

설사변에서 분리된 MRSA의 PFGE를 이용한 분자생물학적 분석

최성화[†] · 박은희 · 박연경 · 김정아 · 김남호 · 이영숙

미생물과

Molecular Biological Studies of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Stool Samples

Seung Hwa Choi[†], Eun Hee Park, Yon Koun Park, Joung A Kim, Nam Ho Kim and Young Suk Lee

Microbiology Division

Abstract

We investigated the molecular epidemiological characteristic of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from stool samples in Busan from 2004 to 2006. Among 142 isolates of *S. aureus*, 49 isolates (34.5%) were confirmed as MRSA. With the antimicrobial susceptibility tests, 37 isolates (75.5%) showed multiple resistance to more than 10 antibiotics, but all isolates were sensitive to vancomycin. All of MRSA had enterotoxin A in 30.6%, B 4.1%, C 8.3%, D, C/G, A 2.0% and None 51%. PFGE of *Sma* I-digested chromosomal DNA was performed on 49 sporadic MRSA isolates. Restriction fragment patterns consisted of 8 to 14 fragments ranged in size from 48.5 to 630.5kbp. We could divided on isolates into 7 groups (I ~ VII) by analyzing PFGE patterns. Group I subdivided as 2 subgroups and 17 (34.7%) strains belong to the group I. Dendrogram of PFGE patterns showed that MRSA strains in Busan were heterogeneous but we could find out minor homogeneity in hospital.

Key Words : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Antimicrobial susceptibility, *mecA* gene, Enterotoxin, PFGE

서론

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성균 중 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 건강한 성인의 비강 내에서 약 40%가 발견되며, 비강이나 피부 등에서 다른 사람에게 전파되며, 흔히 수술부위감염, 폐렴 등 병원 내 감염증을 잘 일으키는 균으로써, 유아에서 장염을 일으키고 이차적으로 다발성 장 궤양과 천공을 초래한다는 보고도 있다^{1,2)}. Penicillin, Methicillin 등 항포도구균 항균제는 항균력이 우수하여 지난 수십년간 본 감염증의 주요 치료약제로 사용되어 왔으나, 1940년대에 일부 *S. aureus*는 penicillin에 대하여 내성을 나타내기 시작하였고, 1950년대에 들어와서는 tetracycline, chloramphenicol 및 erythromycin에 내성인 *S. aureus*가 나타났고, penicillin 내성 *S. aureus*에 효과적으로 작용하는 항균제인 methicillin이 등장한지 일년 후인, 1961년에 methicillin에 내성을 나타내는 황색포도상구균(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)이 보고되었다³⁾.

국내에서도 1970년대 이후 병원 내 감염증에서 MRSA의 분리가 보고되었으며⁴⁾, 1997년에서 1998년 사이 병원감염관리협회 등의 조사에 의하면, 3차 병원에서 동정되는 *S. aureus* 중 70~80%가 MRSA인 것으로 나타났으며, 2004년 전국 12개 대학 및 종합병원의 환자에서 분리된 주요세균 중 MRSA의 비율은 67%였고, 특히 중환자실 환자에서는 86%로 매우 높았다^{5,6)}. 또한, 지역사회 일반인의 비강에서 분리한 황색포도상구균의 메치실린 내성율은 3.5%로 낮은 편이었으나⁷⁾, 농양, 객담, 혈액 등 임상검체에서 분리되는 황색포도상구균의 MRSA 분리율은 43%로 검체별로 카테터 86%, 혈액 64%, 객담 53%, 농양 42%, 소변 35%의 순으로 보고하였다⁸⁾. 3차 병원에서 분리되는 황색포도상구균의 70% 이상이 메티실린 내성으로 보고되었으며⁹⁾, 1, 2차 의료기관에서는 43%의 MRSA가 보고되는 등 국내 항균제 내성율은 매우 심각한 수준이다.

MRSA에 의한 집단 감염 방지를 위해서는 병원에서 분리된 균주들을 중심으로 유행 균주를 파악하기 위해 널리 사용하고 있는 분자 역학적 분석법으로는 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 등을 이용하고 있으나^{8,9,16)}, 이 균의

[†] Corresponding author. E-Mail: csw95@busan.go.kr
Phone: 051-757-6936, Fax: 051-757-2879

감염 증상이 주로 독소 생성에 의한 것이므로 독소 유전자형을 분자역학연구에 활용한 보고도 있다^{10,11}.

따라서, 본 연구에서는 최근 3년간 부산지역 병원에 내원한 설사환자 변에서 유래한 메치실린 내성 황색포도상구균(MRSA)의 분포 및 항균제감수성 양상, 독소유전자형 및 PFGE 분석을 통해 분자 역학적 지표로서의 유용성과 MRSA 분리주간의 분자 역학적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

2004년 1월부터 2006년 12월까지 부산 지역 5개 2차 종합 병원에 입원한 환자 중, 설사 증상을 보이는 환자 2,125명의 대변 검체에서 분리된 황색포도상구균 142균주를 본 연구에 사용하였다.

