCAGGCATCATGTCATACCA					
	<i>sec</i> -F	CTTGATGTATGGAGGAATAACAA	X05815	284	A	26	
	<i>sec</i> -R	TGCAGGCATCATATCATACCA					
	<i>sed</i> -F	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC	M28521	385	A	26	
	<i>sed</i> -R	ATATGAAGGTGCTCTGTGG					
	Staphylococcal enterotoxins	<i>see</i> -F	TACCAATTAACCTTGTTGGATAGAC	M21319	171	B	26
		<i>see</i> -R	CTCTTGCACCTTACCGC				
		<i>seg</i> -F	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	AF064773	328	B	26
		<i>seg</i> -R	CCAAGTGATTGTCTATTGTCCG				
		<i>seh</i> -F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	U11702	360	C	26
		<i>seh</i> -R	GTCGAATGAGTAATCTCTAGG				
		<i>sei</i> -F	CAACTCGAATTTTCAACAGGTACC	AF064774	466	B	26
		<i>sei</i> -R	CAGGCAGTCCATCTCCTG				
<i>sej</i> -F		CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG	AF053140	142	C	26	
<i>sej</i> -R		CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC					
Exfoliative toxins	<i>eta</i> -F	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	M17347	93	A	20	
	<i>eta</i> -R	AGATGTCCCTATTTTGCTG					
	<i>etb</i> -F	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG	M17348	226	C	13	
	<i>etb</i> -R	GTTTTGGCTGCTTCTCTTG					

\*Abbreviation: F, forward; R, reverse

Table 3. *mecA* and toxin genes detected in *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Toxin gene	Primer*	MRSA					MSSA				
		Blood (n=20)	Sputum (n=20)	Urine (n=19)	Pus (n=16)	Total (n=75)	Blood (n=8)	Sputum (n=4)	Urine (n=10)	Pus (n=2)	Total (n=24)
Methicillin resistant determinant A	<i>mecA</i>	20	20	19	16	75					
Toxic shock syndrome toxin-1	<i>tst</i>	4	17	4	10	35	2	2	1		5
Panton-Valentine leukocidin	<i>pvl</i>						1		2		3
	<i>sea</i>						2	2	2		5
Staphylococcal enterotoxin	<i>seb</i>	3	14			17					
	<i>sec</i>	10	16	3	10	39					
	<i>sed</i>			1		1					
	<i>seg</i>	9	17	6	11	43	3	2			5
	<i>seh</i>			1	1	2		1	4		5
	<i>sei</i>	7	17	6	11	41	3	2			5
	<i>sej</i>	1				1			1		1
Exfoliative toxin	<i>etb</i>			1		1					

\*Genes *see* and *eta* are not detected from all the isolates.

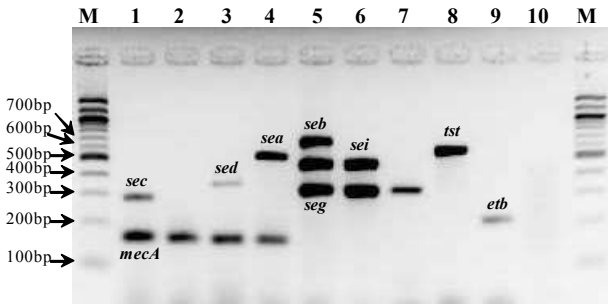


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the multiplex PCR amplification products from 9 *Staphylococcus aureus* strains. Lanes M, 1 kb plus DNA ladder; lanes 1-4, primer set A; lanes 5-7, primer set B; lanes 8-9, primer set C. Lane 1, strain S5 (*mecA* and *sea*); lane 2, strain U8 (*mecA*); lane 3, strain U6 (*mecA* and *sea*); lane 4, strain B15 (*mecA* and *sea*); lane 5, strain S13 (*seb*, *sei* and *seg*); lane 6, strain U10 (*sei* and *seg*); lane 7, strain B6 (*seg*); lane 8, strain S1 (*tst*); lane 9, strain U5 (*etb*); lane 10, negative control (distilled water).

피부 박탈성독소b 유전자(*etb*)는 MRSA 중 1개 균주가 보유하고 있었다. 독성 쇼크 증상 독소 1 유전자(*tst*)를 보유한 균주의 비율은 MRSA는 35개(46.7%) 그리고 MSSA는 5개 균주(20.8%)였다. Leukocidin 독소 유전자인 *pvl*은 MRSA에서는 검출되지 않은 반면 MSSA 3개 균주(12.5%)가 보유하고 있었다. 한편 객담과 농으로부터 분리된 MRSA 균주가 혈액과 소변으로부터 분리된 MRSA에 비해 독소유전자 보유 빈도가 높음을 알 수 있었다. 특히 *sec*, *seg*, *seh*와 *tst* 유전자는 객담과 농으로부터 분리된 MRSA의 보유율이 62.5-85%로 혈액과 소변으로부터 분리된 MRSA의 보유율 15.8-50%에 비해 월등히 높았다.

