

Isolation Rate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Nasal cavity inferior regions and Cellular phones

Chung Hwan Kim¹, Jun Young Lee¹, Mi Kyeong Kim², Sung Hwan Kim³,
Geun Young Park³, So Yeon Bae³, Myeong Jin Seo³, and In Hyeog Go³

Department of Clinical Pathology, Masan University 630-729, Korea¹

Department of Clinical Pathology, Gimhae University 621-190, Korea²

Department of Clinical Pathology, Student of Masan University 630-729, Korea³

Nosocomial infection and community-acquired infection with *Staphylococcus aureus*, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), has become a strong concern in human body sites and related effects. The aim of this study is investigate the isolation rate of MRSA from nasal cavity inferior regions and cellular phones to assess the risk factor of nosocomial infection and community-acquired infection.

34.7% and 37.2% isolates were MRSA from the nasal cavity inferior regions and cellular phones according to a Mannitol salt agar (added oxacillin 6 μ g/mL) culture and PCR according to *S. aureus* specific 16S rRNA and *mecA* primers. Thus, the distribution of *S. aureus* and the isolation rate of MRSA represent a very high risk factor regards nosocomial infection and community-acquired infection.

Key Words : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), PCR, *mecA*, nosocomial infection, community-acquired infection

서론

황색 포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 농양이나 창상 감염과 같은 피부감염과, 패혈증, 독소성 쇼크증후군(toxic shock syndrome) 등 다양한 질병을 유발하는 그람양성 알균이다. *S. aureus*는 그람양성 알균 중 임상 검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 건강한 성인의 코 안에서 약 40% 정도 분리되는 것으로 보고되었으며 피부접촉으로 다른 사람에게 전파 될 수 있고 수술부위 감염, 폐렴과 같은 병원 감염(hospital-acquired infection, nosocomial infection)의 주요 원인균이고 지역사회감염(community-acquired in-

fection) 원인균으로도 주목을 받고 있는 세균이다(Francis, 1995; Han *et al*, 1999). *S. aureus*의 치료에는 페니실린과 같은 β -lactam 계열의 항균제가 전통적으로 사용되어 왔지만 1940년대 후반부터 일부 *S. aureus*가 페니실린 내성을 나타내기 시작하였고 1950년대에 들어와서는 tetracycline, chloramphenicol 및 macrolide 계열에도 내성을 보이는 *S. aureus*가 출현하였으며(Fridkin *et al*, 2005) 이 균에 가장 효과적인 항균제로 개발된 methicillin이 사용되기 시작한 2년 뒤인 1961년 영국에서 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)균주가 처음 보고 되었다 (Jevens, 1961). 우리나라에서 MRSA는 1970년대 후반부터 큰 종합병원 환자에 원내감염을 일으키는 문제의 세균이 되었고, 또한 1980년에는 미국에서 지역사회 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA) 감염이 처음 보고 되었다(Miller *et al*, 2005).

β -lactam 계열의 항균제에 대한 내성은 흔히 β -lactamase를 생산하여 약제의 주요 구조인 β -lactam환을 분해하는 기전을 갖는 반면 MRSA의 내성기전은 염색체 내에

Corresponding author: Kim Chung Hwan, Department of Clinical Pathology, Masan University, Changwon 630-729, Korea.
Tel: 010-6585-7920. E-mail: chkim@masan.ac.kr

Received : 30 August 2012

Return for modification : 13 September 2012

Accepted : 14 September 2012

mecA (methicillin resistant determinant A) 유전자를 획득하여 β -lactam 약제와 친화성이 아주 낮은 세포벽합성효소 penicillin binding protein (PBP) 2a 혹은 PBP2'를 생산하여 내성을 나타낸다(Georgopapadaku *et al*, 1982; Chambers, 1997). 그러나 methicillin 내성 발현의 보조 유전자인 *fem* (factor essential for methicillin resistance) A 유전자는 *S. aureus*에 특이하게 존재하는 것으로 보고되었다 (Maidhof *et al*, 1991).

MRSA는 모든 β -lactam 계열 항균제에 내성을 보일뿐 아니라 aminoglycoside, tetracycline, quinolone계 항균제에도 흔히 내성을 보이는 것으로 보고되어있다(Kim *et al*, 2001; Akcam *et al*, 2009).