균의 분리 및 동정

설사 가검물에서 *S. aureus*의 분리는 5% Egg yolk tellurite solution (Oxoid)을 함유한 Barid Parker agar (Oxoid) 배지에 설사 검체를 멸균 면봉으로 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 주위에 clear zone이 형성된 검정색 집락을 선별하여, 5% Egg yolk tellurite solution을 함유한 Barid Parker agar (Oxoid) 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다(단일집락 분리, 2회 실시). 배양 후 그람염색을 실시하여 현미경으로 그람양성 포도상구균을 관찰하였으며, Bactident Coagulase EDTA Kaninchenplasma (Merck)를 사용한 tube coagulase test를 실시하여 coagulase 양성인 균을 API STAPH (bioMeriux)로 최종 동정하였다. *S. aureus*로 확인된 균주를 항생제 감수성 시험에 사용하였다. 또한 *S. aureus*를 nutrient agar 배지에 도말하여 10°C에 보존하였으며, 20% glycerol을 첨가한 tryptic soy broth에 접종하여 -70°C에 보존하였다.

항균제 감수성 시험

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹²에 따라 디스크 확산법(disk diffusion)으로 황색포도상구균의 항균제에 대한 감수성 시험을 실시하였다. 설사 변에서 분리한 황색포도상구균을 혈액한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, 잘 분리된 집락 3~5개를 멸균 생리식염수에 풀어 MacFarland No. 0.5가 되도록 탁도를 맞춘 다음, 15분 이내에 Muller Hinton agar (Difco) 평판에 면봉으로 균액을 묻혀서 배지표면에 골고루 바른 다음, 실온에서 5분간 방치한 후 과잉의 습기를 제거하고 항생제 디스크를 올려놓는다. 평판을 뒤집어서 37°C에서 24시간 배양 후 억제환의 크기를 측정하여, 디스크 제조사의 억제환 해석표에 따라 각 균주의 항생제에 대한 내성 및 감수성을 판정하였다.

사용한 항생제 디스크의 종류는 ampicillin, gentamicin,

cefepime, cefotetan, ciprofloxacin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, oxacillin, penicillin, trimethoprim /sulfamethoxazole, imipenem, tetracycline, rifampin, vancomycin이며, 모두 BBL sensi disk (Becton-Dickinson, France)를 사용하였다.

mecA 유전자 검출

혈액한천배지에 24시간 배양한 3~5개의 집락을 멸균증류수에 현탁하여 Genomic DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하여 template로 사용하였다. *mecA* 유전자 검사는 *mecA*와 16s rRNA 유전자를 동시에 검출할 수 있는 primer¹³를 이용한 multiplex colony PCR로 확인하였다. 이때 PCR 최적반응 조건은 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 28 cycle로 실시하였다.

PBP 2a 단백질 확인 시험

혈액한천배지에 24시간 배양한 균을 MRSA-Screen (Denka-Seiken, Japan)을 이용하여 extraction reagent 1 200 ul를 넣고 집락 4~5개 정도를 따서 (1.5×10⁹ cell/tube) 균을 부유시켜 100°C heating block에서 3분간 가열 후 식힌 다음 extraction reagent 250 ul를 첨가하여 혼합 한 후 1,500×g, 5분간 원심분리하여 침전액을 Sensitized Latex 응집반응을 실시하였다.

장독소 유전자 시험

장독소 유전자 시험은 *S. aureus* Multiplex PCR Kit (Rappigen, Korea)를 가지고 enterotoxin A, B, C, D, E, G를 대상으로 시험하였다. tryptic soy broth (Difco) 3 mL에 검체 1 g을 첨가하고 12시간 동안 35°C에서 증균 배양하고, 증균한 검체 1 mL을 1.5 mL tube에 옮긴 후 9,000×g에서 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 멸균증류수 500 ul로 현탁시키고 다시 9,000×g에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 DNA 추출액 100 ul를 첨가하고 vortex하여 완전히 균체를 현탁시킨다. DNA 추출액(kit 내 포함)을 100 ul 첨가하여 끓는 물에서 10분간 가열한 뒤 실온까지 식힌 다음, 가볍게 vortexing 후에 9,000×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액 10 ul를 multiplex PCR 반응에 사용한다. 양성 대조균은 *S. aureus* ATCC 29213과 toxin이 확인된 분리주를 대조 균주로 사용하였다.

