

Polymerase Chain Reaction을 이용한 Methicillin-resistant Staphylococci의 신속 검출

박진숙* · 박영진

한남대학교 이과대학 미생물학과

Methicillin-resistant staphylococci를 신속하게 검출하기 위한 방법으로 *mecA* polymerase chain reaction을 이용하고 결과를 항생제 감수성 검사와 비교하였다. 국내 병원에 입원중인 환자와 종사자로부터 총 43개의 staphylococci를 분리하여 항생제 감수성 시험을 실시한 결과, 43 균주 중 methicillin 내성 균주(MRS)는 39 균주, 감수성 균주(MSS)는 4 균주이었다. PCR시험결과, methicillin 내성 균주에서는 MRSC (methicillin-resistant *Staphylococcus cohnii*), 1 균주(HRC2-4)를 제외하고 *mecA* 유전자에 해당하는 533bp의 절편이 증폭되었다. 한편, methicillin 감수성으로 분류된 MSSA (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*), 1 균주(HSA1-10)에서도, *mecA* 유전자가 증폭되어 항생제 감수성과 상반된 결과를 보였다. 모든 MRSA는 *mecA* 양성을 나타내었으나, 전체적으로 *mecA* 유전자의 유무는 항생제 감수성 검사와 95.6%의 일치율을 나타냈다.

Key words □ *mecA* gene, MRS, PCR, Staphylococci

*Staphylococcus aureus*는 사람과 동물의 조직에 화농성질환, 식중독, 골수염, 패혈증 및 뇌수막염 등을 일으키는 광범위한 감염 세균으로 병원내 감염의 주요 원인이 되고 있으며 수술실의 체내 감염 및 암 환자, 면역 약화 환자 등에 치명적인 영향을 미치고 있다(1).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 1961년 최초로 분리된 이후 methicillin에 대하여 *Staphylococcus* 속의 다른 종들도 내성을 지니는 것으로 보고되고 있으며(5), 점차 늘어나는 추세에 있다. 이와 같이 methicillin내성을 갖는 staphylococci 균주들은 항생제에 다제내성을 갖고 있으며, 이들의 감염에 대한 적당한 치료제로 vancomycin 등 소수의 항생제 만이 효과를 나타내고 있기 때문에 병원내 감염의 병원체로서 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있다. 우리나라의 경우도 국내 환자에 적용한 methicillin-resistant staphylococci (MRS)의 약제 내성 전과 경로의 차단이 시급한 실정으로 빠른 진단 및 동정이 요구되고 있다.

*S. aureus*의 methicillin과 다른 β -lactam 항생제에 대한 내성은 세균의 세포벽 합성에 관련되어 있는 penicillin-binding protein 2' (PBP2')를 coding하는 *mecA* 유전자의 획득과 밀접한 관계가 있다(2). 일반적으로 oxacillin disk diffusion test와 oxacillin salt agar screen test가 MRSA를 구별하기 위해서 사용되어지나, PBP2'의 생산량에 따라 내성의 정도가 달라지고, PBP2'의 합성은 ceftizoxime, cepazolin 등의 β -lactam계열의 항생제 처리에 따라 증가된다. 또 배양 온도, 식염농도 및 수소이온 농도 등의 환경조건에 따라 내성의 정도가 다르게 나타난다(11). Latex를 이

용한 MRSA-screen test가 보고된 바 있으나 PCR에 의한 *mecA* 유전자의 검출법은 현재 MRSA를 동정하기 위한 "gold standard"로 여겨지고 있다(4,5).

