

대학생들의 비강으로부터 분리된 메티실린 내성 황색포도알균의 분자유전학적 특성

이은광¹, 오대환², 박소현³, 정선진³, 최연임^{3*}

¹신한대학교 통합대체의학과, ²경기도북부경찰청 과학수사과, ³송호대학교 임상병리학과

Molecular Genetic Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolated From Nasal Cavity of University Students

Lee Eun gwang¹, Oh Dae Hwan², Sunjin Jung³, Sohyun Park³, Yeonim Choi^{3*}

¹Department of integrated alternative medicine. Chiropractic, Shinhan graduate school

²Crime Scene Investigation Unit, Forensic Science Division, Gyeonggi Bukbu Provincial Police Agency

³Department of Medical Laboratory Science, Songho University

요약

최근 MRSA와 같은 항생제 내성 균주에 감염되는 사례가 점점 증가하는 추세이며, 특히 원내에서 감염되는 경우도 상당수 찾아볼 수 있다. 본 연구에서는 강원 소재 대학에 재학생들을 대상으로 병원 실습 경험 여부를 조사하고, 각각 비강 검체를 채취하여 황색포도알균인 Staphylococcus aureus 균주 및 MRSA (methicillin resistant Staphylococcus aureus)의 존재 여부를 동정하여 임상 실습 경험이 있는 학생과 MRSA 검출에 대한 관계를 확인하고자 하였다. 실험에 참여한 인원은 64명 학생으로 남학생 22명, 여학생 42명이다. 멸균된 면봉으로 비강 검체를 채취하여 수송 배지인 Thioglycollate broth로 수송한 뒤, 선택배지인 MSA(mannitol salt agar)에 접종했다. 균을 배양하여 다양한 생화학적 test 및 상용화 키트인 API Kit를 사용하여 분리 및 동정을 하였고, 최종으로 분자생물학적 방법을 사용하여 MRSA 검출 양상을 확인하였다. 64명 학생 중 Staphylococcus aureus 균주가 46명에서 검출되었으며, 46명의 검체 중에 22명에서 MRSA가 검출되었다. 22명의 학생 중에 남학생은 5명, 여학생은 17명이었으며, 15명의 학생은 최근 1년 이내에 입원, 수술력 또는 임상현장실습 등의 의료기관 관련 MRSA(HR-MRSA)로 확인되었고, 나머지 7명(%)은 CA-MRSA로 확인되었다. MRSA가 검출된 학생들의 감염경로를 확인한 결과, 평상시 의료기관 방문 여부와 임상 실습경험 등으로 비추어 볼 때 원내에서 감염되었다고 추정할 수 있으며, 임상실습에 참가하는 학생들을 대상으로 원내 감염 예방을 위한 추가적인 교육과 학생들의 적극적인 참여가 필요하다고 여겨진다.

Abstract

Staphylococcus aureus and methicillin resistant S. aureus (MRSA) is a major cause of nosocomial infections and is one of the most commonly isolated bacterial species in the hospital and continues to be an important pathogens in both community and hospital-acquires infection. The purpose of this study is to investigate the carrier rate of S. aureus and MRSA in the community and molecular genetic characteristics of these organisms. The identification of S. aureus and MRSA were done by the procedures in Murray's manual of Clinical Microbiology and antibiotic susceptibility patterns by the Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). MRSA strains were confirms by oxacillin disk diffusion method. forty-six strains (71.9%) of S. aureus were isolated from the nasal specimens of 64 students in health science university. twenty-two strains (22%) of 46 S. aureus were resistant to penicillin and oxacillin. twenty-two strains of the 46 S. aureus isolates were methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). The mecA genes in MRSA were detected by polymerase chain reaction (PCR). Community and nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus are a significant problem worldwide. There continuous epidemiological study is to investigate the prevalence of MRSA in community acquired infections.

Key Words methicillin resistant S. aureus (MRSA), mecA genes, Staphylococcus aureus

1. 서 론

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 사람의 비강에 주로 존재하며, 병원감염 및 지역

*Corresponding Author : Yeo-Nim Choi(Songho Univ.)