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

차²⁰ 등의 방법을 토대로, *S. aureus* 시험균을 혈액한천배지에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하여, 0.85% NaCl 용액 2 mL에 MacFarland 탁도 13정도로 균 농도를 조절한다. 1.5 mL centrifuge tube에 균현탁액 200 ul와 55°C로 보관 중인 1.6% SeaKem Gold agarose (Cambrex, Rockland, ME, USA) 200 ul를 넣고 부드럽게 혼합한 후, plug mold (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA)에 넣어 냉장고에서 30분 동안 방치하였다. EET buffer [0.5 M EDTA, 0.1 M EGTA, 1 M Tris (pH 8.0)]에 lysozyme (50 ug/mL)과 lysostaphin (25 units/mL)을 가하여 lysis solution을 만들고, plug가 굳으면 투명한 1.5 mL 시험관에 각각의 plug를 옮겨 넣었다. lysis solution을 2 mL씩 분주하고 plug가 완전히 잠기게 하여 37°C 수조에서 하룻밤 반응시킨 후, lysis solution을 제거하고 TE buffer로 1회 세척하였다. Proteinase K (1 mg/mL) 및 10% SDS를 1% 농도로 가한 EET buffer 2 mL을 plug가 들어있는 시험관에 넣고 plug가 완전히 잠기게 하여 54°C 수조에서 하룻밤 반응시켰다. 시험관에서 buffer를 제거하고 멸균 증류수로 상온에서 30분씩 2회 세척하고 TE buffer로 4°C 30분씩 3회 세척하였다.

Plug를 2.5~3 mm 크기로 잘라 새로운 1.5 mL tube에 넣고 *Sma* I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)이 첨가된 제한효소요액 200 μ l씩을 가한 후, 25°C 배양기에서 6시간 반응시킨 후 TE buffer로 plug를 1회 세척한다. Comb에 순서대로 plug를 붙이고, marker로는 Lambda Ladder (48.5~970 kbp, Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 30분간 실온에서 방치한 후 0.5× TBE buffer (Bioneer, Korea)로 제작한 1% SeaKem Gold agarose를 부어 굳힌 다음 CHEF mapper (Bio-Rad, USA)로 전기영동을 시행하였다. 조건은 initial pulse 5초, final pulse 40초, 6 V/cm, 20시간이고 온도는 14°C로 실시하였다¹⁰⁾. 겔은 ethidium bromide (0.5 ug/mL : Bioneer, Korea)으로 30분간 염색 후 증류수로 30분간 탈색하였으며, UV illumination (Alpha Innotech, USA)상에 결과 파일(TIFF)을 저장하여 데이터 분석에 사용하였다.

유연관계 분석

PFGE 결과는 Tenover 등⁴⁾이 제시한 방법 및 기준을 따라 각 균주의 DNA 위치가 다른 절편의 수에 따라서 group을 결정하였다. Bio Numerics Ver. 4.6 (Applied Maths, Belgium) software를 사용하여 unweighted pair group method of average linkage (UPGMA)법에 의하여, Dice coefficient를 근거로 dendrogram을 작성하여 균주 간의 유연관계를 분석하였다. Dice coefficient에 의해 80% 이상의 유사도를 가진 pulsed-field type (PFT) 클러스터로 한정하였다.

결과 및 고찰

MRSA의 분포 및 항균제 내성 양상

부산지역 5개의 2차 종합병원에서 분리된 황색포도상구균 142주에 대하여, 디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 시험을 실시한 결과, 총 49주(34.5%)가 methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) 균주임을 증명해주는 oxacillin에 내성으로 나타났다. 항균제 감수성 시험을 통한 MRSA의 정확한 검출을 위해서는, methicillin이나 nafcillin 보다는 oxacillin 디스크를 사용하는 것이 더 안정적인 것으로 보고되고 있어⁹⁾, 본 연구에서도 methicillin 대신 oxacillin을 사용하였다. 3차 병원에서도 분리되는 황색포도상구균의 70% 이상이 methicillin 내성으로 보고된⁹⁾ 것과 비교하여, 2차 병원을 대상으로 한, 본 시험 결과가 3차 병원에 비해서는 MRSA 비율이 낮음을 알 수 있었다.

이 등⁹⁾이 국내 종합병원 및 병의원을 대상으로 MRSA의 분리율을 조사한 결과, 카테터(86%), 혈액(64%), 객담(53%), 농양(42%), 소변(35%) 순으로 보고한 것과, 이 등⁹⁾ 및 김 등¹⁰⁾이 혈액에서 분리한 황색포도상구균의 MRSA 분리율이 56.6%와 63.1%로 각각 보고하고 있어, 설사변을 대상으로 한 본 시험의 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한, 박 등⁷⁾은 설사변에서 분리한 황색포도상구균의 methicillin에 1.9%가 중등

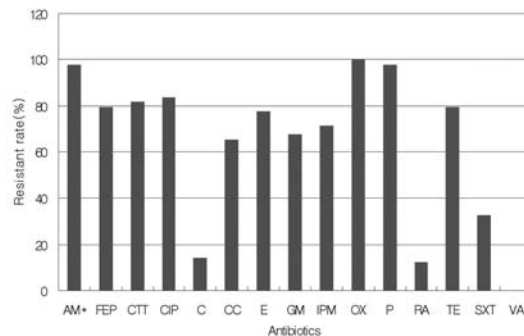


Fig. 1. Antibiotic resistant rate of Methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA) isolated from Stool samples.