본 연구에서는 국내의 병원에 입원중인 환자와 종사자로부터 얻은 sample을 혈액한천배지(blood agar plate)에서 도말한 후, 생장한 staphylococci를 대상으로 항생제 감수성 시험과 생리 생화학적 시험을 실시하여 MRSA 및 coagulase-negative staphylococci (CoNS)를 먼저 선별한 후, PCR을 이용하여 *mecA* 유전자를 검출하고 분리 균주들의 항생제 감수성 시험 결과와 비교함으로써 MRS의 병원내 임상진단에 있어 PCR방법의 유용성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 사용된 균주는 1998년부터 1999년 사이에 대전시에 위치한 병원의 임상 검체 및 종사자로부터 분리하였으며, 실험에 사용하기까지는 -70°C 에 보존하였다. *Staphylococcus aureus* 39 균주, *Staphylococcus epidermidis* 2 균주, *Staphylococcus warneri* 1 균주, *Staphylococcus cohnii* 1 균주, 총 43 균주를 사용하였으며, 표준 균주로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928를 사용하였다(Table 1).

균주의 분리 및 동정

균주의 분리는 임상검체를 혈액한천배지에 도말하고 35°C 에서 18~24 시간 배양하여 황색의 둥글고 평활한 집락을 선별한 후, 그람 염색을 실시하여 그람양성의 포도상 구균의 균주를 선택하였다. 분리된 균주의 용혈성 유무를 관찰하기 위해 혈액 한천 배

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (042) 629-7498, Fax: (042) 629-8355
E-mail: jspark@mail.hannam.ac.kr

Table 1. Physiological characteristics and oxacillin MICs of clinical staphylococci isolates

Test Strain	Hemolysis	Hydrolysis of Mannitol	Coagulase	Concentration of Oxacillin (mg/ml)	
				24 hr	48 hr
HRA1-3	+	+	+	80	80
HRA1-4	+	+	+	320	320
HRA1-5	+	+	+	40	80
HRA1-6	+	+	+	20	40
HRA1-7	+	+	+	10	20
HRA1-8	+	+	+	10	10
HRA1-9	+	+	+	320	320
HRA1-11	+	+	+	40	40
HRA1-12	+	+	+/-	80	80
HRA1-13	+	+	+	40	40
HRA1-14	+	+	+	320	320
HRA2-1	+	+	+	160	160
HRA2-2	+	+	+	160	160
HRA2-5	+	+	+	10	20
HRA2-6	+	+	+	10	20
HRA2-7	+	+	+	10	20
HRA2-8	+	+	+	40	80
HRA2-9	+	+	+	80	80
HRA2-10	+	+	+	160	160
HRA2-11	+	+	+	160	320
HRA2-12	+	+	+	320	160
HRA2-13	+	+	+	8	320
HRA2-14	+	+	+	10	10
HRA2-15	+	+	+	8	20
HRA2-16	+	+	+	160	10
HRA2-17	+	+	+	80	160
HRA2-18	+	+	+	60	80
HRA2-19	+	+	+	160	160
HRA2-20	+	+	+	320	320
HRA2-21	+	+	+	160	160
HRA2-23	+	+	+	40	40
HRA2-24	+	+	+	10	20
HRA2-25	+	+	+	80	80
HRA2-26	+	+	+	160	160
HRA2-27	+	+	+	40	40
HSA1928	+	+	+	1	1
HSA1-10	+	+	+	2	2
HSA2-22	+	+	+/-	0.25	0.25
HSA2-28*	+	+	-	1	1
HSA2-29	+	+	-	0.5	0.5
HRC2-4	+	-	-	1	4
HRE1-15	+/-	-	-	2	2
HRE1-16	-	-	-	4	4
HRW2-3	+	-	-	0.5	0.5

+, positive reaction; -, negative reaction; HRA, methicillin-resistant *S. aureus*; HSA, methicillin-susceptible, *S. aureus*; HRC, methicillin-resistant *S. cohnii*; HRE, methicillin-resistant *S. epidermidis*; HRW, methicillin-resistant *S. warneri*, **S. aureus* KCTC 1928.

