

The Correlation between Toxin Genotype and Antibiotic Resistance in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimen of Intensive Care Unit

Chul Park¹, Chi Nam Seong²¹Department of Clinical Laboratory Science, Gwangyang Health Science University, Gwangyang 57764, Korea²Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

중환자실의 임상검체로부터 분리된 Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*의 독소유전자형과 항생제내성의 상관관계

박 철¹, 성치남²¹광양보건대학교 임상병리과, ²순천대학교 생물학과

This study is aimed to determine the correlation between the toxin gene types and antibiotic resistance from MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Fifty-two strains of MRSA, between January 2014, and December 2014, were isolated from clinical specimens obtained from 2,664 cases in the intensive care unit of a hospital in Suncheon, Jeonnam, Korea. Genes encoding *mecA*, 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. Toxin genes (*seg* and *sei*) were present in 40 strains (76.9%), followed by *tst* in 34 strains (65.4%). Other genes (*eta*, *etb*, *sea*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, and *pvl*) were not detected. Forty strains (76.9%) of MRSA had 2 or more toxin genes simultaneously; 5 coexistent toxin-genes (*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*) were the most common in 28 strains (53.8%), and 6 strains (11.5%) had *seg* and *sei* genes. The coexistence of genes were 72.5~100%, showing a high correlation among genes (*seb*, *sec*, *seg*, *sei* and *tst*). As strains (*seb*, *sec*, *tst*) that had particular toxin genes (*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*) in multiple showed 100% resistance to ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, we were able to find that *seb*, *sec*, and *tst* genes have a close relationship to the aforementioned antibiotics. It showed a higher resistance to ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, and tetracycline compared with strains that had toxin genes independent from multiple toxin genes.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Intensive care unit, Toxin gene

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2016 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Corresponding author: Chul Park
Department of Clinical Laboratory Science,
Gwangyang Health Science University,
Gwangyang 57764, Korea
Tel: 82-61-760-1443
Fax: 82-61-760-9009
E-mail: pcggs11070417@gy.ac.kr

Received: May 9, 2016
Revised 1st: June 9, 2016
Revised 2nd: June 11, 2016
Revised 3rd: July 1, 2016
Revised 4th: July 3, 2016
Accepted: July 3, 2016

서 론

MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)는 일반적으로 모든 penicilline계, cephalosporin계, carbapenem계 및 β -lactam 혼합제에 대하여 내성을 나타내어 항생제 감수성검사 결과가 감수성으로 나올지라도 모두 내성으로 나타나기 때문에 사용 가능한 항생제는 극히 제한적이다. 1961년 MRSA가 처음으로 보고된 후[1] 꾸준히 발생률이 증가하고 있으며, 실제로 미국 중심정맥관 관련 혈류 감염(central line-associated bloodstream infections, CLABSI) 연구에 따르면, 미국 중환자실에서 MRSA 관련 감염률은 1997년 48%에서 2007년 65%로 증가했음을 확인할 수 있다[2]. 국내에서도 1980년 3차병원에서 분리된 *S. aureus*의 25%를 차지하고, 1990년에는 점차적으로 증가하여 54%, 2000년에는 70%를 보였으며[3] 2005년과 2007년에 한국 내성·세균조사단(Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance, KONSAR)의 발표에 의하면 전국적으로 임상 분리균주의 MRSA 비율 또한 이차, 삼차병원 모두에서 70% 전후의 결과를 보여주고 있다[4]. 1998년 전국 15개 종합병원의 의료관련감염률 조사한 연구에서는 일반병동 분리주의 68.4%가 MRSA인데 비해 1990년대 이미 중환자실(intensive care unit, ICU)의 MRSA 비율은 90% 이상이었으며 2007~2008년 전국병원감시체계(Korean Nosocomial Infection Surveillance System, KONIS) 자료에서도 적극적인 감염관리활동으로 점차 감소하였으나 89.7% 분리율로 여전히 세계 최고 수준의 내성율을 보이고 있다[5,6]. 또한 항생제 감수성검사에서도 β -lactam제제 이외의 다른 약제에도 다양한 내성을 획득함과 동시에 균주에 따라 병원성을 나타내는 독소유전자를 다양하게 갖고 있다[7]. 즉, 발열, 발적, 혈압 저하로 인한 장기에 장애등을 일으켜 toxic shock syndrome과 같은 치명적인 질환을 유발하는 독성 쇼크 증상독소-1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) [8,9]와 백혈구를 파괴하는 백혈구 용해 독소 (Panton-Valentine leukocidin, PVL) 및 피부박탈효소인 exfoliative toxin A와 B (*eta*, *etb*)가 있다. 또한 위장관성 독소로 작용할 뿐 아니라 알러지 및 자가 면역성 질환에 관여하는 장독소 (enterotoxin, SE)가 있으며 항원성 차이에 의해 5종류의 주요 혈청형(SEA, SEB, SEC, SED, SEE)을 포함하여 SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO 등 19종류가 밝혀져 있다[10-12]. 이러한 균주들이 중환자실에서 감염 전파로 원내 폐렴의 발병률이 높게 나타남으로서 높은 사망률과 심각한 합병증을 나타낼 수 있어 중환자실 내에서의 MRSA에 대한 효과적인 병원 감염관리는 매우 중요하다 할 수 있다[13]. 본 연구의 목적은 *S. aureus*의 다양한 독소유전자중 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), Panton-Va-