MRSA 중 44개 균주가 2개 이상의 독소 유전자를 보유하고 있었다(Table 4). 특히 17개 균주(객담 분리 균주, 14; 혈액 분리

균주, 3)는 *seb*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst*를 동시에 보유하고 있었으며 14개 균주(객담 분리 균주, 2; 소변 분리 균주, 3; 농 분리 균주, 8; 혈액 분리 균주, 1)는 *sec*, *seg*, *sei*와 *tst*를 동시에 보유하고 있었다.

MSSA 균주에서도 여러 개의 독소 유전자를 동시에 보유한 균주가 발견되었다. 특히 4개 균주가 *sea*, *sei*, *seg*와 *tst*를 동시에, 1개 균주가 *sea*, *seh*, *pvl*와 *tst*를 동시에 보유하고 있었다(자료 생략).

MRSA균주들의 각 독소유전자 간의 동시보유율은 Table 5와 같다. *sec*, *seg*, *sei*와 *tst*유전자들 사이의 동시보유율은 79.1(*seg* 보유균주가 *tst*를 동시에 보유한 비율)-100.0% (*sei* 보유균주가 *seg*를 동시에 보유한 비율)에 달했다. 그러나 *seb*를 보유한 균주들은 모두 *sec*, *seg*, *sei*와 *tst*유전자들을 보유하지만 그 반대의 경우는 32.6-40.0%에 그쳤다.

항생제 감수성

MRSA와 MSSA의 항생제에 대한 내성균주 수는 Table 6에 나타나 있다. Quinolone계열의 ciprofloxacin에 대해서는 69.3%의 균주가 내성을 보였으며, amikacin, gentamicin 등 aminoglycoside 계열의 항생제에 대한 내성 균주 비율은 각각 29.3%와 70.7%로 나타났다. 또한 erythromycin, clindamycin과 tetracycline에 대해서도 각각 89.3%, 61.3% 그리고 58.7%의 균주가 내성을 나타냈다. 반면, linezolid, nitrofloxacine, teicoplanin과 vancomycin에 대한 내성은 거의 없었다. MSSA의 경우 erythromycin에 대한 내성 균주가 41.6%를 차지한 것 외에 대부분의 항생제에 대한 내성은 낮았다.

MRSA 균주들의 독소유전자 보유와 항생제에 대한 내성율은 Table 7과 같다. *seb* 유전자 보유 균주들은 ciprofloxacin, gentamicin과 tetracycline에 대한 내성율이 90% 이상이었으며, *sec* 유전자 보유 균주들은 tetracycline에 대한 내성율이

Table 4. Combination of toxin genes detected in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Toxin genes	Blood (n=20)	Sputum (n=20)	Urine (n=19)	Pus (n=16)	Total (n=75)
<i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>tst</i>	3	14			17 (22.7)
<i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>tst</i>	1	2	3	8	14 (18.7)
<i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i>	1			1	2 (2.7)
<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>tst</i>		1		2	3 (4.0)
<i>seg</i> , <i>sei</i>	2		3		5 (6.7)
<i>sec</i> , <i>seg</i>	2				2 (2.7)
<i>sec</i> , <i>seh</i>				1	1 (1.3)
<i>etb</i>			1		1 (1.3)
<i>sec</i>	3				3 (4.0)
<i>sed</i>			1		1 (1.3)
<i>seh</i>			1		1 (1.3)
<i>sej</i>	1				1 (1.3)
<i>tst</i>			1		1 (1.3)
None	7	3	9	4	23 (30.7)

\*The numerals in the parentheses are percentage.

Table 5. Coexistence of toxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Toxin genes	<i>tst</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>
<i>tst</i>	-	14/14(1.000) <sup>a</sup>	31/39(0.795)	34/43(0.791)	34/41(0.829)
<i>seb</i>	14/35(0.400) <sup>b</sup>	-	14/39(0.359)	14/43(0.326)	14/41(0.342)
<i>sec</i>	31/35(0.886)	14/14(1.000)	-	35/43(0.814)	33/41(0.805)
<i>seg</i>	34/35(0.971)	14/14(1.000)	35/39(0.897)	-	41/41(1.000)
<i>sei</i>	34/35(0.971)	14/14(1.000)	33/39(0.846)	41/43(0.953)	-

<sup>a</sup>The rate of existence of a gene of row (*tst*) in the strains harboring a gene of column (*seb*).

