The Korean Journal of Microbiology (2011) Vol. 47, No. 4, pp. 381-385
Copyright ⓒ 2011, The Microbiological Society of Korea

단 보

메티실린 내성 황색포도알균 판독에 있어 항균제 감수성 검사와 *mec*A PCR법의 비교

김수정

대구보건대학교 임상병리과

Comparison Between Antimicrobial Susceptibility Test and *mec*A PCR Method for Reading of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Su Jung Kim

Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Republic of Korea

(Received November 18, 2011 / Accepted December 20, 2011)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of major pathogen causing hospital infection and several diseases such as purulent infection, bacteremia. The isolation ratio of MRSA is gradually increased up to 80% in the hospital, which makes a limitation for treatment of antibiotics because the isolated MRSA show resistance to methicillin as well as other antibiotics. This study proposes that *mecA* detecting methods which are not commonly used because of cost in the hospital is a more accurate method than Susceptibility Testing to detect a MRSA. We compared *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 as a negative control and 20 MRSA strains isolated from patients by these two methods. We amplified *mecA* gene by polymerase chain reaction (PCR) and confirmed the PCR products by sequencing. All of the MRSA showed oxacillin and cefoxitin resistance whereas 85% (16/19) of the strains had *mecA* wildtype. These results suggest that some of the MRSA are *mecA* mutants therefore *mecA* genotyping reinforces the MRSA detection by antibiotic susceptibility test.

***Keywords*:** *mec*A, antimicrobial susceptibility, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

황색포도알균인 *Staphylococcus aureus*는 그람 양성 알균으로 화농성 질환, 패혈증, 식중독, 독소성 쇼크증후군, 및 항생물질 투여 후에 나타날 수 있는 균교대증으로 인한 장염을 유발하는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 병원내 감염의 중요한 원인균으로 주목 받고 있다(5, 9, 12). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 1960년대 말 국내에 처음 분리 및 보고되었으며 현재 황색포도알균중에서 MRSA의 비율은 점차 증가하여 80% 이상 보고 되고 있는 실정이다(10, 13). MRSA는 황색포도알균이 메티실린이라는 항균제에 내성을 가지는 것을 의미하며, 황색포도알균의 유전체 중 mobile genetic element A (*mec*A)라는 내성유전자를 획득함으로 나타난다. *mec*A 유전자는 황색포도알균의 유전체 중 Staphylococcal cassette chromosome mec이라는 이동성 유전자에 위치하고 있으며 독성과 내성을 운반하고 다른 종간에도 전파가 가능하나 아직 전파 메카니즘은 밝혀져 있지 않다(1, 4). 항균제 내성 유전자를 획득한 MRSA가 급격히 증가함에 따라 beta-lactam 계열 항균제 사용의 제한으로 인해 가장 강력한 항균제 중 하나인 Vancomycin의 사용이 증가되고 있으며 이 항균제 또한 내성이 획득되어 Vancomycin 내성 황색포도알균(VRSA)이 출현하였다(3, 14). 현재 대부분의 병원에서 MRSA는 생화학적 성상으로 세균의 종 감별과 항균제 감수성 검사 장비로서 VITEK (bioMérieux, France) 기기를 이용하여 황색포도알균을 동정하고 항균제 내성 균주의 선별도 VITEK 자동화 기기를 이용하여 확인하고 있다. 최근에는 분자유전학적인 기술이 발전하면서 유전자를 검출함으로 내성을 진단하는 방법도 증가하고 있다. 현재 병원에서 항균제 감수성 검사를 위해 사용하는 자동화기기인 VITEK system은 검체로부터 세균배양과 배양된 세균을 이용한 항균제 감수성 검사를 통해 규명하는 시스템은 약 3일 정도가 소요되나 내성 유전자를 PCR법으로 검출하는 방법은 반응 시간이 약 1일 정도 소요된

* For correspondence. E-mail: sjkim@mail.dhc.ac.kr; Tel.: +82-53-320-1303; Fax: +82-53-320-1450

다(5, 9). 자동화 기기에서는 다양한 항균제의 감수성 결과를 한번에 알 수 있는 반면 내성 유전자의 검출은 지정한 유전자만을 검출할 수 있다. 이런 이유로 항균제 감수성 검사법과 *mec*A 내성 유전자 PCR법을 서로 비교함으로서 MRSA를 신속하고 정확하게 검출하여 환자 치료시 항균제 선택에 도움을 주고자 한다.