MRSA는 1970년대 초반 국내에서 처음으로 보고된 이래 꾸준히 증가하여 1995년 이후 *S. aureus* 중 70% 정도로 일장비율을 유지하고 있으나 중환자실에서 분리되는 *S. aureus*에서는 MRSA의 비율이 90%에 달하는 것으로 보고되었다 (Lee *et al*, 2001; Akcam *et al*, 2009; Park *et al*, 2009). 최근에는 지역사회에서 MRSA 분리가 증가되면서 지역사회감염의 주요 원인균으로 주목되고 있다. MRSA 감염경로는 피부에서 피부로 직접적인 접촉으로 감염될 수 있고 또한 감염자의 물건(수건, 붕대, 밴드 등)을 함께 사용하거나 만져서 감염될 수도 있다. CDC에서는 위험 요소를 '5 C'로 말하고 있다. 군중이 많은 곳(Crowding), 잦은 피부 접촉(frequent skin-to-skin Contact), 피부의 상처부위(Compromised skin, 예를 들어 베인 상처, 또는 스치거나 문질러서 살갓이 벗겨진 상처), 오염된 물건이나 사물의 표면(Contaminated items and surfaces), 청결 부족(lack of Cleanliness) 등 5가지이다. 이 5가지 위험 요소가 해당되는 곳은 학교, 기숙사, 군부대, 집, 데이케어 센터 등이 지역사회감염의 위험요소이고 병원감염의 경우는 현재 병원에 입원했거나 최근까지 병원에 입원했던 경우, 장기간 병원이나 투석센터에 가는 경우, 최근까지 항생제를 사용했던 경우 등이 위험요소로 꼽힌다(이영진 등, 2010).

본 연구는 마산의 대학생 213명으로부터 코 안 아래 부위(nasal cavity inferior region)와 휴대전화(cellular phones)로부터 *S. aureus*의 보균율과 MRSA의 분리 빈도를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. *S. aureus*의 분리

코안 아래 부위 및 휴대전화에서 *S. aureus*의 분리는 증류수 0.5 mL이 담겨있는 시험관에 면봉을 넣어 고압멸균 후 멸균된 면봉을 이용하여 코 안 아래 부위와 휴대전화의 앞면과 측면을 문질러 tryptic soy broth (TSB, Difco Lab., Livonia MI, USA)에 *S. aureus* 균주 선택을 위해 7.5% NaCl과 그람양성균 선택을 위해 nalidixic acid 그리고 colistin이 각 10 μ g/mL 함유되도록 제조한 배지 5 mL에 채취 검체를 접종하여 35°C에서 24시간 배양하고 mannitol salt agar (MSA, Difco Lab., Livonia, MI, USA)에 계대 배양하였다. *S. aureus*의 분리는 MSA에서 황색집락을 선택하여 catalase 시험, coagulase 시험과 같은 전통적 생화학 방법을 시행하여 동정하였다.

2. MRSA의 분리

Oxacillin 30 mg을 멸균 증류수 10 mL에 녹여 멸균 시험관에 1 mL씩 분주하여 -20°C에 냉동 보관하며 stock 용액(3 mg/mL)으로 사용하였다. MSA 500 mL을 고압 멸균하여 50°C로 식힌 다음 stock 용액 1 mL을 용해하여 넣은 후 petri dish에 분주하여 6 μ g/mL농도의 oxacillin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)이 함유된 mannitol-salt oxacillin (MSO) 우무배지를 제조하였으며 이 배지에서 증식과 발효 반응에 양성인 균주를 MRSA로 선별하였다(Fig. 1A, 1B).

3. PCR을 이용한 16S rRNA와 *mecA* 유전자의 검출

MSO에서 자란 집락 4-5 개를 멸균 증류수 150 μ L에 풀

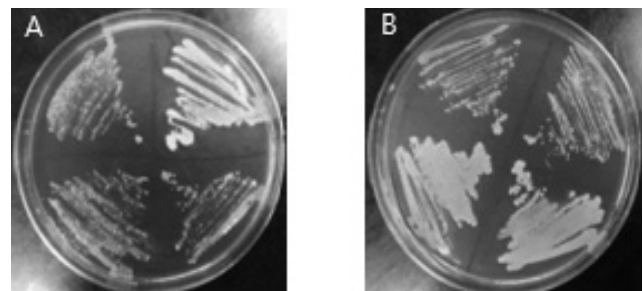


Fig. 1. A ; Isolation of *S. aureus* on MSA(right upper). B ; Isolation of MRSA on MSO(oxacillin 6 μ g/mL in MSA).