* AM, ampicillin; FEP, ceftazidime; CTT, cefotetan; CIP, ciprofloxacin; C, chloramphenicol; CC, clindamycin; E, erythromycin; GM, gentamicin; IPM, imipenem; OX, oxacillin; P, penicillin; RA, rifampin; TE, tetracycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; VA, vancomycin.

Table 1. Rates of MRSA isolates in Busan from 2004 to 2006

Year	2004	2005	2006	Total
No. of <i>S. aureus</i> isolates	60	52	30	142
No. of MRSA isolates(%)	18 (30.0)	17 (32.7)	14 (46.7)	49 (34.5)

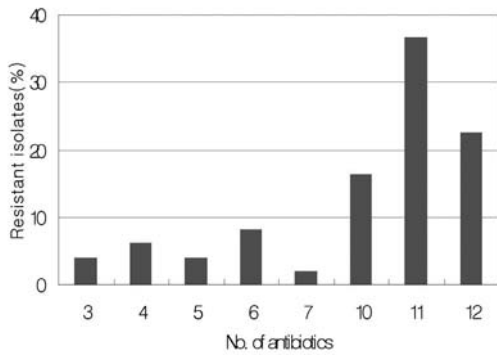


Fig. 2. Distribution of multiresistant MRSA isolates

도의 내성을, 98.1%가 감수성이라고 보고하여, 본 연구결과와는 상이하였다.

또한, 2004년부터 2006년까지 분리된 황색포도상구균 중 메치실린 내성 황색포도상구균(MRSA)의 분리율을 살펴본 결과(표 1), 2004년부터 2006년까지 각각 30.0%, 32.7%, 46.7%인 것으로 나타나, 최근 3년간 MRSA 분리율이 계속적으로 증가하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 메치실린 내성균에 의한 감염증 치료 시, 항균제의 선택이 매우 제한되고 치료를 어렵게 하며, 아울러 의료비를 상승시키는 문제점들이 있다고 판단되었다.

한편, MRSA 균주의 항균제 내성 양상을 파악하기 위해, 총 49주를 대상으로 15종의 항균제에 대해 감수성 시험을 실시한 결과(그림 1), vancomycin에는 100% 감수성을 보여 vancomycin 내성 황색포도상구균(VRSA)은 없는 것으로 나타났으나, ampicillin, penicillin에는 1주(2.0%)를 제외하고는 모두 내성이었고, cefepime, cefotetan, ciprofloxacin, tetracyclin에는 80% 이상의 내성을 보이는 등, 15종의 항균제 중 11종의 항균제에 대하여 60% 이상의 높은 내성율을 보였다.

또한, MRSA의 다제 내성율을 분석한 결과(그림 2), 75.5%가 10종 이상의 항균제에 다제 내성을 나타내었으며, 특히 11종 항균제에 대한 다제 내성균이 가장 많은 것으로 나타났다. 이 등⁹도 11개의 항균제 중 7개 이상에 대해 내성을 보인 MRSA 균주

가 74%에 이르렀다고 보고하였으며, MRSA가 대개 다제 내성 균주인 것은 Hiramatsu 등¹⁰이 보고한 바와 같이, 다른 항균제에 대한 내성이, oxacillin 내성여부에 의존적이기 때문인 것으로 사료되었다.

mecA 유전자의 검색 및 PBP 2a 단백질 확인

총 49주의 MRSA에 대해, mecA 유전자에 대한 multiplex PCR을 시행한 결과, 49 균주 모두 methicillin 내성유전자인 mecA 유전자를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, MRSA screen 시험을 통해, PBP 2a 확인 시험을 실시한 결과도 마찬가지로, 49주 모두에서 양성을 나타내었다. MRSA의 검출에는 까다로운 성장 조건이 요구되고, 특히, borderline 및 low-level 저항균주의 메치실린 내성을 판단하기에는 어려움이 보고되고 있다⁹.