음성 대조군으로는 표준 균주인 황색포도알균 ATCC 29213, 양성 대조군 MRSA ATCC 33593을 이용하였고, 그리고 실험군인 MRSA 19 균주는 경북대학교병원 국가병원체자원은행으로부터 제공받았으며 제공된 MRSA는 VITEK system과 16S rRNA를 이용하여 균 종명과 항생제 감수성 검사를 수행한 것을 제공받았다. 경북대학교병원 국가병원체자원은행으로부터 제공받은 동결 건조된 MRSA 19 균주 분말은 100 μl 멸균된 증류수에 푼 다음, 백금이를 이용하여 Mannitol salt agar (Becton, Dickinson and Company, USA)에 접종 후 35°C에서 24시간 배양하였다. 순수 분리된 집락들을 이용하여 그람 염색을 실시한 후, 그람 양성균으로 확인된 집락들은 Catalase test와 Coagulase test를 실시한 후, 순수 분리된 집락을 0.45% saline에 O.D 값이 600 nm가 되도록 한 후 미생물 동정을 위해 고안된 Gram Positive Identification Card내로 균액을 주입 후 35°C, 24시간 배양한다(2, 8, 11). 미생물 동정을 위한 자동화 기기인 VITEK system을 이용하여 균주명을 재확인한 결과 100% 상동성을 나타냈다. 항균제 감수성을 조사하기 위해 음성 대조군인 황색포도알균 ATCC 29213, 양성 대조군 MRSA ATCC 33593, 그리고 MRSA 19 균주는 Gram Positive Susceptibility Card를 이용하여 항균제 감수성 검사를 실시하였고 항균제 종류는 Beta-Lactamase, Benzylpenicillin, Cefoxitin screen, Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin, Fusidic Acid, Gentamicin, Habekacin, Inducible Clindamycin Resistance, Linezolid, Mupirocin, Nitrofurantoin, Oxacillin, Quinupristin/Dalfopristin, Rifampicin, Teicoplanin, Telithromycin, Tetracycline, Tigecycline, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, 그리고 Vancomycin이다. 항균제 감수성 검사 결과는 2011년 Clinical and Laboratory Standards Institute Guideline으로 정의하였다(17). VITEK system을 이용하여 항균제 감수성 검사를 실시한 결과 MRSA 중 *mec*A 유전자가 검출된 17 균주는 Benzylpenicillin, Cefoxitin screen, 그리고 Oxacillin에 모두 내성을 나타냈으며, Habekacin, Inducible Clindamycin Resistance, Linezolid, Mupirocin, Nitrofurantoin, Quinupristin/Dalfopristin, Rifampicin, Teicoplanin, 그리고 Vancomycin에는 모두 감수성이며 Ciprofloxacin (14/17), Clindamycin (13/17), Erythromycin (13/17), Fusidic Acid (12/17), Gentamicin 11/17), Telithromycin (10/17), Tetracycline (13/17), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (2/17)으로 내성을 나타냈으나 MRSA 중 *mec*A 유전자가 검출되지 않은 3 균주는 Benzylpenicillin, Cefoxitin screen, 그리고 Oxacillin에만 내성을 나타냈고 다른 항균제에는 모두 감수성이었다. MRSA 중 *mec*A 유전자가 검출된 17 균주에 비해 *mec*A 유전자가 검출되지 않은 3 균주의 정확한 항균제의 패턴은 알 수 없으나 항균제별 감수성 정도가 더 높은 것으로 나타났다(Table 1). 좀 더 정확한 MRSA를 선별하기 위해 황색포도알균 ATCC 29213과 MRSA 균주는 항균제 디스크 확산법을 실시하였다(15). 항균제 디스크 확산법으로 항균력을 확인하기 위해 황색포도알균 ATCC 29213과 MRSA 균주를 Mueller Hinton agar (Becton)에 접종한 후 Oxacillin (1 μg/ml)과 Cefoxitin (6 μg/ml)을 이용하여 MRSA를 확인 시 황색포도알균 ATCC 29213은 감수성으로 나타낸 반면 MRSA 20 균주는 모두 내성으로 나타났다(Fig. 1).