<sup>b</sup>The rate of existence of a gene of column (*seb*) in the strains harboring a gene of row (*tst*).

Table 6. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Antibiotics	MRSA					MSSA				
	Blood (n=20)	Sputum (n=20)	Urine (n=19)	Pus (n=16)	Total (n=75)	Blood (n=8)	Sputum (n=4)	Urine (n=10)	Pus (n=2)	Total (n=24)
Amikacin	14	6	2		22					
Ciprofloxacin	11	19	11	11	52			2		2
Clindamycin	14	16	5	11	46					
Erythromycin	13	20	18	16	67	4	2	4		10
Gentamicin	14	17	12	10	53	2		3		5
Linezolid								1		1
Nitrofurantoin	1				1					
Rifampin	4	7	1	2	14					
Tetracycline	10	17	7	10	44	2	1	1		4
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	2	2	7	1	12			1		1

\*All the isolates are sensitive to teicoplanin and vancomycin. Number of resistant strains is expressed.

Table 7. Corelationship between toxin genes and antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Toxin genes/ Antibiotics	Ciprofloxacin	Clindamycin	Erythromycin	Gentamicin	Tetracycline
Total (n=75)	69.3	61.3	89.3	70.7	58.7
Individual type					
<i>seb</i> (n=17)	94.1	70.6	94.1	94.1	100.0
<i>sec</i> (n=39)	87.2	82.9	87.2	79.5	94.9
<i>seg</i> (n=39)	82.1	82.9	86.0	67.4	81.4
<i>sei</i> (n=41)	78.0	77.1	87.8	68.3	80.5
<i>tst</i> (n=35)	85.7	62.9	94.3	74.3	91.4
Coexisting type					
<i>seb, sec, seg, sei, tst</i> (n=17)	94.1	70.6	94.1	94.1	100.0
<i>sec, seg, sei, tst</i> (n=14)	92.9	71.4	92.9	71.4	92.9
None (n=23)	65.2	52.2	95.7	78.3	13.0

90% 이상, *tst* 유전자 보유 균주들은 tetracycline 에 대한 내성율이 90% 이상이였다. 5개의 독소유전자(*seb, sec, seg, sei, tst*)와 4개의 독소유전자(*sec, seg, sei, tst*)를 동시에 보유한 MRSA 균주들은 ciprofloxacin과 tetracycline에 대한 내성율이 90% 이상이였다.

## 고 찰

순천 소재 1개 병원의 미생물검사실에서 각기 다른 환자들의 검체로부터 분리된 MRSA 75 개 균주와 MSSA 24개 균주의

독소유전자 분포와 항생제에 대한 내성의 빈도를 분석하였다.

일반적으로 MRSA 균주들이 MSSA 균주들에 비해 장독소와 독성 쇼크 증상 독소 1 유전자를 높은 비율로 보유하고 있었다. Leukocidin 유전자(*pvf*)는 MRSA 균주들에서는 검출되지 않았고 피부과 외래환자의 혈액과 소변에서 분리된 MSSA 3개 균주에서만 검출되었다. 이 독소는 원내 감염보다는 주로 피부 감염이나 지역감염 환자로부터 분리된 *S. aureus*에서 발견된다는 보고와 일치한 결과이다[10].

장독소 유전자 중 *sea*는 검출되지 않았으며 *seb*는 MRSA 17개 균주(22.7%)에서 검출되었으며, *sec*는 39개 균주(52%)에

서 검출되었다. 이와 같은 결과는 한국의 다른 병원에서 분리한 MRSA의 독소 유전자 보유율과 비교[18] 할 경우 *sea* 보유율은 낮고, *setA*와 *setB* 보유율은 다소 높은 결과이었다. 한편 MRSA 균주의 독성 쇼크 증상 독소 1 유전자(*tst*)의 보유율 46.7%는 Kim 등[18]의 결과와 유사한 값이었다.