따라서, 본 연구에서는 항생제 감수성 시험보다 재현성, 신뢰성이 뛰어나다고 보고되어 있는 mecA 유전자에 대한 PCR 시험을 실시하였고, 아울러, mecA 유전자에 의해 발현되는 단백질인 PBP 2a 까지 확인함으로써 분리된 MRSA 균주에 대한 검증을 실시하였다. 국내·외 MRSA의 mecA 검출을 보고에서는 mecA 검출률이 75~100%로 보고된 바 있고¹⁰, 본 시험에 사용한 MRSA 균주는 모두 mecA 유전자와 PBP 2a 단백질이 확인되었던 바, borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA)^{10,20}에 해당하는 MRSA주는 없었음을 알 수 있었다.

장독소 유전자형

Multiplex PCR법을 이용하여 MRSA 49주에 대한 장독소 유전자의 분포를 관찰한 결과는 표 2와 같았다. 49주 중 51%가 독소 유전자를 가지고 있지 않았고, 30.6%가 독소유전자 A를 가지고 있었으며 그 밖에 C (8.3%), B (4.1%) 순이었고, 나머지 D, C/G, G 유전자가 각각 2.0% 인 것으로 나타났다. 이것은 박 등²⁰이 부산 지역 2차 의료기관 설사 가검물에서 분리한 황색포도상구균에 대한 장독소 연구 결과, 장독소를 가지고 있지 않은 것이 54.7%, A형이 37.5%, B형 4.7%, C형 3.1% 순으로 보고하여, 본 연구 결과와 비슷한 분포를 보였으며, 전국 5개 시·도를 대상으로 3차 의료기관 혈액배양 분리주를 수집하여 조사한

Table 2. Enterotoxin production of MRSA isolates

Production of enterotoxin	Isolates (%)
A	15 (30.6)
B	2 (4.1)
C	4 (8.3)
D	1 (2.0)
C/G	1 (2.0)
G	1 (2.0)
None	25 (51.0)
Total	49 (100.0)

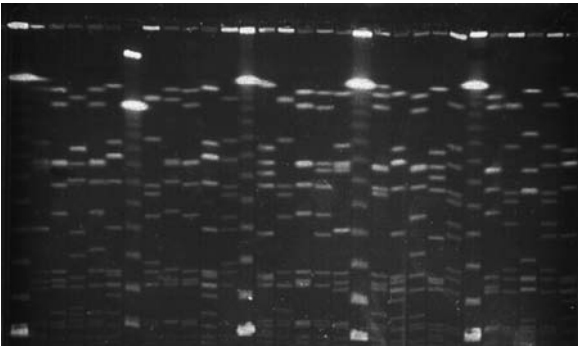


Fig. 3. PFGE (*Sma* I digested) patterns of representative MRSA isolates from sporadic cases in Busan (2004~2006). Lane M, Lamda PFG marker; Lane 1, D0401; 2, B0402; 3, B0403; 4, B0404; 5, D0405; 6, B0406; 7, B0407; 8, S0408; 9, S0409; 10, H0410; 11, D0411; 12, CH0412; 13, B0413; 14, H0414; 15, D0415; 16, B0416; 17, B0417; 18, D0418; 19, D0501; 20, D0502; 21, H0503; 22, B0504; 23, H0505; 24, D0506; 25, D0507.

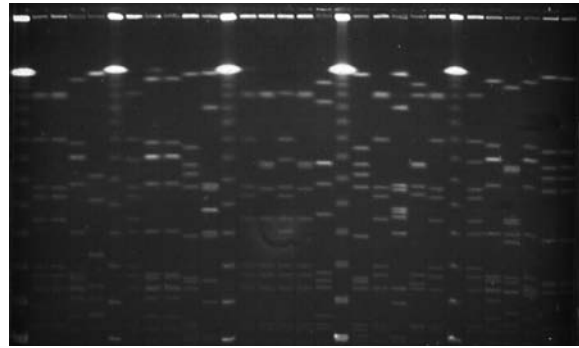


Fig. 4. PFGE (*Sma* I digested) patterns of representative MRSA isolates from sporadic cases in Busan (2004~2006). Lane M, Lamda PFG marker; Lane 1, CH0508; 2, CH0508; 3, D0509; 4, CH0510; 5, S0511; 6, D0512; 7, B0513; 8, H0601; 9, D0602; 10, H0514; 11, D0515; 12, B0516; 13, D0517; 14, B0603; 15, D0604; 16, CH0605; 17, D0606; 18, D0607; 19, CH0608; 20, B0609; 21, D0610; 22, D0611; 23, D0612; 24, D0613; 25, D0614.

결과, C/G가 주종을 이루고 그 다음 A 독소 유전자가 많이 분포하는 것으로 보고한 김 등¹⁹의 결과와는 다소 상이하였다. 따라서, MRSA 분리주에서 장독소 유전자형이 다양한 양상을 나타냄으로써, 장독소 검출의 진단 목적 뿐만 아니라, 역학적인 목적과 database 구축을 위한 형별분석의 가능성을 제시하였다고 판단되었다.