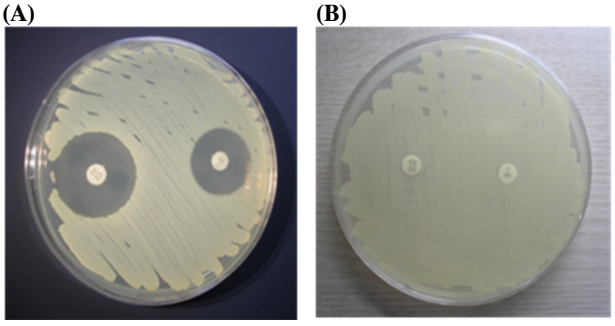

Fig. 1. Comparison of antimicrobial susceptibility between MRSA strain and *S. aureus* ATCC 29213 using disk diffusion method (left side, Cefoxitin 6 μg/ml; right side, Oxacillin 1 μg/ml).

임상에서는 전통적 방법인 항균제 감수성 검사를 실시하며 Oxacillin과 Cefoxitin에 내성일 경우 MRSA라고 하고, 분자유전학적 측면에 의하면 황색포도알균의 세포벽 합성단백질인 Pencillin binding protein이 변형을 가져와서 low affinity penicillin binding protein (PBP2'' 또는 PBP2a)이 생성된 경우이며 변형된 PBP를 encoding하는 유전자를 *mec*A로 알려져 있기에 *mec*A 유전자를 검출할 경우를 MRSA라 한다(9, 16, 18). 임상에서는 매일 많은 수의 검체를 다루며 또한 정확하고 신속하게 결과를 보고해야 함으로 MRSA를 진단하는 방법으로 항균제 감수성 검사법, 슬라이드 응집반응법을 이용하고 있으나 위양성 및 위음성의 문제점을 가지고 있다고 하였다(5, 6). 위양성과 위음성의 문제점을 보완하기 위해 최근에는 MRSA만을 동정할 수 있는 BBL CHROM agar (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, USA)가 개발되어 유용하게 사용되고 있으나 이 또한 48시간 이후 결과를 볼 수 있고 고가의 장비를 구비해야 하는 경제적인 면에서 아직 보급화 되고 있지 않은 실정이다(9). 이런 이유로 대부분의 임상에서는 간편하고 신속한 항균제 감수성 검사법과 디스크 확산법에 의해 MRSA를 판독한다. 그러나 항균제 감수성 검사법에 내성인 경우와 *mec*A 유전자가 검출된 경우가 가장 정확한 MRSA 진단법이라고 할 수 있다.

*mec*A 유전자를 검출하기 위해 균주를 Mannitol salt agar에 접종 후 35°C에서 24시간 배양된 집락 중 단일집락을 취하여 50 μl의 TE buffer에 부유시킨다. 부유액을 100°C에서 10분간 끓인 다음 12,000 rpm 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 이용하여 PCR을 수행하였다. 시발체로는 *mec*A

Table 1. Antimicrobial susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the VITEK system

Antibiotics (MIC; μg/ml)	VITEK system									
	S. aureus ATCC 29213			MRSA 3 strain (*mec*A gene $^{(-)}$)			MRSA 17 strain (*mec*A gene $^{(+)}$)			
	R	S	I	R	S	I	R	S	I	NR
Beta-Lactamase (Neg/Pos)	-	Neg	-		Neg (3)		-	Neg (20)	-	
Benzylpenicillin (≤0.03)	-	1	-	Pos (3)			Pos (17)	-	-	
Cefoxitin Screen (Neg/Pos)	-	Neg	-	Pos (3)			Pos (17)	-	-	
Ciprofloxacin (≤0.5)	-	1	-1		3		14	2	1	
Clindamycin (≤0.25)	-	1	-		3		13	3	1	
Erythromycin (≤0.25)	-	1	-		3		13	4	-	
Fusidic Acid (≤0.5)	-	1	-		3		12	5	-	
Gentamicin (≤0.5)	-	1	-		3		11	6	-	
Habekacin (≤0.1)	-	1	-		3		-	17	-	
Inducible Clindamycin Resistance (Neg/Pos)	-	-	-		3		-	17	-	
Linezolid (≤0.5)	-	1	-		3		-	17	-	
Mupirocin (≤2)	-	1	-		3		-	17	-	
Nitrofurantoin (≤16)	-	1	-		3		-	12	-	5
Oxacillin (≤0.25)	-	1	-	1	3		17	-	-	
Quinupristin/Dalfopristin (≤0.25)	-	1	-		3		-	17	-	
Rifampicin (≤0.5)	-	1	-		3		-	17	-	
Teicoplanin (≤0.5)	-	1	-		3		-	17	-	
Telithromycin (≤0.25)	-	1	-		3		10	2	-	5
Tetracycline (≤1)	-	1	-		3		13	4	-	
Tigecycline (≤0.12)	-	1	-		3		-	17	-	
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (≤10)	-	1	-		3		2	15	-	
Vancomycin (≤0.5)	-	1	-		3		-	17	-	

R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; Neg, Negative; Pos, Positive; NR, No reaction.