지에, 그리고 mannitol 분해 여부를 알아보기 위해 7.5% NaCl가 함유되어있는 mannitol salt 한천배지에 접종하여 35°C 배양기에 24~48 시간 배양하였다. 응고효소(coagulase) 시험을 위해서 5 ml 시험관에 혈장 0.5 ml을 넣고 한 loop의 세균 집락을 충분히 풀 다음 35°C 수조에 24 시간 배양하였다. 생리시험 후, 균주의 동정은 API identification program (ID 32 STAPH; bioMe'rieux, France)을 이용하였다.

항생제 감수성 검사

The National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)방법에 따라 2% NaCl을 첨가한 Muller-Hinton 한천 배지(pH 7.3)에 oxacillin을 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 항생제 감수성 시험을 위한 배지를 조제하였다. 각각의 항생제가 첨가된 한천 배지에 tryptic soy broth에서 6 시간 배양된 균주를 접종하여 35°C에서 24~48 시간 배양하여 관찰하였다.

PCR 증폭을 위한 DNA 추출

2 µg/ml의 oxacillin이 첨가된 영양 한천 배지에서 35°C, 24 hr 배양하여 생성된 methicillin resistant staphylococci (MRS)균주와 oxacillin이 들어있지 않은 영양 한천 배지에서 성장한 methicillin susceptible staphylococci (MSS) 집락을 용균 용액(110 mM Tris-HCl (pH 8.9), 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0.1% NaCl, 200 µg/ml proteinase K, 0.45% Tween 20, 10 mg/ml lysozyme) 30 µl에 현탁한 후, 60°C에서 10 분간 반응시킨 다음 95°C에서 5 분간 가열한 후 6,000×g으로 10 분간 원심 분리하여 상층액을 DNA용액으로 사용하였다.

PCR에 의한 DNA 증폭

PCR을 위한 primer (Korea Biotech Inc., Korea)로는 *mecA* 유전자의 1282에서 1303 부위에 상보적으로 결합하는 primer 1 (5'-AAAATCGATGGTAAGGTTGGC)과 1793에서 1814에 상보적으로 결합하는 primer 2 (5'-AGTTCTGCAGTACCGGATT-GC)를 이용하였으며, PCR 반응 용액은 DNA용액 5 µl, primer1과 2 (100 pmol)를 각각 1.5 µl, dNTP (2.5 mM) 1.25 µl, 반응 완충 용액(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µg/ml BSA)10 µl, *Taq* polymerase 2.5 U를 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응액량을 100 µl로 조절하여 사용하였다. 94°C에서 5 분간 predenaturation을 1 cycle 실시 후, 94°C에서 1 분간 denaturation, 58°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension의 조건으로 40 cycles을 수행하였고 final extension을 72°C에서 5 분 1 cycle로 하였다. 증폭된 PCR product를 6×gel loading buffer와 함께 2.5% nusieve agarose gel (Promega, Madison, USA)에서 80 V, 2 시간 30 분 전기영동을 수행하였으며 전기영동 완충용액으로 0.5×TBE 완충 용액을 사용하였다. 전기영동 후 agarose gel을 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색하여 자외선 transilluminator 하에서 증폭된 DNA band를 확인하였다.

Southern blot hybridization

Enhanced chemiluminescence (ECL)-DNA labeling system (Amersham, UK)을 이용하여 표지한 PCR products를 probe로 하여, Marmur법(9)에 의해 추출된 genomic DNA를 제한 효소 *Hind*III와 *Hae*III로 절단한 후 hybridization을 수행하였다.

결 과

분리 균주의 생리 생화학적 특성

분리된 staphylococci 43 균주 중 용혈성 시험, mannitol 분해 시험, 응고효소 시험에서 모두 양성으로 나타난 39 균주는 API identification kit를 이용하여 동정한 결과, *Staphylococcus aureus*로 동정되었으며, 나머지 coagulase-negative staphylococci (CoNS) 4 균주의 경우, HRE1-15와 HRE1-16은 *Staphylococcus epidermidis*, HRW2-3은 *Staphylococcus warneri*로, HRC2-4는 *Staphylococcus cohnii*로 동정되었다(Table 1).