Email: yichoi@songho.ac.kr

Received December 07, 2021

Revised December 15, 2021

Accepted December 20, 2021

사회 감염을 일으키는 주요 원인균으로 알려져 있다[1]. 건강한 사람의 피부, 비강, 장관, 점막 등에 정상 상재균이며, 피부의 상처나 호흡기를 통하여 쉽게 인체에 감염될 수도 있다. 병원성도 강하며 피부질환, 호흡기 감염, 소아의 장염, 패혈증 등을 유발한다[2].

주요 집락 형성 부위는 비강(nasal cavity)이며, 비강 내 집락화된 *S. aureus*는 비말을 통하여 비강에서부터 인체의 다른 부위로 이동 및 정착하는 것으로 알려져 있다. 특히 포도알균속(genus)의 다양한 종(species) 가운데 황색포도알균은 세균 중 가장 병독성이 높은 것으로 알려져 다양하고 심각한 질병을 흔히 일으키기 때문에 의학적으로 가장 중요하다[3].

*S. aureus*는 항생제 남용 등으로 인하여 항생제 내성도 문제가 되고 있으며, 페니실린 및 메치실린에 내성을 가지는 메치실린 내성 황색포도알균(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)도 상당히 증가하고 있다. MRSA는 β -lactam 항생제에 강한 내성을 나타낼 뿐만 아니라 aminoglycoside와 그 외 항생제에도 내성을 나타내는 등 다제내성 MRSA 분리율의 급속히 증가하여 현재 사회적으로 심각한 보건 문제로 인식되고 있어서 이 균에 감염된 환자의 치료에도 어려움이 많다[4].

MRSA는 β -lactam 항생제에 효과가 없으며 여러 항균제에 내성을 보이는 다제내성이기에 적절한 항균제 선택 및 원내감염 관리를 위한 MRSA의 정확하고 신속한 검출은 임상적으로 중요하며 필수적이다. MRSA 검사법으로 검사실에서는 통상적으로 oxacillin 디스크 확산법을 사용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration)의 측정, agar breakpoint 방법 등의 항균제 감수성 검사법인 표현형 검사도 이용되고 있지만, 배양 시간만도 24시간이 소요되어 신속하고 정확한 결과를 기대하기는 어렵다[8-9]

최근에는 다제내성을 보이는 지역사회 관련 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA)의 발생 보고가 늘어남에 따라 이에 대

한 관심 또한 증가하고 있다[5]. MRSA 균주의 역학 그룹을 구별하기 위해 주로 의료 관련 MRSA (hospital-associated MRSA, HA-MRSA)로 최근 1년 이내에 입원 또는 수술력 등의 의료기관 관련 감염 위험 인자를 가지고 있는 의료기관 관련 MRSA라고 말하며, 사람의 피부감염, 패혈증, 폐렴 등 다양한 감염증의 원인이 되는 주요 세균으로 원내감염의 가장 대표적인 원인균이다[10]. 지역사회 관련 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA)와는 유전형의 차이가 있는 것으로 보고되었다[11]. 미국 CDC의 정의에 따르면, 입원 48시간 이내 환자의 검체에서 MRSA가 분리되는 경우와 MRSA 분리에 대한 과거력이 없는 경우, 그리고 과거 1년 동안 입원이나 장기 요양시설에 입원, 투석, 수술하지 않은 환자에서 MRSA가 분리된 경우 CA-MRSA라고 정의하고 있다[12].

본 연구에서는 대학생들의 비강에서 표본을 수집하여 *S. aureus*를 분리 배양하고, MRSA의 감별 및 분리된 MRSA의 분자유전학적 특성을 분석하기 위해 Staphylococcal cassette chromosome (SCC) typing과 complex typing을 시행하였고, 본 연구 결과를 MRSA에 의한 임상 실습에 참여하는 대학생들을 대상으로 감염관리를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1 연구대상자 및 자료수집 절차

본 연구를 위해 강원에 소재한 대학에 재학중인 학생들을 대상으로 "비강에서 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)의 분리율을 조사하고 *mecA* 유전자의 검출을 통해 교차감염의 가능성을 확인하여 교차감염의 인식과 예방 및 교육에 관한 연구기초자료"임을 사전에 설명하였다. 그리고 본 연구의 의도와 실험 전 과정에 대한 내용을 충분히 설명하고 자발적 동의를 얻어

실험을 실시하였다. 본 실험은 2020년 07월에 대학생 64명을 대상으로 비강에서 면봉을 사용하여 채취였다.