Forward 5′-TGGCTATCGTGTCACAATCG-3′이고, *mec*A Reverse 5′-CTGGAACTTGTTGAGCAGAG-3′이다(7). 반응액은 10×buffer 5 μl, 각각 2.5 mM dNTP 4 μl, Taq polymerase 1.25 U, 그리고 DNA template 10 μl를 사용하였다. 반응조건은 94°C 3분간 변성 후, 94°C 30초, 40°C 30초, 72°C 1분간으로 30회 반복하였으며 최종 연장반응은 72°C에서 10분간 반응하였고, 반응 산물은 1% 아가로즈겔에서 100 V, 30분간 전기영동 후 확인하였다. 음성 대조군인 황색포도알균 ATCC 29213을 제외한 양성 대조군 MRSA ATCC 33593을 포함한 MRSA 20 균주 중 17 균주에서 PCR 생성물을 검출하였다(Fig. 2). PCR 생성물이 *mec*A 유전자임을 확인하기 위해 PCR 산물 중 임의로 2개(#7, #8)를 선택한 후, 염기서열 분석업체 (SolGent, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였고, 확인된 염기서열은 황색포도알균의 penicillin binding protein 2 (*mec*A, Accession No. JN108029)와 GeneDoc 프로그램을 사용하여 상동성을 조사결과, GenBank상에 있는 *mec*A (Accession No. JN108029) 유전자와 비교시 각각 99%이상의 상동성을 나타냈기에 PCR 생성물이 *mec*A 유전자임을 확인하였으며 아미노산 분석결과, 아미노산 359번의 L (Leucine)이 I (Isoleucine)로 치환됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

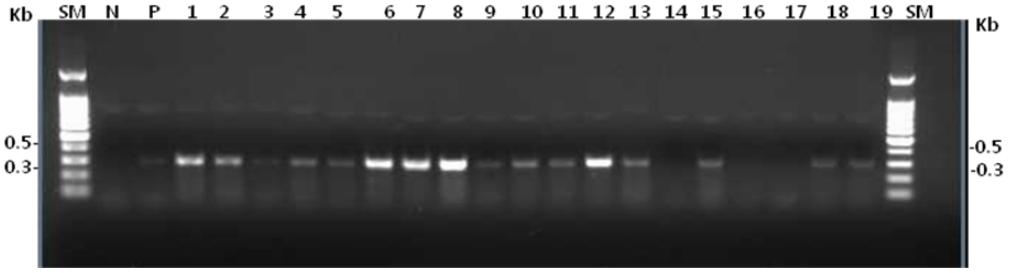

Fig. 2. Polymerase chain reaction (PCR)-based amplification of *mecA* gene with DNA extracts of *S. aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 33593, and MRSA wild type 19 strains. The products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis to confirm the expected length of the gene fragment (approximately 310 bp). Kb, Kliobase; SM, Size Marker.