PFGE 결과

2004~2006년에 걸쳐 부산 지역에서 산발적으로 분리된 MRSA 총 49주에 대해 *Sma* I을 제한 효소로 처리한 후에 PFGE를 수행한 성적은 그림 3과 그림 4에서 나타낸 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 40~630 kbp 사이에 8~14개의 절편을 갖는 32가지의 다양한 패턴을 나타내었다. Dice coefficient를 적용하고 5%의 허용한계 범위 내에서 DNA fingerprint 성적을 바탕으로 dendrogram을 작성한 성적은 그림 5에 나타내었다. 유사도 80%를 기준으로 크게 7개의 그룹(I~VII)으로 구분되었으며, I 그룹에 시험균주의 34.7%, III 그룹에 26.5%가 속하였으며, 나머지 II (14.3%), IV (10.2%), VII (6.1%), V (4.1%), VI (4.1%) 그룹 순이었다. 조사 대상 5개 병원(B, CH, D, H, S 병원) 모두에서 나타나는 공통적인 패턴은 보이지 않았다. I 그룹은 장독소유전자형 및 항균제내성 패턴에 따라 I-1과 I-2 두개의 그룹으로 분류할 수 있었다. I-1 그룹은 대부분 장독소 A 유전자를 가지고, 12종의 항균제에 다제 내성을 나타내는 균주 특성을 보였고, I-2 그룹은 3~5종의 비교적 적은 수의 항균제 내성을 가지면서, 장독소유전자형은 없는 것이 특징이었다. 또한, 2004년에서 2006년에 걸쳐 I 그룹에 B와 D 병원 분리 균주가 고루 분포된 것으로 보아, 이들 병원 내에 소규모의 유행균주가 있을 것으로 생각되었다. 김¹⁹ 등이 혈액배양 MRSA 분리주에 대한 PFGE 분석 결과 병원별로 주요 유행균

주 양상에 다소 차이는 있었으나, 국내 유행 균주가 있음을 보고하였고, 이¹⁹ 등은 1·2차 의료기관을 중심으로 수집된 MRSA 검체에서, 집단식중독 관련 MRSA 분리주는 동일한 PFGE 양상을 나타내었으나, 각 지역이나 의료기관내에서 뚜렷하게 동일한 균주의 유행을 확인할 수 없었음을 보고하였으나, 이¹⁹ 등은 전국 3차 의료기관의 혈액 임상 분리 MRSA주에 대한 PFGE 분석 결과 병원별로 소수의 유행 및 국내 유행균주도 있었음을 시사하였다.

한편, 본 시험 연구 대상 병원 중 B, D 병원을 제외한 나머지 3개 병원(CH, S, H 병원)은 MRSA 분리주 수가 상대적으로 적어 유행을 파악하기 위해서는, 보다 많은 분리주의 확보가 우선되어야 한다고 판단하였다. 다만, 공통적으로 III 패턴을 보이는 CH 병원의 경우 2004년부터 2006년까지 지속적으로 동일한 항균제 내성 패턴(AM-FEP-CIT-CIP-CC-E-GM-IPM-OX-P-TE)을 가지는 MRSA주가 있는 것으로 보아, CH 병원 내 소규모의 유행균주가 있을 것으로 추측하였다.

따라서, 본 연구를 통해 부산지역 전체에 뚜렷하게 동일한 균주의 유행은 확인할 수 없었으나, 종합병원 내에 MRSA의 소규모 유행은 있을 것으로 판단하였다. 또한, MRSA에 의한 감염증의 산발 혹은 집단 발생 시 PFGE는 역학적 지표로써 유용함을 확인할 수 있었으며, 추후 보다 다양한 의료기관을 대상으로 많은 균주의 확보를 토대로 한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

결 론

부산 지역 5개 2차 종합병원 설사환자 변에서 유래한 메치실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대한 항균제감수성 양상, 장독소유전자형 및 PFGE 분석을 통해 MRSA 분리주간 분자 역