lentine leukocidin (PVL), exfoliative toxin A와 B (*eta*, *etb*), 및 Enterotoxin (*se*)인 *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*를 포함하여 모두 13종류의 독소 유전자에 대한 specific primer를 이용해 Multiplex PCR을 실시하여 독소유전자의 다양성과 항생제 감수성검사 결과와의 연관성을 조사 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

2014년 1월부터 12월까지 전라남도 순천의 일개 종합병원 중환자실에서 의뢰된 2,664건의 환자 가검물로부터 MRSA 균주를 분리하였다. Muller-Hinton agar (MHA)에서 oxacillin 항생제 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경이 10 mm 이하인 균주를 선별하는 디스크 확산법으로 CLSI M100-S19 지침[14]에 따라 MRSA를 1차 판정하였으며 자동화 기기인 Vitek automated system (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA)의 AST-P601 카드를 이용한 최소억제 농도(MIC)가 4 μ g/mL 이상임을 확인 하였으며 이때 동일 환자로부터 반복 분리된 MRSA 균주는 제외하였다. 분리된 균주의 계대배양은 trypticase soy agar (TSA, Becton Dickinson) 배지를 이용하였으며 균주의 보존은 20% glycerol을 이용하여 -20°C 에 냉동 보관하였다.

2. 독소 유전자 유형 분석을 위한 Genomic DNA 추출

TSA 배지에 순수배양에서 자란 단일 집락 1 loop 2 mg을 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS] 100 μ L와 2 small spoon (0.5 g)의 glass bead (size: 0.4 mm) 혼합체에 넣고 10분간 TOMY mixer (Tomy, Seiko, Japan)에 혼합하고, 1 \times TE buffer 200 μ L와 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 300 μ L를 넣고, 3분간 TOMY mixer에 다시 혼합한 후 원심분리(12,000 rpm, 4 min) 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 RNase A 20 mg/mL 3 μ L을 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에 30분간 배양하였고, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2 volume의 100% ice ethanol을 넣고 DNA를 침전 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 하였다. 차가운 70% ethanol로 세척한 후 건조하여 멸균된 증류수에 녹여 실험에 사용할 때까지 -20°C 에 냉동 보관하였다[10].

3. Multiplex PCR을 이용한 mecA와 독소 유전자 분석

*mecA*와 독소 유전자를 증폭하기 위해 사용한 primer는 Table 1과 같다. Primer는 3 Set (A, B, C)로 구분하여 모두 동일한 조건으로 multiplex PCR을 실시하였다. PCR 반응액은 dNTP (각 2.5