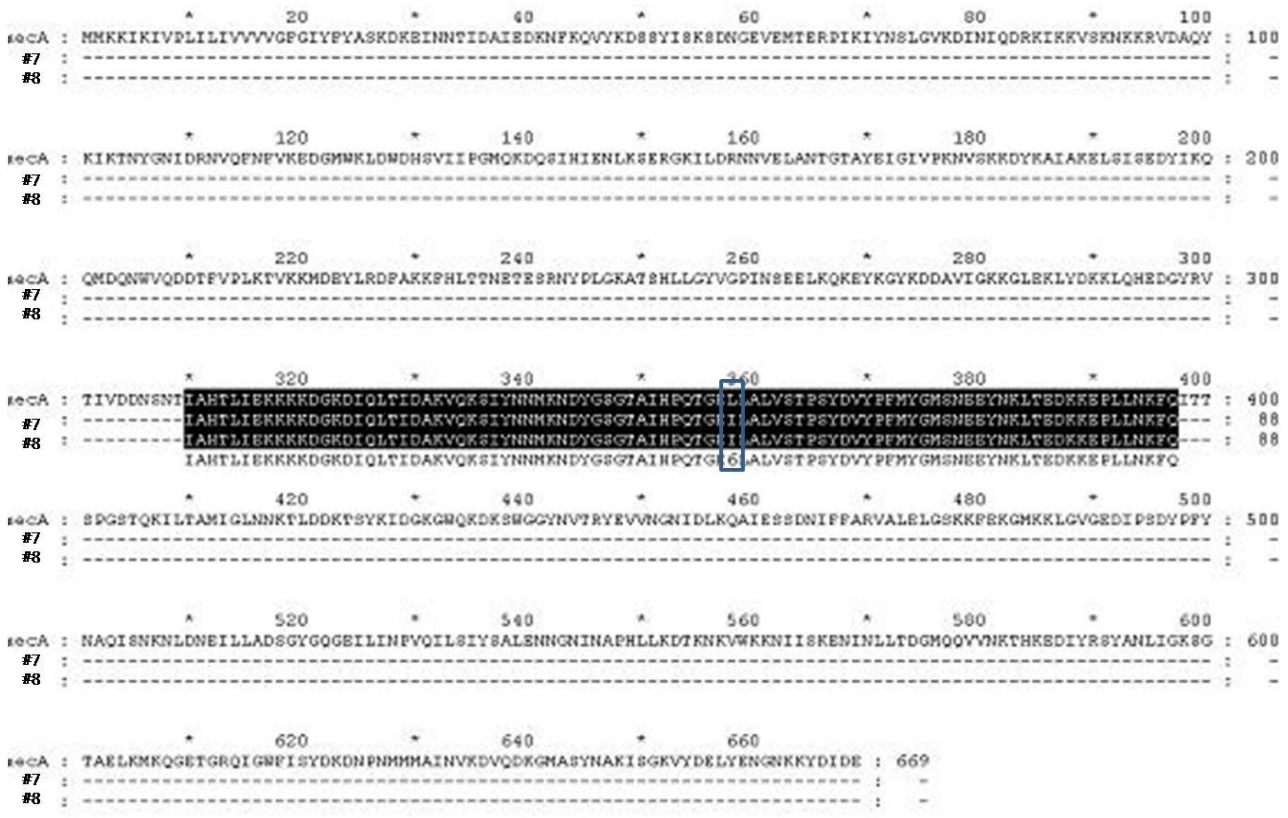

Fig. 3. Comparison of amino acids of the *mec*A from MRSA 7th, 8th strain and MRSA (Accession No. BAG06200). Amino acids are displayed in a single-letter abbreviation after alignment for maximal identity by the GeneDoc program. Blue box, L →I region.

항균제 감수성 결과 20 균주 모두 Oxacillin과 Cefoxitin에 내성임에도 불구하고 3 균주에서 *mec*A 유전자 검출되지 않았기에 template 농도와 annealing 온도를 달리하여 3 차례에 걸쳐 재 PCR을 실시하였으나 같은 결과를 나타내는 것으로 보아 내성획득이 template 농도, $MgCl_2$ 농도, 그리고 annealing 온도에 의한 것이라기 보다는 *mec*A 유전자의 변이에 의한 경우일 것으로 생각된다. Lee 등의 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타냈는데 디스크 확산법은 내성이나 *mec*A 유전자 검출이 음성일 경우는 PCR 위음성으로 보고하였으며 그 원인으로는 시험균의 양의 부족 또는 *mec*A 유전자의 변이에 의한 시발체의 증폭이 일어나지 않았음을 보고하였고 분자적 분석에서는 내성획득이 염색체 DNA가 아닌 plasmid로부터 유래할 수 있음을 보고하였다(13). MRSA 20 균주로는 정확히 언급할 수 없으나, MRSA 중 *mec*A 유전자가 검출되지 않은 3 균주에서의 항균제 감수성 패턴은 Oxacillin, Cefoxitin, 그리고 Benzylpenicillin에서만 내성이고 그 이외에 모든 항균제에 감수성으로 나타났다. 이는 *mec*A 유전자 미검출 원인과 항균제별 감수성 정도에도 연관성이 있을 것으로 생각된다. 향후 MRSA 균주의 수를 증가시켜 항균제 감수성 패턴과 *mec*A 유전자 검출간의 상관성을 조사하여야 할 것이며 또한, *mec*A 유전자가 증폭되지 않은 3 개의 MRSA를 보완하기 위해 Nest PCR법 또는 Multiplex PCR을 이용한다면 *mec*A 유전자 검출의 정확도가 더욱 증가 할 것으로 생각된다. 이런 결과로 보아 MRSA 보균자 및 환자를 판정함에 있어 항균제 감수성 검사법과 보완된 *mec*A 유전자 검출법을 비교분석함으로서 효율적인 진단에 도움이 될 것으로 생각된다.