항생제 감수성

Agar dilution법에 의한 항생제 감수성 시험 결과, 감수성은 oxacillin 2 µg/ml 이하, 내성은 4 µg/ml 이상에서, CoNS의 경우, 감수성은 oxacillin 0.25 µg/ml 이하에서, 내성은 0.5 µg/ml 이상에서 성장한 균주로 결정하였다. 39 균주의 *S. aureus* 중 35 균주가 methicillin에 내성을 갖는 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)로, 나머지 4 균주(HSA1-10, HSA2-22, HSA2-28, HSA2-29)는 2 µg/ml 이하의 농도에 내성이 없는 MSSA (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*)로 나타났다. CoNS 4 균주(HRE1-15, HRE 1-16, HRW2-3, HRC2-4)는 모두 0.5 µg/ml 이상에서 내성을 나타내는 균주들로 판정되었다(Table 1).

PCR에 의한 *mecA* 유전자의 검출

Primer 1과 2를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과, MRSA로 판정된 모든 균주들로부터 533 bp의 *mecA* 유전자가 검출되었다. MSSA로 판정된 HSA2-22, HSA2-28, HSA2-29에서는 *mecA* 유전자가 검출되지 않았으나(Fig. 1), methicillin 감수성 균주로 판정된 HSA1-10에서는 *mecA* 유전자가 증폭되어 항생제 감수성 시험과는 상반된 결과를 나타내었다(Fig. 2). 한편, MRSE (methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*)인 HSE1-15, HRE1-16과, MRSW (methicillin-resistant *Staphylococcus warneri*)인 HSW2-3의 경우에도 *mecA* 유전자가 증폭되었으나, methicillin 내성으로 나타난 MRSC (methicillin-resistant *Staphylococcus cohnii*), HRC2-4의 경우, *mecA* 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 2, Table 2). 항생제 감수성 결과와 상반된 결과를 나타낸 HSA1-10과 HRC2-4의 경우, 재현성을 시험한 결과 동일한 결과를 얻었다.

Southern blot hybridization

*Hind*III와 *Hae*III에 의해 genomic DNA 절단 후 Southern blot

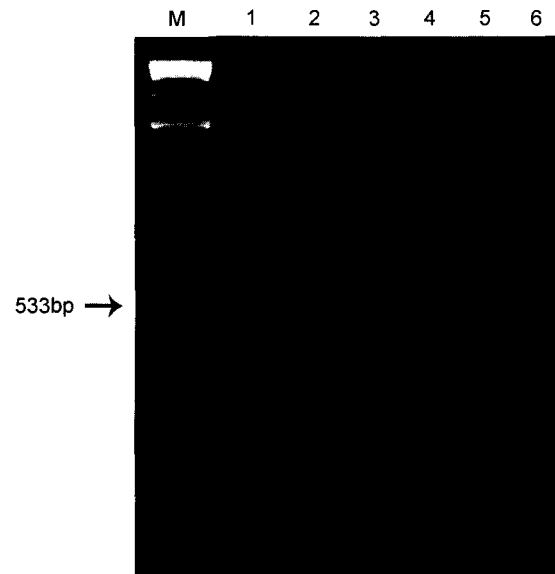


Fig. 1. PCR amplification of 533-bp fragments of the *mecA* gene from methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). M, 1 kb ladder; Lanes 1, HRA1-3; 2, HRA1-4; 3, HRA1-5; 4, HSA2-22; 5, HSA2-28; 6, HSA2-29.