Table 1. 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	mecA-F	TCCAGATTACAACCTTACCAGG	Y00688	162	A	[11]
	mecA-R	CCACTTCATATCTTGTAAACG				
Toxic shock syndrome toxin-1	tst-F	GCTTGCACAACCTGCTACAG	J02615	559	C	[12]
	tst-R	TGGATCCGTCATTCATTGTTAT				
Panton-Valentine leukocidin	pvl-F	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCC	X72700	433	C	[15]
	pvl-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC				
Staphylococcal enterotoxins	sea-F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	M18970	521	A	[12]
	sea-R	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG				
	seb-F	ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG	M11118	667	B	[16]
	seb-R	TGCAGGCATCATGCATACCA				
	sec-F	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	X05815	284	A	[12]
	sec-R	TGCAGGCATCATATCATAACCA				
	sed-F	GTGGTGAATAGATAGGACTGC	M28521	385	A	[12]
	sed-R	ATATGAAGGTGCTCTGTGG				
	see-F	TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC	M21319	171	B	[12]
	see-R	CTCTTGCACCTTACCGC				
	seg-F	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	AF064773	328	B	[12]
	seg-R	CCAAGTGATTGTCTATTGTCG				
	seh-F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	U11702	360	C	[12]
	seh-R	GTCGAATGAGTAATCTCTAGG				
	sei-F	CAACTCGAATTTTCAACAGGTACC	AF064774	466	B	[12]
	sei-R	CAGGCAGTCCATCTCCTG				
	sej-F	CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG	AF053140	142	C	[12]
	sej-R	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC				
Exfoliative toxins	eta-F	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	M17347	93	A	[17]
	eta-R	AGATGTCCTATTTTTGCTG				
	etb-F	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG	M17348	226	C	[18]
	etb-R	GTTTTTGCTGCTTCTCTTG				

Abbreviation: F, forward; R, reverse.

Table 2. Sources of methicillin-resistant *S. aureus* obtained from intensive care unit

Sources	Sputum	Pus	Urine	Blood	Central venous catheter tip	Body fluid	wound	Total
Number of isolates	20	11	8	4	4	3	2	52

mM), MgCl₂ 2 mM, primer 각 20 pmol, *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea) 0.5 U, genomic DNA 100 ng 및 반응 완충용액(10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)에 총 부피가 50 μ L가 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR 반응은 PCR thermal cycler TP 600 (Takara Bio, Foster City, CA, USA)을 이용하였으며 PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시키고, 95°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 40초의 cycle 을 30회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 10분 동안 반응 시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 특이 밴드를 확인하였다.

4. 항생제 감수성 검사

분리균의 항생제 감수성 시험은 CLSI M100-S19 지침[14]의 방법에 따라 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 각각의 항생제가 함유된 디스크 6 mm를 사용하여 실시하였다. 혈액배지에 배양한 균을 생리식염수로 McFarland 0.5관에 맞춘 세균현탁액을 멸균된 면봉에 충분히 적신 후 MHA 배지에 접종한 후 항생제 디스크를 올려놓고 37°C incubator 에서 16~24시간 배양한 후 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경을 mm단위로 측정하여 판정 기준 표와 비교하여 감수성, 중간내성, 저항성으로 판정하였다[14]. 매 시험마다 대조 균주로 *S. aureus* ATCC 25923를 사용하였다. 최소 억제 농도(MIC)는 자동화 기기인 Vitek automated system

(bioMérieux, USA)의 AST-P601 카드를 이용 하였다.

결 과

1. 대상 균주의 검체별 분리원

2,664건의 환자 검체에서 균이 분리된 검체는 객담에서 20균주, 농 11균주, 소변 8균주, 혈액 4균주, 중심정맥관 팁 4 균주, 체액 3 균주, 창상 2균주로 총 52균주 이었다(Table 2).

2. 독소 유전자 유형 분석

독소유전자의 특이적인 primer를 사용하여 3 Set (A, B, C)로 구분하여 multiplex PCR을 실시하였다(Fig. 1). 장독소 중 *seg*와 *sei* 유전자는 각각 40 균주(76.9%)에서 확인되었고 *seb*와 *sec*는 각각 29균주(55.8%)가 보유하고 있었으며 *sea*와 *sed*, *see*, *seh*, *see* 유전자들은 검출되지 않았으며 피부 박탈성 독소 유전자 *eta*와