Table 1. PCR primers for the identification of *S. aureus* and MRSA

Primer pair	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>mecA</i> for MRSA	CTCAGGTACTGCTATCCACC CACTTGGTATATCTTCACC	450
16S rRNA for <i>S. aureus</i>	GGAATTCAAATGAATTGACGGGGG CGGGATCCCAGGCCCGGAACGTATTAC	470

어 100°C heating block에 10분간 작용시키고 ×13,000 g 로 5분간 원심 후 상층액을 중합효소연쇄반응(PCR)을 위한 template DNA로 사용하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)을 위해 *S. aureus*에 specific한 16S rRNA 유전자 검출용 primer 와 methicillin 내성 유전자인 *mecA* 검출용 primer를 제작 (Table 1)하였다(최성화 등, 2008).

PCR을 위한 PCR 혼합액은 dNTP(각기 2.0 mM) 2 uL, 10× PCR buffer 2 uL, primer 1쌍 10 pmol 각각 1 μL, template DNA 2 μL, Taq DNA polymerase (1 unit) 1 μL, 25 mM MgCl2 2 uL로 하여 증류수 9 uL를 첨가한 후 최종 용액을 20 uL로 했다. DNA thermal cycler (MGL96+, LongGene)에서 95°C에서 1분간 변성(denaturation), 55°C에서 1분간 접합(annealing), 72°C에서 1분간 확장(extension)의 순서로 30회를 시행 하였다.

PCR 증폭산물을 1.0% agarose gel에 Red safe (iNtRON biotechnology, Korea) 0.05 μL/mL을 넣어 1× TAE buffer에서 100 volt로 30분 동안 전기영동(Mupid-ex, Advance, Japan)을 실시한 다음, agarose gel을 UV transilluminator (WGD-30, DAIHAN SCIENTIFIC, Korea)로 관찰하고, WiseDoc이미지 분석 장치(WGD-30, DAIHAN SCIENTIFIC, Korea)로 사진 촬영하였다.

결 과

1. 코 안 아래 부위와 휴대전화에서 *S. aureus*와 MRSA의 분리

2011년도 6월과 9월 사이에 마산의 대학생 213명의 코안 아래 부위에서 *S. aureus*의 보균율은 49.3% (105주)이었고, MRSA는 40.3% (86주)를 보였다. 한편 220명의 휴대전화에

서는 *S. aureus*는 66.3% (146주), MRSA는 44.1% (97주)의 높은 보균율을 보였다(Table 2, Fig. 2)

Table 2. Isolation frequency of *S.aureus* and MRSA using MSO by source

	<i>S. aureus</i> (%)	MRSA(%)
Nasal cavity inferior (n=213)	105(49.3)	86(40.3)
Cellular phones (n=220)	146(66.3)	97(44.1)

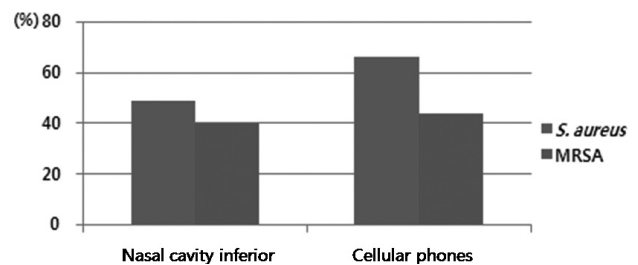


Fig. 2. Isolation rate of MRSA & *S. aureus* from nasal cavity inferior and cellular phones. Isolation rate of MRSA & *S. aureus* from nasal cavity inferior and cellular phones.

2. PCR을 이용한 16S rRNA 유전자와 *mecA* 유전자 검출

코안 아래 부위에서 분리된 MRSA 86주중 16S rRNA 유전자 양성주는 93.0% (80주), 16S rRNA 유전자 음성주는 7% (6주)이었다. 16S rRNA 유전자 양성주 80주 중 *mecA* 유전자 양성은 92.5% (74주), *mecA* 유전자 음성은 7.5% (6주)이었다. 한편 휴대전화에서 분리된 MRSA 97주중 16S rRNA 유전자 양성주는 92.8% (90주), 16S rRNA 유전자 음성주는 7.2% (7주)이었고, 16S rRNA 유전자 양성주 90주 중 *mecA* 유전자 양성은 91.1% (82주), *mecA* 유전자 음성은 8.9% (8주)를 보였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Isolation frequency of MRSA using 16S rRNA, *mecA* primer by PCR

	16S rRNA detected No.(%)	16S rRNA Undetected No.(%)	<i>mecA</i> detected No.(%)	<i>mecA</i> Undetected No.(%)
Nasal cavity inferior (n=86)	80(93.0)	6(7.0)	74(92.5) (n=80)	6(7.5)
Cellular phones (n=97)	90(92.8)	7(7.2)	82(91.1) (n=90)	8(8.9)