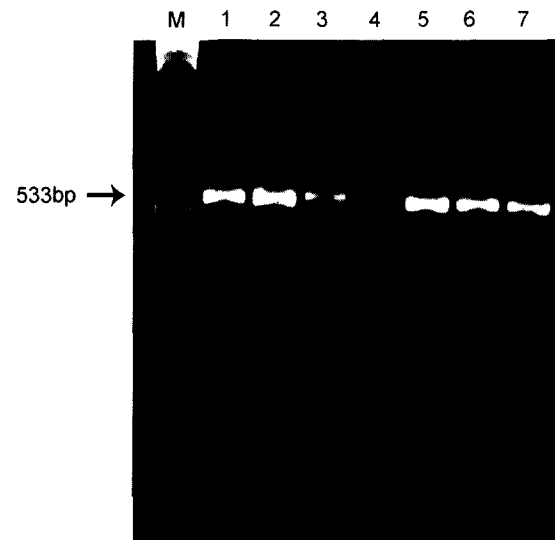


Fig. 2. PCR amplification of 533-bp fragments of the *mecA* gene from methicillin-resistant staphylococci (MRS) and methicillin-susceptible staphylococci (MSS). M, 1 kb ladder; Lanes 1, HRA2-1; 2, HRA2-2; 3, HSA1-10; 4, HRC2-4; 5, HRE1-15; 6, HRE1-16; 7, HRW2-3.

한 경우, methicillin 내성 균주들에서 hybrid된 band가 각각, 약 4 kb위치에서 형성되었고, methicillin 감수성 균주들에서는 band가 검출되지 않았다. Methicillin 감수성이나 *mecA* 유전자가 증폭된 HSA1-10의 경우 hybrid band를 형성하였으며, methicillin 내성이나 *mecA* 유전자가 증폭되지 않은 HRC2-4의 경우, hybrid band가 형성되지 않았다(Fig. 3). PCR에 의해 증폭된 533 bp의 band는 genomic DNA로부터 증폭되었음을 확인하였다.

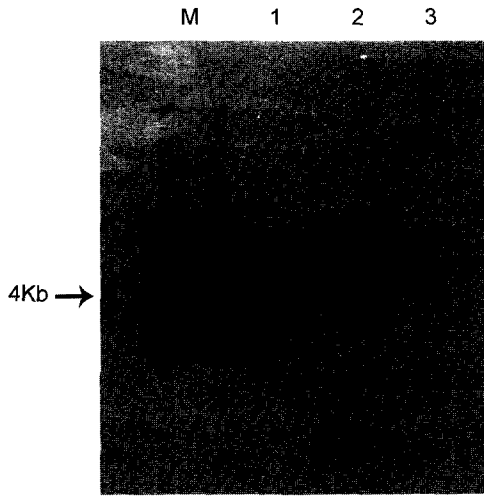


Fig. 3. Southern blot analysis of methicillin-resistant or susceptible staphylococci using an 533 bp PCR products. M, 1 kb ladder; Lanes 1, HRA2-1; 2, HSA1-10; 3, HRC2-4.

고 찰

본 연구에서 이용된 PCR은 특정 유전자의 단편을 증폭시킴으로써 적은 양의 DNA로도 특정 유해 유전자만을 검출할 수 있기 때문에 병원성 미생물을 진단하는데 많이 응용되고 있다. 현재 가장 많이 이용되고 있는 실험 방법 중의 하나이며, PCR을 기초로한 연구들이 다수 발표되고 있다. Staphylococci genome안에 존재하는 IS256 element의 polymorphism을 관찰하거나(6), 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 염기서열을 분석하거나(3), coagulase 유전자의 restriction fragment length polymorphism을 관찰하기 위한 방법(8)들에 PCR이 이용되고 있다. 한편, 임상에서 항생제 감수성을 이용하여 MRS를 쉽고 빠르게 동정하기 위해 Crystal MRSA ID system, Vitek 2 system, MRSA screen test (4,10,14) 등 다양한 방법들이 제시되고 있으며, PCR에 의한 mecA 유전자 검출과의 비교를 통해 위의 방법들이 평가되고 있다.