etb, leukocidin 독소 유전자인 *pvl* 또한 검출되지 않았다. 독성 쇼크 증상독소-1 유전자 *tst*를 보유한 균주는 34균주(65.4%)로 확인 되었으며 검체별 객담에서 가장 많이 분리된 독소유전자는 *tst*, *seg*, *sei*를 각각 19균주(95.0%)에서 보유하고 있었으며 농에서는 *seg*, *sei*를 각각 11균주(100%) 모두에서 보유하고 있었다(Table 3). 2개 혹은 그 이상의 독소 유전자를 동시에 보유한 균주들의 분포는 Table 4에 나타내었다. 40균주(76.9%)가 2개 이상의 독소 유전자를 보유하고 있었으며, 6균주(11.5%)가 2개의 독소유전자(*seg*, *sei*)를, 5균주(9.6%)가 3개의 독소유전자(*seg*, *sei*, *tst*)를, 1균주(1.9%)가 4개의 독소유전자(*seb*, *seg*, *sei*, *tst*)를, 28균주(53.8%)가 5개의 독소유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 동시에 보유하고 있었다. 독소 유전자들 간의 동시 유전자 보유율은 *tst* 유전자가 *seg*, *sei* 유전자들을 100% 동시 보유하고였고 *seb*가 *tst*, *seg*, *sei*와 *sec*가 *tst*, *seg*, *sei*와 *seg*가 *sei*와 *sei*가 *seg* 유전자를 100% 동시 보유하였다. *seb*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자들 사이의 동시보유율은 *seg* 또

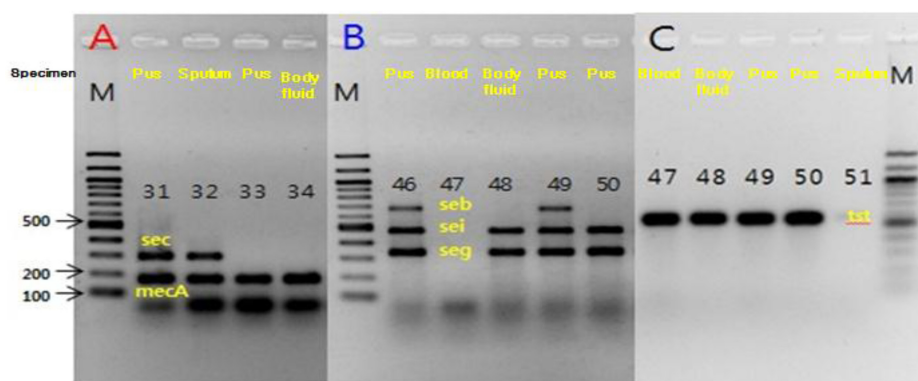


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the multiplex PCR amplification products from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* intensive care unit isolates. Lanes M, 1 kb plus DNA ladder; lanes 31~34, primer set A; lanes 46~50, primer set B; lanes 47~51, primer set C. Lane 31 (*mecA* and *sec*); lane 46 (*seb*, *sei* and *seg*); lane 47 (*tst*).

Table 3. Frequency of toxin genes detected in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Toxin gene	Primer	MRSA							Total
		Sputum (n=20)	Pus (n=11)	Urine (n=8)	Blood (n=4)	Tip (n=4)	Body fluid (n=3)	wound (n=2)	
Toxic shock syndrome toxin-1	<i>tst</i>	19	8		2	2	2	1	34
Panton-Valentine leukocidin	<i>pvl</i>								
Staphylococcal enterotoxin	<i>sea</i>								
	<i>seb</i>	15	7		2	2	2	1	29
	<i>sec</i>	14	8		2	2	2	1	29
	<i>sed</i>								
	<i>see</i>								
	<i>seg</i>	19	11		2	3	3	2	40
	<i>seh</i>								
Exfoliative toxin	<i>sei</i>	19	11		2	3	3	2	40
	<i>sej</i>								
	<i>eta</i>								
	<i>etb</i>								

Abbreviation: Tip, Central venous catheter tip.

Table 4. Combination of toxin genes detected in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit

Specimen Toxin gene	Sputum (n=20)	Pus (n=11)	Urine (n=8)	Blood (n=4)	Tip (n=4)	Body fluid (n=3)	wound (n=2)	Total (n=52)
<i>seb, sec, seg, sei, tst</i>	14	7		2	2	2	1	28
<i>seb, seg, sei, tst</i>	1							1
<i>seg, sei, tst</i>	4	1						5
<i>seg, sei</i>		3			1	1	1	6
None	1		8	2	1			12

See Table 3.