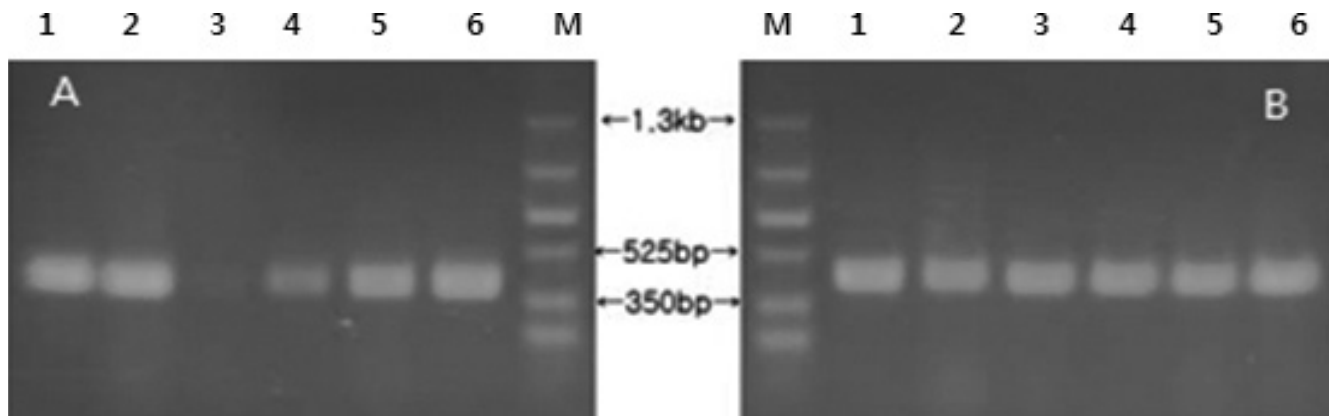


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of PCR products with isolated strains of MRSA (A1-6; *mecA* gene, B1-6; 16S rRNA gene for *S. aureus*, Lane M; size marker)

고 찰

지역사회 MRSA(community-acquired MRSA, CA-MRSA)감염에 관한 다양한 증례들이 외국에서는 보고되고 있지만 국내에서의 보고는 드물고 경남 창원에서 집단적인 환자 발생보고가 알려져 있다(Jevons, 1961; Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Fergie and Purcell 2001; Naimi *et al*, 2003; Miller *et al* 2005). 국내에서의 CA-MRSA 감염증이 흔하지는 않은 것으로 보고되지만 감염병 소로는 피부 및 연부조직 감염증과 중이염, 외이염 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(송 등, 2006). 병원소로서 MRSA가 분포되어 있더라도 그것이 곧 병원감염이나 지역사회 감염으로 직결되는 것은 아니라고 보며(Buckingham *et al*, 2004) 2006년 국내 다기관에서 CA-MRSA에 대한 빈도조사 보고에 의하면 전체 MRSA 중 CA-MRSA는 6.0%로 보고되

었다(송 등, 2006). 하지만 외국의 보고는 18.2%에서 51.2%까지 다양하여 MRSA에 대한 지역사회감염의 위험요소로서의 중요성을 강조하고 있다(Layton *et al*, 1995; Hussain *et al*, 2000; Warshawsky *et al*, 2000).

본 연구에서 oxacillin 내성 검사를 통한 phenotype 검사와 분자생물학적 확인을 통해 대학생 213명의 코안 아래 부위에서 34.7%인 74명으로부터 MRSA를 분리하였고 휴대전화 220개에서 37.2%에 해당하는 82개의 휴대전화에서 MRSA를 분리하였다. 코안 아래부위와 휴대전화의 Phenotype 검사에서 각각 MRSA로 선별된 80균주, 90균주 중 16S rRNA 유전자에서 각각 음성을 보인 6개, 7개의 균주는 *S. aureus*가 아닌 것인지 많은 검체를 처리하다 생긴 PCR 오류인지 확인이 필요 할 것으로 생각된다. *mecA* 유전자 검사에서 검출되지 않은 코안 아래부위 6균주, 휴대전화 8균주는 선별검사를 시행한 MSO에서 내성을 보이고 16S rRNA에

서는 *S. aureus*로 확인된 것으로 보아 oxacillin과 methicillin에 대한 내성 양상이 다른 균으로(예를 들면 oxacillinase 생성균주) 추정되며 좀 더 상세한 원인 규명이 필요 할 것으로 생각된다. 실제로 oxacillin과 methicillin에 대한 내성이 100% 일치하지 않는다고 보고되고 있다.