본 실험의 PCR에 사용된 DNA는 직접 세균 집락으로부터 추출하였고 primer는 low-affinity penicillin-binding protein (PBP2')의 구조 유전자인 mecA 유전자에 상보성 있는 22mer의 oligonucleotides를 사용하였다. 분리한 균주의 항생제 감수성 시험은 NCCLS의 agar dilution 방법에 따라 실시하였으며, PCR 결과와 비교한 결과, methicillin 내성(MRS) 39 균주의 경우, S. cohnii (HRC2-4) 1 균주를 제외한 MRS 38 균주에서 mecA 유전자가 증폭되었다. MRSA의 경우, mecA PCR과 100%의 일치율을 나타내었다. Methicillin 감수성(MSS)으로 나타난 4 균주는 1 균주(HSA1-10)을 제외하고 mecA 유전자가 증폭되지 않았다.

Table 2에서 제시한 바와 같이, MSSA 1 균주가 mecA 양성으로, MRSC 1 균주가 mecA 음성으로 나타나, oxacillin MIC와 일치하지 않는 결과를 나타내었다. Methicillin 감수성으로 분류된 4 균주(HSA1-10, HSA2-22, HSA2-28, HSA2-29) 중에서

Table 2. Comparison of mecA PCR results of strains which had oxacillin MICs less than 4 µg/ml by antibiotic susceptibility test

Strain	Oxacillin susceptibility	mecA gene
SA		
HSA1-10	S	+
HSA2-22	S	-
HSA2-28	S	-
HSA2-29	S	-
CoNS		
HRC2-4	R	-
HRE1-15	R	+
HRE1-16	R	+
HRW2-3	R	+

SA, *Staphylococcus aureus*; CoNS, coagulase-negative staphylococci; S, susceptible; R, resistant; +, presence; -, absence.

oxacillin 2 µg/ml 이하에서 성장한 HSA1-10 균주에서는 mecA 유전자가 증폭되었다. 이와 같이 mecA PCR과 항생제 감수성의 결과가 상응하지 않는 경우는 Felten등(4), Frebourg등(5)에 의해서도 보고되었으며, 이는 mecA 유전자의 이질적 발현에 기인하는 것으로 사료된다(15). 즉 mecA 위양성(false positive)에 관하여 mecA 유전자가 PBP2'로 발현되지 않거나, 기능부전의 PBP2'를 코딩하고 있거나, PBP2'가 존재하더라도 methicillin 내성의 발현에 다른 요인이 관여하여 발현이 되지 않는 경우 등이 가정되고 있다(12). Coagulase-negative staphylococci (CoNS)이며, 내성 균주인 S. epidermidis (HRE1-15, HRE1-16)와 S. warneri (HRW2-3)로 부터는 mecA 유전자가 증폭되었으나, oxacillin 4 µg/ml 이하에서 성장한 S. cohnii (HRC2-4)의 경우, methicillin 내성 균주이면서 mecA 음성 균주로 나타나 항생제 감수성 시험과는 일치하지 않는 결과를 보였다. 이는 CoNS 중 S. epidermidis의 경우 mecA PCR이 oxacillin MIC와 높은 상응성을 나타내지만, non-S. epidermidis, 특히, S. cohnii, S. lugdrensis, S. saprophyticus에서는 상응성이 떨어진다는 보고와 일치하는 결과이다(7,14,15). 또한, methicillin 내성 수준은 유도될 수도 있으며(11), 한편 transposon Tn551의 삽입으로 methicillin 내성 세균에서 methicillin 감수성 세균으로 유도된 경우라도 여전히 PBP2' 단백질이 생성되는 것으로 나타나 유전적으로는 mecA 유전자를 가지고 있음이 밝혀진 바 있다(13).

43 균주를 이용한 본 연구의 경우, 전체적으로 staphylococci의 mecA PCR과 oxacillin 감수성 시험과의 일치도는 95.6%를 나타내어, 항생제 감수성에 의한 MRS의 검출을 위해서는 MRS 유형의 변화 및 mecA 유전자의 이질적 발현에 관한 연구와 더불어, 많은 데이터의 축적에 따른 새로운 MIC 기준의 설정도 검토되어야 할 것으로 사료된다.