2개 이상의 독소유전자를 보유한 MRSA 균주는 44개였다. 다른 보고에서도 대부분의 MRSA 균주가 2-4개의 독소유전자를 동시에 보유하고 있다는 것과 일치한다[15,18]. 특히, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자는 31개 균주(41.3%)가 동시에 보유하고 있었고, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자는 3개 균주가 동시에 보유하였다. *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자의 동시보유율은 79.1-82.9%로서 4개의 유전자간의 상관성이 비교적 높게 나타났다(Table 5). 많은 연구들에서 *S. aureus*가 *tst*와 *sec* 유전자를 동시에 보유한다는 것은 이미 알려져 있었으나[11,17,34], 이번 연구를 통해 *tst*가 *sec* 외에도 *seg*와 *sei* 유전자와 동시에 검출됨을 확인할 수 있었다[16]. 이는 유방암에 걸린 소의 원유로부터 분리한 *S. aureus*에서 나타난 *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자간의 동시 보유(57.8%) 현상과 유사한 결과이다[16]. 검체 제공자의 거주 및 생활 환경에 대한 분석과 병원 소재 인근 지역의 가축으로부터 분리된 MRSA의 독소 유전자형의 분석이 이루어질 경우 위의 4가지 독소 유전자의 동시보유현상의 원인과 경로를 해석할 수 있을 것이라 사료된다.

MRSA의 항생제 내성 비율은  $\beta$ -lactam계, quinolone계, amikacin을 제외한 aminoglycoside계, 그리고 tetracycline에 대해 높은 내성율을 나타냈다. 이와 같은 현상은 다른 연구 결과들과 일치한다고 볼 수 있다[2].

특정 독소유전자의 보유가 특정 항생제에 대한 내성과의 연관성을 분석한 결과 MRSA 균주들에서는 *tst* 유전자를 보유한 41개 균주 중 38개 균주(92.7%)가, *sec* 유전자를 보유한 39개 균주 중 37개 균주(94.9%)와 *seb* 유전자를 보유한 17개 균주(100%) 모두가 tetracycline에 대해 내성을 가지고 있었다. 전체 MRSA 균주들의 58.7%가 이 항생제에 내성을 보인 것과 비교해 볼 때 *tst*, *sec*와 *seb* 유전자 보유가 tetracycline에 대한 내성과 밀접한 연관을 지닐 수 있다는 것을 확인하였다.

본 연구 결과 MRSA의 독소 유전자의 분포 양상을 확인할 수 있었으며 특히 *sec*, *seg*, *sei* 및 *tst* 유전자간의 동시 발현의 연관성을 확인하였고, tetracycline에 대한 내성이 *sec*과 *tst* 유전자와의 연관성이 높음을 확인하였다. 따라서 *sec*과 *tst* 독소 유전자들의 수평적 이동 등의 추적이 MRSA 확산 방지에 필요할 것이라고 사료된다.

References

1. Ahn, J. Y., W. B. Kim, D. W. Lee, K. Lee, S. H. Choi, I. S. Kim, and C. H. Seo. 1999. A study of the *mecI*, *mecA* and *femA* genes of methicillin-resistant Staphylococci. *Korean J. Clin. Pathol.* **19**, 62-69.

2. Akcam, F. Z., G. B. Tinaz, O. Kaya, A. Tigli, E. Ture, and S. Hosoglu. 2009. Evaluation of methicillin resistance by ceftoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. *Microbiol. Res.* **164**, 400-403.

3. Bergdoll, M. S. 1983. Enterotoxins, pp. 559-598, In Easton, C. S. F. and C. Adlam (eds.), *Staphylococci and staphylococcal infections*. Academic Press, London, United Kingdom.

4. Chambers, H. F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 781-791.

5. Chini, V., G. Dimitracopoulos, and I. Spiliopoulou. 2006. Occurrence of the enterotoxin gene cluster and the toxic shock syndrome toxin 1 gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is related to clonal type and *agr* group. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1881-1883.

6. Choe, H. N., C. Park, H. R. Kim, K. S. Baik, S. N. Kim, and C. N. Seong. 2010. Characteristics and antibiotic susceptibility of imipenem-resistant clinical isolates producing carbapenemase. *J. Life Sci.* **20**, 1214-1220.

7. CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th Informational Supplement. CLSI document M100-S19 (ISBN 1-56238-690-5). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

8. Diep, B. A., H. A. Carleton, R. F. Chang, G. F. Sensabaugh, and F. Perdreau-Remington. 2006. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **193**, 1495-1503.

9. Georgopadakou, N. H., S. A. Smith, and D. P. Bonner. 1982. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 172-175.

10. Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne. 1999. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1128-1132.

11. Ho, G., W. H. Campbell, M. S. Bergdoll, and E. Carlson. 1989. Production of a toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* strains associated with sheep, goats, and cows. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1946-1948.

12. Iandolo, J. J. 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 375-402.

13. Jackson, M. P. and J. J. Iandolo. 1986. Sequence of the exfoliative toxin B gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **167**, 726-728.