Table 5. Coexistence of toxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit

Toxin genes	<i>tst</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>
<i>tst</i>	-	29/29 (1.000)*	29/29 (1.000)	34/40 (0.850)	34/40 (0.850)
<i>seb</i>	29/34 (0.853) [†]	-	28/29 (0.966)	29/40 (0.725)	29/40 (0.725)
<i>sec</i>	29/34 (0.853)	28/29 (0.966)	-	29/40 (0.725)	29/40 (0.725)
<i>seg</i>	34/34 (1.000)	29/29 (1.000)	29/29 (1.000)	-	40/40 (1.000)
<i>sei</i>	34/34 (1.000)	29/29 (1.000)	29/29 (1.000)	40/40 (1.000)	-

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

[†]The rate of existence of a gene of column (*seb*) in the strains harboring a gene of row (*tst*).

Table 6. Antibiotic resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit

Specimen Antibiotics	MRSA							
	Sputum (n=20)	Pus (n=11)	Urine (n=8)	Blood (n=4)	Tip (n=4)	Body fluid (n=3)	wound (n=2)	Total (n=52)
Amox/kClav	20	11	8	4	4	3	2	52 (100.0)
Ampicillin	20	11	8	4	4	3	2	52 (100.0)
Benzylpenicillin	20	11	8	4	4	3	2	52 (100.0)
Ciprofloxacin	20	8	5	4	3	2	1	43 (82.7)
Clindamycin	20	11	8	3	3	2	1	48 (92.3)
Daptomycin	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)
Erythromycin	20	11	8	3	3	2	1	48 (92.3)
Fusidic Acid	12	1	6	3	3	2	1	28 (53.8)
Gentamicin	3	6	3	2	0	1	0	15 (28.8)
Habekacin	0	0	1	0	0	0	0	1 (1.9)
Imipenem	20	11	8	4	4	3	2	52 (100.0)
Linezolid	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)
Mupirocin	1	4	1	2	0	0	0	8 (15.4)
Quinu/Dalfo	0	0	1	0	0	0	0	1 (1.9)
Rifampin	2	0	2	0	0	0	0	4 (7.7)
Teicoplanin	0	0	0	1	0	0	0	1 (1.9)
Telithromycin	20	6	7	3	3	3	2	44 (84.6)
Tetracycline	14	8	6	3	3	2	1	37 (71.2)
Tigecycline	0	0	1	0	0	1	0	2 (3.8)
Trimeth/Sulfa	0	0	1	1	0	0	0	2 (3.8)
Vancomycin	0	0	2*	0	0	0	0	2 (3.8)

Abbreviation: Amox/kClav, amoxicillin/clavulanic acid; Quinu/Dalfo, quinupristin/ dalfopristin; Trimeth/Sulfa, trimethoprim/sulfamethoxazole; Tip, Central venous catheter tip.

*vancomycin resistance is intermediate. Number of resistant strains is expressed.

는 *sei* 보유균주가 *seb* 또는 *sec*를 동시에 보유한 비율인 72.5%에서 *sei* 보유균주가 *seg*를 동시에 보유한 비율인 100%에 달했다(Table 5).

3. 항생제 감수성

분리된 MRSA 52균주의 항생제 내성 양상은 amoxicil-

Table 7. Correlationship between toxin genes and antibiotic resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit

Antibiotics/Toxin gene	Ciprofloxacin	Clindamycin	Erythromycin	Gentamicin	Tetracycline
Total (n=52)	82.7	92.3	92.3	28.8	71.2
Individual type					
<i>seb</i> (n=29)	100	100	100	27.6	79.3
<i>sec</i> (n=29)	100	100	100	27.6	79.3
<i>seg</i> (n=40)	85.0	92.5	92.5	25.0	72.5
<i>sei</i> (n=40)	85.0	92.5	92.5	25.0	72.5
<i>tst</i> (n=34)	100	100	100	25.0	82.4
Coexisting type					
<i>seb, sec, seg, sei, tst</i> (n=28)	100	100	100	25.0	82.1
None (n=5)	60.0	60.0	60.0	0	60.0

lin-clavulanic acid, benzylpenicillin, ampicillin, imipenem은 100% 내성을 보였고 erythromycin, clindamycin 항생제에 대한 내성율은 똑같이 92.3%로 나타났다. 또한 telithromycin, ciprofloxacin, tetracycline은 각각 84.6%, 82.7%, 71.2% 내성율을 나타냈다. Daptomycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin, teicoplanin, tigecycline, vancomycin에 대한 내성은 없었다 (Table 6).