항생제 감수성 시험에서 methicillin 내성 여부를 결정하기 어려운 균주들일 지라도 PCR을 이용한 mecA 유전자 검출에 의해 신속하고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있으며, 따라서 MRS 진

단에 있어, PCR에 의한 *mecA* 유전자 확인이 항생제 감수성 시험에 비해 정확하고 빠른 방법이 될 수 있음을 확인하였다.

감사의 말

이 논문은 2001학년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 유필열, 김영일, 이준행, 정선식, 안태휴, 신종희, 양동욱, 김영휴. 1995. Methicillin 내성 황색 포도상구균의 각종 항균제에 대한 내성 양상과 plasmid DNA의 특성. *감염* 27:15-29.
2. Archer, G.L. and E. Pennel. 1990. Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1720-1724.
3. Deplano, A., M. Vaneechoutte, G. Verschraegen, and M.J. Struelens. 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA-amplicon polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 35, 881-885.
4. Felten A., B. Grandry, P.H. Lagrange, and I. Casin. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2766-2771.
5. Frebourg, N.B., D. Nouet, L. Lemee, E. Martin, and J.F. Leme-land. 1998. Comparison of ATB Staph, rapid ATB Staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 52-57.
6. Hookey, J.V., J.F. Richardson, and B.D. Cookson. 1998. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 35, 881-885.
7. Horstkotte, M.A., J.K.-M. Knobloch, H. Rohde, S. Dobinsky, and D. Mack. 2002. Rapid detection of methicillin in coagulase-negative staphylococci with the Vitek 2 system. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3291-3295.
8. Kumari, D.N., V. Keer, P. M. Hawkey, P. parnell, N. Joseph, J.F. Richardson, and B. Cookson. 1997. Comparison of susceptibility testing method with *mecA* gene analysis for determining oxacillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2952-2961.
9. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
10. Mathias, C., A. Wenger, K. Jaaton, D.S. Blanc, and J. Bille. 1999. Evaluation of MRSA-screen, a simple Anti-PBP 2a slide latex agglutination kit for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1591-1594.
11. Murty, V., D.P. Brunner, and B.J. Wilkinson. 1987. Effects of temperature, NaCl and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1727-1733.
12. Shimaoka, M., M. Yoh, A. Segawa, Y. Takarada, K. Yamoto, and T. Honda. 1994. Development of enzyme-labeled oligonucleotide probe for detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1866-1869.
13. Song, M.D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino, and M. Matsuhashi. 1987. Evolution of an inducible penicillin target protein in methicillin-resistant *S. aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 221, 167-171.
14. Stoakes, H.Z.L., S. Garrow, S. Longo, V. Fitzgerald, and R. Lannigan. 2000. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2051-2054.
15. Yamazumi, T., I. Fruta, D.J. Diekema, M.A. Pfaller, and R.N. Jones. 2001. Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-screen latex agglutination test, and *mecA* analysis for detecting oxacillin resistance in a geographically diverse collection of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3633-3636.

(Received November 5, 2002/Accepted December 3, 2002)

ABSTRACT: A Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Polymerase Chain Reaction
Jin-Sook Park and Young-Jin Park (Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Hannam University, Daejeon 300-791, Korea)

PCR of the *mecA* gene for the rapid detection of methicillin-resistant staphylococci was performed and compared with the antibiotic sensitivity test. A total of 43 strains of staphylococci from clinical specimens were used in this study. An antibiotic sensitivity test by the agar dilution method of NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standard) was performed for the strains. Among them, 39 isolates were methicillin-resistant (MRS), and 4 isolates were methicillin-susceptible (MSS). With the exception for one strain (*Staphylococcus cohnii*, HRC2-4), all MRS strains amplified the expected 533 bp fragments of the *mecA* gene by PCR. However, one strain (*Staphylococcus aureus*, HSA1-10) that was classified as a sensitive strain by the antibiotic sensitivity test was *mecA* positive by PCR. All 35 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were *mecA* positive, but overall, concordance between the results of the *mecA* PCR and antibiotic sensitivity test was 95.6%.