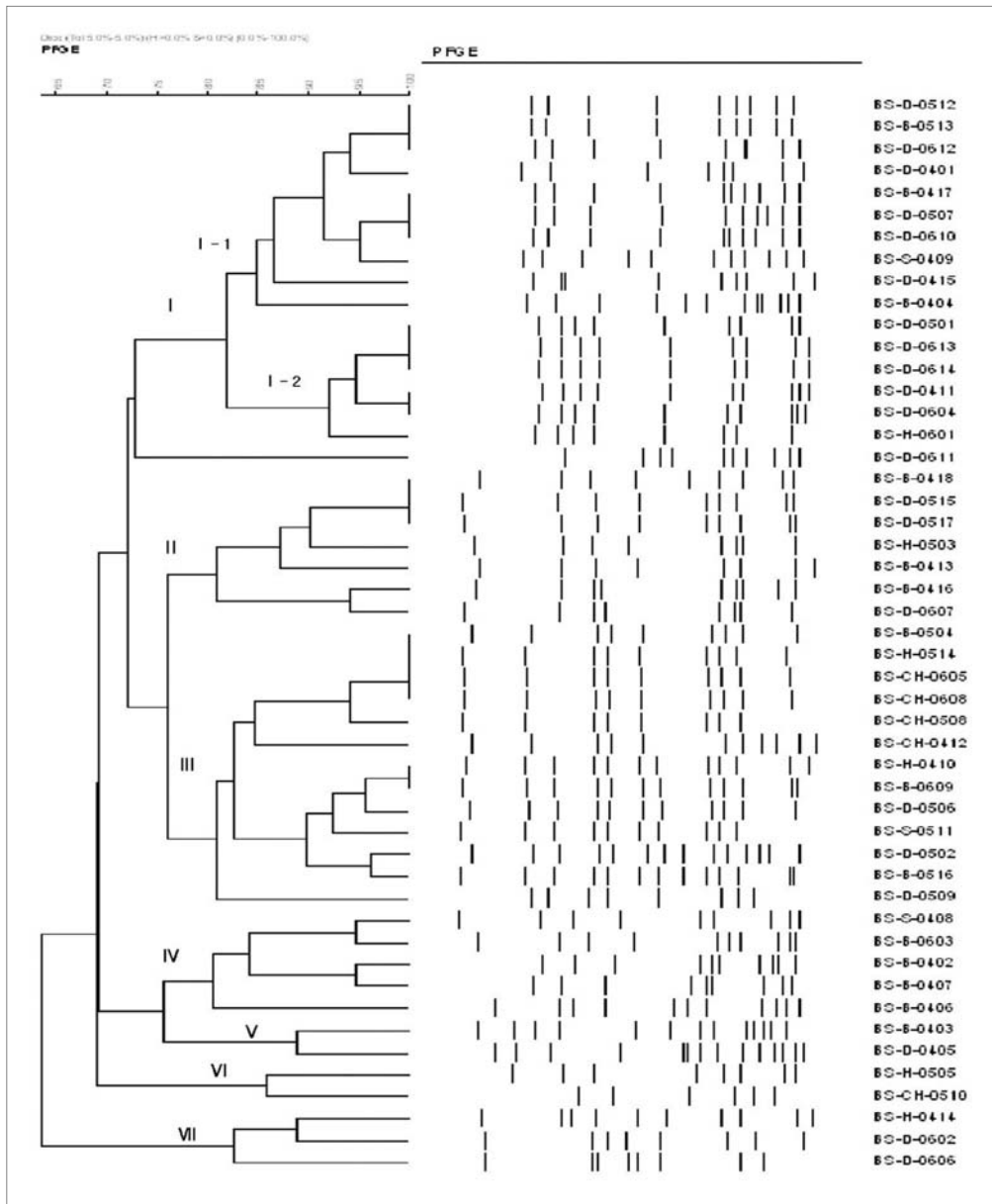


Fig. 5. Dendrogram showing similarities among the *Sma* I PFGE pattern of the 49 sporadic case methicillin resistant *S. aureus* strains.

학적 특성을 연구한 결과는 다음과 같았다.

1. 최근 3년간 분리된 황색포도상구균 142주 중, 총 49주 (34.5%)가 MRSA인 것으로 확인되었으며, 황색포도상구균 중 MRSA 분리율이 '04, '05, '06년에 걸쳐 각각 30.0%, 32.7%, 46.7%인 것으로 나타나, 지속적으로 증가하고 있음을 알 수 있었다.
2. MRSA 균주의 항균제 내성 양상은 vancomycin에는 100% 감수성을 보였으나, ampicillin, penicillin에는 1주 (2.0%)를 제외하고는 모두 내성이었고, cefepime, cefotetan,

- ciprofloxacin, tetracyclin에는 80% 이상의 내성을 보이는 등, 15종의 항균제 중 11종의 항균제에 대하여 60% 이상의 높은 내성율을 보였다. MRSA의 다제 내성율 면에서는, 75.5%가 10종 이상의 항균제에 내성을 나타내었으며, 특히 11종 항균제에 대한 다제 내성균이 가장 많은 것으로 확인되었다.
3. MRSA주의 장독소 유전자 시험을 실시한 결과 51%가 장독소 유전자를 가지고 있지 않았고, 30.6%가 독소유전자 A를 가지고 있었으며 그 밖에 C (8.3%), B (4.1%) 순이었다.
 4. MRSA 총 49주에 대해 PFGE를 수행하여 dendrogram을 작성한 결과, 크게 7개의 그룹으로 구분되었으며, 부산지역 전체

에 뚜렷하게 동일한 균주의 유행은 확인 할 수 없었으나, 종합병원 내에 소규모의 MRSA 유행은 있을 것으로 사료되었다.