4. 독소 유전자형 MRSA의 항생제 내성 분석

독소유전자형에 따른 MRSA의 항생제 내성 양상은 *seb, sec*와 *tst* 유전자 보유 균주들은 ciprofloxacin, clindamycin과 erythromycin에 대한 항생제 내성율이 100%를 보였고, *seg, sei*를 보유한 균주들 또한 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, tetracycline 항생제에 각각 85.0%, 92.5%, 92.5%, 72.5%로 내성을 보였다. 그리고, 5개의 독소유전자(*seb, sec, seg, sei, tst*)를 동시에 보유한 균주들도 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin에 100% 내성율을 보였고 tetracycline, gentamicin은 각각 82.1%, 25.0%의 내성율을 보였다(Table 7).

고 찰

MRSA로 인한 유행적 발생은 대부분 중환자실과 화상병동 등과 같이 면역상태가 저하되거나 병원 치료력이나 항생제 사용력이 길고 각종 침습적 치료를 실시하는 환자들이 모여 있는 특수병동에서 주로 발생하는 것으로 보고되고 있다[19].

분리된 MRSA 균주들 중 식중독을 유발한다고 알려진 5개의 독소 유전자(*sea, seb, sec, sed, see*) 외의 *seg*와 *sei* 유전자가 각각 40 균주(76.9%)로 가장 많은 보유율을 나타냈으며 다음으로 독성 쇼크 증상 독소 1 유전자 *tst*는 34균주(65.4%), 장독소 *seb, sec*는 각각 29균주(55.8%) 순으로 검출 되었으며 검체별 객담과 농으로부터

터 분리된 MRSA 균주가 혈액과 소변으로부터 분리된 MRSA에 비해 독소유전자 보유 빈도가 높음을 알 수 있었고 특이하게 소변에서 분리된 균주들은 독소유전자를 한 균주도 갖고 있지 않음을 확인하였다. 한편 피부 박탈성 독소(exfoliative toxin) 유전자 *eta*와 *etb* 그리고 장독소 *sea, sed, see, seh, sej*와 주로 피부감염이나 병원감염보다는 지역감염 환자로부터 분리되는 leukocidin 독소 *prt* 유전자는 검출 되지 않았다. 이러한 결과는 한국의 다른 병원에서 분리한 MRSA의 독소 유전자 보유율과 비교 해보았을 때 *sea* 보유율은 낮았지만, *seb*와 *sec* 보유율은 높은 결과였으며 독성 쇼크 증상 독소-1 유전자 *tst*의 보유율은 65.4%로 Kim 등[20]의 결과 43.2%보다 높은 검출율을 보였고, 또 다른 보고[21]에서 보다 *seb, sec, seg, sei, tst* 각각의 유전자 보유율이 20~30% 이상 독소 유전자수가 더 늘어 증가하고 있음을 확인하였다. 또한 최근 국외 논문 [22]과의 독소 유전자 보유율을 비교해 보았을 때 *seb, sec*와 *tst* 유전자 보유율 또한 본 연구에서 결과가 높게 분포했지만 검출되지 않았던 *sea, eta, etb* 유전자는 Sabouni 등[22]의 결과에서는 40.6%, 11.3%, 9%로 각각 검출되어 본 연구에서의 결과와 국내·외의 독소유전자 분포 양상에 차이가 있어 독소형은 지역과 시간의 흐름에 따라 분포가 다양한 것으로 생각된다.

분리된 균주들중 독소유전자를 2개 이상 동시에 보유한 조합의 MRSA는 40균주(76.9%)였으며 분포도를 살펴보면 *seb, sec, seg, sei, tst*의 5개 유전자를 동시 보유한 조합은 28균주(53.8%)를 보였으며 다음으로 *seg, sei* 유전자 동시 보유와 *seg, sei, tst* 유전자 동시 보유 조합은 각각 6균주(11.5%), 5균주(9.6%)를 보였다(Table 4). 이것은 여러 다른 보고에 의한 것과 마찬가지로 대부분의 MRSA 균주가 2~4개의 독소유전자를 동시에 보유한다[23]는 결과와 일치 하였으며, 오히려 본 연구에서는 다른 보고에 의한 것 보다 더 많은 5개(*seb, sec, seg, sei, tst*)까지의 독소유전자를 동시 보유하고 있음을 확인 할 수 있었다.