적요

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 화농성 질환, 균혈증을 유발하고 병원내 감염의 주요 원인균으로 알려져 있다. 병원에서의 MRSA 분리율은 점차 증가하여 80% 이상으로 보고 되고 있으며 Methicillin 뿐만 아니라 다른 항균제에도 내성을 나타냄으로 치료를 위한 항균제 사용에 제한을 받고 있다. 이에 본 연구에서는 MRSA의 정확한 판정을 통해 항생제 남용을 막고자 대부분의 병원에서 사용하는 항균제 감수성 검사법과 경제적인 면으로 인해 병원내에서 많이 사용되고 있지 않지만 정확도가 높은 *mec*A 유전자 검출법을 서로 비교하였다. 그 결과 대조군인 Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*와 실험군 MRSA 20 균주를 대상으로

항균제 감수성 검사법과 *mec*A 유전자 PCR 검출법을 실시한 결과 MRSA 20 균주는 Oxacillin과 Cefoxitin에 모두 내성을 나타냈으나 *mec*A 유전자 검출에서는 20 개 중 17 개에서만 유전자가 검출되어 염기서열분석 결과 *mec*A 유전자임을 확인하였다. 이런 결과로 보아 *mec*A(-) 3 균주는 *mec*A 유전자의 변이로 추측할 수 있기에 임상에서의 MRSA의 판정은 항균제 디스크법과 *mec*A 유전자 PCR 검출법을 동시에 사용함으로 정확한 MRSA 진단에 도움을 주고자 한다.

참고문헌

1. Berglund, C. and B. Söderquist. 2008. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1048-1056.
2. Choi, G.W., W.Y. Jang, J.W. Lee, and S.J. Kim. 2010. Microorganism contamination from wearing one-day disposable contact lenses according to wearing time. *Kor. J. Microbiol*. 46, 152-156.
3. Deurenberg, R.H., C. Vink, S. Kalenic, A.W. Friedrich, C.A. Bruggeman, and E.E. Stobberingh. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 222-235.
4. Hanssen, A.M. and J.U. Ericson Sollid. 2006. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 8-20.
5. Huh, H.J., E.S. Kim, and S.L. Chae. 2011. Evaluation of the BD GeneOhn MRSA real-time PCR assay for detection of nasal colonization by MRSA. *Kor. J. Clin. Microbiol.* 14, 74-78.
6. Jung, J.S., W.S. Shin, S.K. Kim, and Y.S. Park. 2009. Different responses of MSSA and MRSA to oxacillin of their respective MICs. *J. Bacteriol. Virol.* 39, 287-294.
7. Kang, H.K. 2010. Cross infection by MRSA isolates in dental hygiene students. *J. Kor. Acad. Oral Health* 34, 36-40.
8. Kim, S.J. 2009. Identification and distribution of the pathogenic microorganisms isolated from edible ice in north area of Daegu, Korea. *Kor. J. Microbiol*. 45, 86-90.
9. Kim, M.J., D.H. Kang, J.I. Park, and T.Y. Choi. 2009. Evaluation of ChromID MRSA for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Clin. Microbiol.* 12, 169-173.
10. Kwon, Y.I., T.W. Kim, H.Y. Kim, Y.H. Chang, H.S. Kwak, G.J. Woo, and Y.H. Chung. 2007. Monitoring of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from medical environment in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. 35, 158-162.
11. Kown, J.L. and J.S. Park. 2002. Comparison of automated systems for identification of *Vibrio* species. *Kor. J. Microbiol.* 38, 62-66.
12. 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 *mec*A and *fem*A of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens. *Kor. J. Clin. Pathol*. 21, 45-48.
13. Lee, H.S. and H. Lim. 2002. Evaluation of various methods for detection of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Kor. J. Clin. Microbiol*. 5, 105-110.
14. Ryu, J.H. and H.K. Lee. 2000. Coagulase typing and antibiotic resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients in Pusan. *Kor. J. Microbiol*. 36, 216-220.
15. Shin, S.H. and I.h. Seong. 2006. Antimicrobial activity of the extracts from *Paeonia japonica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol*. 42, 54-58.
16. Tulinski, P., A.C. Fluit, J.A. Wagenaar, D. Mevius, L. van de Vijver, and B. Duim. 2011. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms act as a reservoir of heterogeneous SCC*mec* elements. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
17. Wikler, M.A. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, Document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, P.A., USA.
18. Yi, J.Y. and E.C. Kim. 2010. Microbiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Clin. Microbiol.* 13, 1-6.