대다수 국내 보고는 코안 부위에서 30-35% 정도 MRSA 분리를 보고하고 있어 본 연구와 큰 차이를 보이지는 않았다(송 등, 2006). 휴대전화에서의 MRSA 분리에 대한 보고는 많지 않으며 최근에 병원감염과 지역사회감염에 대한 관심이 높아지면서 병원에 근무하는 의료종사자들의 가운이나 넥타이 등에 서식하는 MRSA에 대한 문제가 대중매체를 통해 보도되기도 하였다. 본 연구에서 대학생의 필수 소지품인 휴대전화로부터 MRSA의 분리율이 37.2%에 달하는 것은 병원감염과 지역사회 감염의 위험요소로서 중요성을 시사하고 있다. 비록 코안 부위와 휴대전화에 MRSA의 분포가 병원감염과 지역사회감염으로 직결되는 것은 아니지만 그 분포율이 높다는 것은 감염관리 측면에서 그 위험성을 내포하고 있다고 생각되며 외국에 비해 감염증례가 없다고는 하지만 철저한 예방만이 감염관리의 초석임을 고려한다면 손 씻기와 병행하여 필수 소지품인 휴대전화의 청결관리 역시 중요한 요소로 강조 되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Akcam FZ, Tinaz GB, Kaya O, Tigli A, Ture E, Hosoglu S. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. *Microbiol. Res.* 2009, 164:400-403.
2. Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK, et al. Emergence of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J.* 2004, 23:619-624.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota. *JAMA.* 1999, 282:1123-1125.
4. Chambers, HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10:781-791.
5. Fergie JE, Purcell K. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in south Texas children. *Pediatr Infect Dis J.* 2001, 20:860-863.
6. Francis AW. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome) . In: Francis AW, Mandell Douglas and Bennetts Principles and Infections Disease. 4th eds, 1995, p1754-1755. Churchill Livingstone.
7. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, Harriman K, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med.* 2005, 352:1436-1444.
8. From the Korea Center for Disease Control and Prevention. Increased in Staphylococcal Scaled Skin Syndrome, Gyeong-sangnam-do. *CDMR.* 2005,16:29.
9. Georgopapadakou NH, Smith SA, Bonner DP. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982, 22:172-175.
10. Han SJ, Jung HG, Kim EH, Hwang EH, Seong IW. Multi intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. *J Pediatr surg.* 1999, 34:381-386.
11. Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J.* 2000, 19:1163-6.
12. Jevons M. Celbenin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1961, 1:124-125.
13. Kim YJ, Jeon DS, Kim JR. Molecular epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *Korean J. Clin. Pathol.* 2001, 21:122-128.
14. Layton MC, Hierholzer WJ, Jr., Patterson JE. The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995, 16:12-17.
15. Lee HJ, Kim YS, Kim JS, Cho YH, Lee KG, Suh JT, et al. A study of *mecA* and *femA* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens. *Korean J. Clin. Pathol.* 2001, 21:45-48.
16. Maidhof H, Reincke B, Blumel P, Berger-Bachi B Labischinski H. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affect glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol.* 1991, 173: 3507-3513.

17. Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med*. 2005, 352:1445-1453.
18. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*. 2003, 290:2976-2984.
19. Park SH, Jang YH, Sung H, Kim MN, Kim JS, Park YJ. Performance evaluation of BD gene Ohm MRSA PCR assay for detection of nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at endemic intensive care units. *Korean J. Lab. Med*. 2009, 29:439-447.
20. Warshawsky B, Hussain Z, Gregson DB, Alder R, Austin M, Bruckschwaiger D, et al. Hospital- and community-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: previous hospitalization is the major risk factor. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000, 21:724-727.
21. 송진수, 최평균, 송경호, 조재현, 김성한, 방지환, 등. 국내다기관에서 조사한 지역사회획득 메티실린 내성 황색 포도알균의 빈도와 임상적 증상. 감염과 화학요법. 2006, 38:352-333.
22. 이영진, 김현진, 변신연, 박수은, 박희주. 신생아의 MRSA 균혈증에서 합병증 발생과 연관된 위험인자. *Korean Journal of Pediatrics*. 2010, 53:173-177.
23. 최성화, 박은희, 박연경, 김정아, 김남호, 이영숙, 등. 부산지역 실사환자에서 분리한 MRSA 균주의 다양성 분석. 생명과학회지. 2008, 18(8): 1083-1089.