독소 유전자들 간의 동시 유전자 보유율은 *tst* 유전자가 *seg, sei*

유전자들을 100% 동시 보유하였으며 뿐만 아니라 *seb*가 *tst*, *seg*, *sei*를 *sec*가 *tst*, *seg*, *sei*를 *seg*가 *sei*를 *sei*가 *seg* 유전자들을 100% 동시 보유하고 있었다. 본 연구 결과는 특정한 독소 유전자 *seb*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자간의 상관성이 높음을 말해준다. 다른 연구자들의 보고 자료에 의한 *S. aureus*가 *tst*와 *sec* 유전자를 동시에 보유한다[24]는 사실을 본 연구에서도 확인 할 수 있었다.

한편, 분리된 MRSA 52균주의 항생제 내성율은 amoxicillin-clavulanic acid, benzylpenicillin, ampicillin, imipenem은 100% 내성을 보였고 erythromycin, clindamycin 내성율은 각각 92.3%로 같은 내성율을 보였다. 또한 telithromycin, ciprofloxacin, tetracycline은 각각 84.6%, 82.7%, 71.2%의 내성을 보였다. 이와 같은 항생제 내성의 결과는 다른 연구 결과[5]와도 거의 일치함을 확인 할 수 있었다.

특정 독소유전자 보유에 대한 항생제 내성과의 연관성을 분석한 결과 5개 독소유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 동시에 보유한 균주들과 개별적으로 독소유전자 *seb*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst*를 각각 1개씩만을 보유한 균주들은 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, tetracycline에 대한 내성율의 차이는 크지는 않았지만 독소유전자를 하나도 갖지 않은 균주들 보다는 내성율이 높게 나타났다. 그러나 gentamicin은 다른 항생제와 비교해 볼때 내성율은 훨씬 낮았으며 또한 독소유전자를 보유한 균주들은 보유하지 않은 균주들 보다 내성율은 높았지만 전체 평균 내성율과는 큰 차이가 없는 결과를 보였다. 결론적으로 독소유전자를 하나 또는 5개 독소유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 동시에 보유한 균주들과의 항생제 내성율의 차이는 독소유전자 보유 갯수와는 상관 없이 모두 내성율이 높았음을 확인하였다. 그렇지만 독소유전자를 보유하지 않은 균주들 보다는 내성율이 높게 나타났다. 그리고 5개의 독소유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 보유한 균주와 개별적 독소유전자 *seb*, *sec*, *tst* 유전자를 각각 보유한 균주의 조합에서 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin 항생제에 100% 내성을 보임으로서 공통적으로 포함된 *seb*, *sec*, *tst* 유전자와 이 항생제의 내성과는 연관이 있음을 확인 할 수 있었다. 이렇듯 독소유전자를 보유한 MRSA 균주들이 중환자실 환자들에게 감염이 된다면 효과적인 항생제 치료가 제한적이므로 내성균의 확산 방지를 위한 철저한 감염관리가 더욱 필요하다고 생각한다.

요약

본 연구는 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)로부터, 독소 유전자형과 항생제 내성의 상관 관계를 결정하는 것을 목표로 하였다. 2014년 1월~12월까지 전남 순천의 한