[Table 1]에서 보는 것처럼, 학년별 참여 대상자는 1학년 13명, 2학년 22명, 3학년 21명, 4학년 8명이었으며, 성별로는 남학생이 12명, 여학생이 42명이었다. 임상 실습을 경험한 학생은 29명, 임상 실습을 경험하지 않은 학생은 35명이었다.

채취한 검체는 증균배지인 Nutrient broth(Difco, Detroit, USA)에 접종하여 37°C 배양기에 16~24시간 배양하였다. 배양 후, 배지에서 자란 세균의 모양, 색을 관찰하고, 단일 집락을 대상으로 세균 동정 검사와 항생제 내성 유전자 검사를 진행하였다.

세균 동정 검사 진행을 위하여 Gram 염색을 하여 Gram 양성 알균을 구분하였다. 확인한 Gram 양성 알균은 *S. aureus* 분리를 위한 선택배지인 Mannitol Salt Agar, MSA(Difco, Detroit, USA)에 접종하여 37°C 배양기에 16~24시간 배양하였다. MSA 배지에서 Mannitol 분해능 양성을 나타내는 균은 *S. aureus*로 동정하고, *S. aureus* PCR 기법을 통하여 확인 동정하였다. MSA 배지에서 Mannitol 분해능 음성을 나타내는 Gram 양성 알균의 동정은 세균 16S rRNA 염기서열분석법을 이용하여 동정하였다.

[Table 1] General characteristics of participants
 [표 1] 연구 대상자의 일반적 특성 (N = 64)

university year	participants
the first year of university	13(20.3)
the second year of university	22(34.4)
the third year of university	21(32.8)
the fourth year of university	8(12.5)
total	64

2.2 항균제 감수성 시험

항생제 감수성 검사는 Clinical and

Laboratory Standards Institute(CLSI)의 기준에 따라 디스크 확산법(Disc diffusion method)로 실시하였다. 혈액 배지에 배양한 균을 생리 식염수로 McFarland 0.5관에 맞춘 세균 현탁액을 멸균된 면봉에 충분히 적신 후 Muller-Hinton (MHA) 배지에 접종 후 항생제 디스크를 올려놓고 35°C incubator에서 24시간 배양한 후 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경을 mm 단위로 측정하였고 항생제 판정은 CLSI 기준을 따랐으며, 매 시험마다 대조 균 주로 *S. aureus* ATCC 25923를 사용하였다[12].

최소억제 농도(MIC) 검사는 자동화기기인 Vitek II automated system (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA) AST-P601 카드를 사용하여 항생제 감수성 검사를 하였다. Oxacillin에 대한 MIC 판정기준은 4 μ /ml 이상을 사용하였다.

2.3 MRSA 균주로부터 핵산분리

분자유전학적 분석을 위하여 분리한 단일 집락으로부터 genomic DNA(gDNA)를 추출하였다. 배지에서 배양한 세균의 단일 집락을 백금으로 취한 후 5% Chelex® Resin(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)용액 200 μ L에 혼탁시킨 후, 10분간 끓인 후 식힌다. 3,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 새로운 멸균튜브에 옮긴 후 사용하기 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

2.4 분자유전학적 분석

선택배지인 MSA에서 양성을 나타낸 균들의 단일 집락을 이용하여 MRSA (*mecA*)-specific PCR과 SCC*mec*을 수행하기 위해 Prime Taq Premix (GeNet Bio, Daejeon, Korea) 10 μ L와 Forward 및 Reverse primer를 각각 10 pmol, 추출한 gDNA를 주형 DNA로 1 μ L, 멸균증류수 7 μ L를 첨가하여 총 20 μ L의 혼합액을 만들어 Multiplex PCR을 수행하였다. [Table 2]에서 보는 것처럼, primer의 염기서열은 기존 연구자료의 방법에 따라 시행하였다[14-15].