14. Jevons, M. P. 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* **1**, 124-125.

15. Jung, H. J., J. I. Cho, E. S. Song, J. J. Kim, and K. S. Kim. 2005. PCR detection of virulence genes encoding coagulase and other toxins among clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 207-214.

16. Katsuda, K., E. Hata, H. Kobayashi, M. Kohmoto, K. Kawashima, H. Tsunemitsu, and M. Eguchi. 2005. Molecular

- typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* **105**, 301-305.
17. Kim, J. S., H. S. Kim, W. Song, H. C. Cho, K. M. Lee, and E. C. Kim. 2007. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes. *Korean J. Lab. Med* **27**, 118-123.
  18. Kim, J. S, W. Song, H. S. Kim, H. C. Cho, K. M. Lee, M. S. Choi, and E. C. Kim. 2006. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin gene profiles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**, 289-295.
  19. Kim, Y. J., D. S. Jeon, and J. R. Kim. 2001. Molecular epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *Korean J. Clin. Pathol.* **21**, 122-128.
  20. Lee, C. Y., J. J. Schmidt, A. D. Johnson-Winegar, L. Spero, and J. J. Iandolo. 1987. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3904-3909.
  21. Lee, H. J., Y. S. Kim, J. S. Kim, Y. H. Cho, K. G. Lee, J. T. Suh, and S. H. Cha. 2001. A study of *mecA* and *femA* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens. *Korean J. Clin. Pathol.* **21**, 45-48.
  22. Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1128-1132.
  23. Løoeth, A., S. Loncarevic, and K. G. Berdal. 2004. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3869-3872.
  24. Marrack, P. and J. Kappler. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248**, 705.
  25. Mehrotra, M., G. Wang, and W. M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1032-1035.
  26. Monday, S. R. and G. A. Bohach. 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3411-3414.
  27. Novick, R. P., P. Schlievert, and A. Ruzin. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.* **3**, 585-594.
  28. Oliveira, D. C. and H. De Lencastre. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2155-2161.
  29. Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, and K. Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 857-862.
  30. Park, S. H., Y. H. Jang, H. Sung, M. N. Kim, J. S. Kim, and Y. J. Park. 2009. Performance evaluation of BD geneOhm MRSA PCR assay for detection of nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at endemic intensive care units. *Korean J. Lab. Med* **29**, 439-447.
  31. Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. J. Day. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**, 4987-4996.
  32. Smibert, R. M. and N. R. Krieg. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology, pp. 607-654, In Gebhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (eds.), Washington, DC: American Society for Microbiology.
  33. Tsen, H. Y., G. K. Yu, and H. H. Hu. 1997. Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 485-493.
  34. Zschöck, M., K. Riße, and J. Sommerhäuser. 2004. Occurrence and clonal relatedness of *secYst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 493-498.

초록 : 임상검체로부터 분리된 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*의 독소 및 항생제 내성

백근식<sup>1</sup> · 기광서<sup>1,2</sup> · 최한나<sup>1</sup> · 박성찬<sup>1</sup> · 고은초<sup>1</sup> · 김형락<sup>1,2</sup> · 성치남<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>순천대학교 생물학과, <sup>2</sup>성가롤로병원 진단검사의학과)

2009년 7월부터 12월까지 순천 소재 한 병원에 내원한 환자의 검체로부터 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 75균주와 methicillin 감수성 *S. aureus* (MSSA) 24균주를 분리하였다. 분리균의 항생제 감수성 조사는 디스크 확산법을 사용하여 측정하였다. 분리균의 독소 유전자 보유는 multiplex PCR을 이용하여 장독소 (enterotoxin; SE), 독성 쇼크 증상 독소 1(toxic shock syndrome toxin-1; TSST-1), 피부박탈성 독소(exfoliative toxin; ET) 및 백혈구 용해 독소(Panton-Valentine leukocidin; PVL) 유전자를 검출하였다. 분리된 MRSA 60개 균주는 1개 혹은 2개의 독소 유전자를 가지고 있으며, 22.7%의 균주가 *seh*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자를 동시에 보유하고 있었으며 18.7%는 *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자를 동시에 보유하고 있었다. 백혈구 용해독소를 암호하는 *pvl* 유전자는 검출되지 않았다. MRSA는 *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자 보유에 높은 상관성을 보였다. MRSA 균주들은 erythromycin (분리균의 89%), gentamicin (70.7%), ciprofloxacin (69.3%), clindamycin (61.3%)과 tetracycline (58.7%)에 내성이 높은 반면, MSSA 균주들은 erythromycin를 제외한 다른 항생제에는 민감하였다. 독소 유전자 *seh*, *sec*와 *tst*는 tetracycline 내성과 높은 상관관계가 있었다.