병원 중환자실의 임상검체 2,664건에서 얻어진 MRSA 52균주를 분리하였다. 유전자들이 암호화하고 있는 *mecA*, 장독소(staphylococcal enterotoxins; *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*), 독성 쇼크 증상독소-1 (toxic shock syndrome toxin-1; *tst-1*), 표피박탈성독소(exfoliative toxin; *eta*, *etb*), 백혈구 용해 독소(Panton-Valentine leukocidin; *pvl*)를 특이적 프라이머를 이용한 multiplex PCR로 증폭 검출 하였다. 독소 유전자 *seg*와 *sei* 유전자가 각각 40균주(76.9%)로 가장 많은 보유율을 나타냈으며 다음으로 *tst* 34균주(65.4%) 순으로 검출 되었으며 *eta*, *etb*, *sea*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*와 *pvl* 유전자들은 검출 되지 않았다. 2개 이상의 독소 유전자를 동시에 보유한 조합의 MRSA는 40균주(76.9%) 였는데 5개 유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 동시 보유한 조합이 28균주(53.8%)로 가장 많은 분포를 보였으며 다음으로 *seg*, *sei* 유전자 동시 보유 조합으로 6균주(11.5%)에서 나타났다. 유전자들 간의 동시 보유율은 72.5~100%로서 특정한 독소 유전자 *seb*, *sec*, *seg*, *sei*와 *tst* 유전자간의 상관성이 높게 나타났다. 특정 다수의 독소유전자(*seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst*)를 동시에 보유한 균주들이 개별적 독소유전자를 보유한 균주(*seb*, *sec*, *tst*)와의 항생제 내성의 상관성은 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin 항생제에 100% 내성을 보임으로서 공통적으로 포함된 *seb*, *sec*, *tst* 유전자와 이 항생제의 내성과는 밀접한 연관이 있음을 알았다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

1. Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J. 1961;124:124-125.
2. Burton DC, Edwards JR, Horan TC, Jernigan JA, Fridkin SK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. JAMA. 2009;301:727-736.
3. Kim JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Choi MS, et al. 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. 2006;56:289-295.
4. Lee K, Lee MA, Lee CH, Lee J, Roh KH, Kim S, et al. Increase of ceftazidime- and fluoroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: analysis of KONSAR study data from 2005 and 2007. Yonsei Med J. 2010;51:901-911.
5. 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.
6. Pai HJ. Nosocomial infections in intensive care unit: Epidemiology and control strategy. *Hanyang Medical Reviews.* 2011;31:153-158.
 7. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. 8th ed. Ithaca: Comstock publishing associates; 1988. p171-196.
 8. Lakshmi GJ. Mechanism of Resistance, Phenotyping and Genotyping of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. *Int J Curr Microbiol. App Sci.* 2015; 4:810-818.
 9. Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol.* 2008;57:1106-1112.
 10. Choe HN, Park C, Kim HR, Baik KS, Kim SN, Seong CN. Characteristics and antibiotic susceptibility of imipenem-resistant clinical isolates producing carbapenemase. *J Life Sci.* 2010;20:1214-1220.
 11. Oliveira DC, De Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46: 2155-2161.
 12. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3411-3414.
 13. Gerber SI, Jones RC, Scott MV, Price JS, Dworkin MS, Filippell MB, et al. Management of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the neonatal intensive care unit: a consensus statement. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27:139-145.
 14. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
 15. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-producing *staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999;29:1128-1132.
 16. LoØseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3869-3872.
 17. Lee CY, Schmidt JJ, Johnson-Winegar AD, Spero L, Iandolo JJ. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1987;169:3904-3909.
 18. Jackson MP, Iandolo JJ. Sequence of the exfoliative toxin B gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1986;167:726-728.
 19. Oh HS, Lee SE, Kim HJ, Lee HJ, Oh MD, Choe KW. Health care workers' nasal carriage and outbreak control of epidemic methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Infection.* 2001;33: 25-33.
 20. Kim YG, Lee HS, Kang SK, Chang KS, Hwang SM. Correlation between the prevalence of superantigenic toxin genes and coagulase serotypes of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Bacteriol Virol.* 2011;41:157-164.
 21. Baik KS, Ki GS, Choe HN, Park SC, Koh EC, Kim HR, et al. Toxins and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *J Life Sci.* 2011;21:257-264.
 22. Sabouni F, Mahmoudi S, Bahador A, Pourakbari B, Sadeghi RH, Ashtiani MT, et al. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates in an Iranian referral children's hospital. *Osong Public Health Res Perspect.* 2014;2:96-100.
 23. Jung HJ, Cho JI, Song ES, Kim JJ, Kim KS. PCR detection of virulence genes encoding coagulase and other toxins among clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Biotechnol.* 2005;33:207-214.
 24. Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes. *Korean J Lab Med.* 2007;27:118-123.