[Table 2] Specific primer sets used for subtyping of SCCmec type in subtypes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate

[표 2] MRSA SCCmec 아형을 확인하기 위한 염기서열

Target gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>mecA</i>	mecA-F	GTG AAG ATA TAC CAA GTG AT
	mecA-R	ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T
SCC type I	F	GCT TTA AAG AGT GTC GTT ACA GG
	R	GTT CTC TCA TAG TAT GAC GTC C
SCC type II	F	CGT TGA AGA TGA TGA AGC G
	R	CGA AAT CAA TGG TTA ATG GAC C
SCC type III	F	CCA TAT TGT GTA CGA TGC G
	R	CCT TAG TTG TCG TAA CAG ATC G
SCC type IVa	F	GCC TTA TTC GAA GAA ACC G
	R	CTA CTC TTC TGA AAA GCG TCG
SCC type IVb	F	TCT GGA ATT ACT TCA GCT GC
	R	AAA CAA TAT TGC TCT CCC TC
SCC type IVc	F	ACA ATA TTT GTA TTA TCG GAG AGC
	R	TTG GTA TGA GGT ATT GCT GG
SCC type IVd	F	CTC AAA ATA CGG ACC CCA ATA CA
	R	TGC TCC AGT AAT TGC TAA AG
SCC type V	F	GAA CAT TGT TAC TTA AAT GAG CG
	R	TGA AAG TTG TAC CCT TGA CAC C

MRSA (*mecA*)-specific PCR의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 과정 후 denaturation 과정 94°C에서 30초, primer annealing 과정 50°C에서 30초, extension 과정 72°C에서 30초 과정으로 40 cycle 반복하고 final extension 과정 72°C 10분 반응하였다.

DNA 전기영동을 통해 Multiplex PCR 증폭 산물을 확인하고 분석하였다. 완료된 PCR 산물을 1.5% agarose/ TBE gel의 각 well에 분주하여 100 V, 20 min 전기영동 시행 후 100 bp DNA ladder marker (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)와 비교하여 결과를 확인하였다. 각각의 개별적인 PCR 증폭 반응은 SCC유형과 complex 유형의 특이적인 loci에 대해 각각의 증폭산물의 크기에 상응하는 별개의 밴드를 생성하였다.

3. 결과

3.1 대학생들의 비강에서 황색포도알균과 MRSA의 분리빈도

학생들의 코의 비강에서 분리 배양된 검체 64개 중 황색포도알균은 46개가 나왔고, *mecA* 유전자 내성인 MRSA는 22개가 양성 이 나왔다. 성별로 나누어 봤을 때는 남학생 22명 중 13명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, 5명이 MRSA 양성 이 나왔다. 여학생은 42명 중 33명이 황색포도알균 양성 이 나왔고 17명이 MRSA 양성 이 나왔다. 학년별로는 1학년 13명 중 7명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, MRSA에는 2명이 나왔다. 2학년은 22명 중 13명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, MRSA는 5명이 나왔고, 3학년은 21명 중 18명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, 12명 중 5명이 MRSA 양성 이 나왔다. 4학년 8명 중 8명이 모두 황색포도알균 양성 이 나왔고, 8명 중 3명이 MRSA 양성 이 나왔다. 병원실습 여부로 나누어 봤을 때는 최근 1년 이내 임상실습경험이 있는 학생은 29명 중 26명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, 26명 중 15명이 MRSA 양성 이 나왔다. 최근 1년 이내에 임상실습경험이 없는 학생 35명 중 20명이 황색포도알균 양성 이 나왔고, 35명 중 7명이 MRSA 양성 이 나왔다.

3.2 *mecA* 유전자 검출률 및 SCCmec의 분포

전통적인 미생물학적 방법을 통해 학생들의 코의 비강에서 분리 배양된 황색포도알균과 MRSA 22주의 분리균주를 대상으로 *mecA* 유전자의 보유 여부를 확인하기 위해 *mecA* PCR 분석을 실험한 결과, 분리된 MRSA 22주는 모두 *mecA* 유전자를 보유하고 있음을 확인하였다. [Table 3]에서 Multiplex PCR을 실시하여 분석한 결과, 비강에서 분리된 MRSA 총 22주 중 12주가 SCC type II, 1주가 type IVa, 9주가 아형 분석의 확인이 어려웠으며, 2주가 SCC type II/type IVa, 1주가 SCC type II/type V로

확인되었다.

[Table 3] Typing of Staphylococcal cassette chromosome(SCCmec) and complex from nasal cavity of university students

[표 3] Multiplex PCR을 실시하여 SCCmec의 분포율을 분석한 결과

Strain	MRSA (meA)	SCCmec types								
		I	II	III	IVa	IVb	IVc	IVd	V	
MRSA-1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MRSA-11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MRSA-12	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MRSA-13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MRSA-14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRSA-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

국내 의료기관에 나타나는 HA-MRSA는 다양한 유전형이 혼재되어 있고, SCC type II가 45%로 가장 흔하지만 다른 아형이 혼재되어 있는 것으로 보고된 바 있다. 대부분의 HA-MRSA는 SCC typing 분석 결과 SCC type II형 또는 III형이 우세하고, CA-MRSA 감염의 경우 SCC type IV형 또는 V형의 균주가 우세한 것으로 알려져 있다[16].

대학생들의 비강에서 분리된 MRSA는 SCC typing 결과 그 기원이 서로 다른 것으로 나타났으나, 환경 내의 MRSA가 환자에게 전파되었을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이후 추가적인 연구를 통해 좀 더 많은 학생들을 대상으로 추적조사를 실시한다면 대학생들의 임상실습 경험을 하기전에 감염관리와 관련한 더욱 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] GL. Archer and CG. Mayhall, 'Comparison of epidemiologic markers used in investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections', *Journal of Clinical Microbiology*, vol.18, no.2, pp.395-399, 1983.
- [2] AC. Barid-Parker, 'The classification of Staphylococci and their classification', *Microbiology society*, vol.5, 1965.
- [3] H-C Park, J-S Kim, J-H Kim, J-Y Lee, J-W Lim, Y-K Kim and S-H Kim, 'Molecular Subtyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients' Nasal Cavity', *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, vol.52, pp.128-135, 2020.
- [4] RE Williams, 'Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance', *American Society Microbiology*, Vol.27, pp.57-71, 1963.
- [5] HF Chambers, 'Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications', *Clinical Microbiology Review*, vol.10, no.4, pp.781-791, 1997.
- [6] Y-M Kim, C-E Oh, S-H Kim, J Lee, E-H Choi and H-J Lee, 'Nasal carriage of *S. aureus* from healthy children attending day care center', *Korean Journal of Pediatric Infectious Diseases*, vol.17, pp.9-15, 2010.
- [7] Fontana R, 'Penicillin-binding proteins and the intrinsic resistance to β -lactamase in gram-positive cocci', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.16, pp.412, 1985.
- [8] M Barber, 'Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci', *Journal of general microbiology*, vol.35, pp.183, 1964.
- [9] Sutherland R, 'Characteristics of methicillin-resistant staphylococci', *Journal of Bacteriology*, vol.87, pp.887, 1964.
- [10] C Berglund, P Molling, L Sjoberg and B Soderquist, 'Predominance of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC) type IV(MRSA) in a among methicillin-resistant Swedish county and presence of unknown SCC types with Pantone-Valentine leukocidin genes', *Clinical Microbiology and*

Infection, vol.11, p.447–456, 2005.

[11] E Patrozou, K Reid, J Jefferson and LA Merme l, 'A cluster of community-acquired methicillin-resistant infections in hospital security guards', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol.30, pp.386–388, 2009.

[12] FD Lowy, 'Staphylococcus aureus infections', *the New England journal of medicine*, vol.339, pp.520, 1998.

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

[14] DC Oliveira and HD Lencastre, 'Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.46, pp.2155–2161, 2002.

[15] K Zhang, JA McClure, S Elsayed, T Loue, JM C only, 'Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome types I to V in methicillin-resistant *S. aureus*', *Journal of Clinical Microbiology*, vol.43, p p.5026–5033, 2005.

[16] K Okuma, K Iwakawa, JD Turnidge, WB Grubb, JM Bell, FG Obrien, GW Coombs, 'Dissemination of new methicillin-resistant clones in the community', *Journal of Clinical Microbiology*, vol.40, pp.4289–4294, 2002.