본 연구 결과, 최근 3년간 부산지역에서 분리되는 황색포도상구균 중 MRSA 분리율이 지속적으로 증가하고 있고, 분리된 MRSA 주는 항균제에 대한 다제 내성을 또한, 매우 높은 실정이었다. 이로 인해, 임상적으로 항균제의 선택이 매우 제한되고 치료를 어렵게 하며, 아울러 의료비를 상승시키는 많은 문제점들이 야기된다고 판단되었으므로, MRSA 균주에 대한 정확하고도 신속한 진단을 통한 치료가 요구된다고 하겠다.

또한, PFGE 분석을 통해 병원내 MRSA 균주의 유행 가능성을 제시하였던 바, 역학적 지표로써 PFGE 패턴 조사가 유용함을 확인할 수 있었으며, 향후 MRSA에 의한 감염증의 산발 혹은 집단 발생에 대한 보다 유의성 있는 연구 및 병원내 유행 연구를 위해서는, 다양한 의료기관을 대상으로 많은 균주의 확보를 토대로 한, 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

- Francis A, Waldvogel : *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrom). In: Mandell Douglas and Bennetts Principles and Infections Disease. 4th ed., Churchill Livingstone, pp1754-1755(1995)
- Han, S. J., P. M. Jung, H. G. Kim, E. H. Hwang and I. W. Seong. Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. *J. Pediatr. Surg.* 34, pp381-386(1999)
- Lencastre De H, Chung M, Westh H. Archaic Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular and microbiological properties of isolates from the 1960's in Denmark. *Microb. Drug. Resist.* 6, pp1-10(2000)
- Park, S. J., Y. S. Jeoung, S. Y. Lee. Antimicrobial susceptibility study of isolates from clinic examination. *Korean J Pathol* 11, pp119-125(1977)
- Chong Y, Lee K, Park Y, Jeon DS, Lee MH, Kim MY, et al: Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance of bacteria in 1997. *Yonsei Med. J.* 39, pp569-577(1998)
- Lee, K. W., E. C. Kim, W. G. Lee, S. H. Jeong, Y. J. Park, D. G. Yong, J. H. Song and H. K. Lee. Development of Control System of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of Bacteria. *Annual Report of NARMP.* 4, pp111-145(2006)
- Jeoung, H. Y., S. J. Jang, S. D. Lee, S. H. Park, C. S. Min, S. Y. Lee, K. H. Lee, J. E. Lee, M. S. Lee and K. W. Lee. Monitoring on the Bacterial Resistance to Antibiotics. *The Annual Report of KFDA*, 6, pp222-229(2002)
- Lee, Y. S., H. B. Kim, J. I. Yoo, S. J. Yang, C. M. Sa, Y. H. Choi and B. S. Kim, Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *The Report of NIH*, 36, pp67-76(1999)
- Lee, Y. S., J. O. Cha, Y. H. Jung, Y. H. Chai, Y. S. Yang and H. B. Kim. Molecular epidemiology study on *Staphylococcus aureus* isolates from blood specimen in Korea. *The Report of NIH*, 37, pp53-60(2000)
- Haley, R. W., N. B. Cushman, F. C. Tenover, T. L. Bannerman, D. Dryer, J. Ross, P. J. Sanchez and J. D. Siegel. Eradication of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections from a neonatal intensive care unit. *J. infect. Dis.* 171, pp614-624(1995)
- Hartstein, A. I., M. A. Dennys, V. H. Morthland, A. M. LeMonte, M. A. Pfaller. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital and an intensive care unit. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 16, pp405-411(1995)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- N Woodford. PCR for the detection of antibiotic resistance genes Laboratory of Hospital infections SOP No.L-4109/03-98.
- Tenover, F. C., R. V. Arbeit, P. A. Goering et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microb.* 33, pp2233-2239(1995)
- Moon, J. Y., E. J. Lee and Y. B. Kim. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR. *J. Bac. and Viro.* 34(2), pp91-100(2004)
- Kim, B. S., Y. S. Lee, J. I. Yoo, J. K. Lee, J. O. Cha and E. S. Shin. Analysis of mec regulation gene and PFGE on *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary hospitals in Korea. *The Report of NIH*, 38,

- pp43-51(2001)
17. Park, S. G., Y. O. Hwang, J. H. Jung and K. M. Lee. Biological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food-Borne Patients in Seoul. *J. Fd. Hyg. Safety*, 16, pp159-167(2001)
 18. Hiramatsu, K., T. Ito, H. Hanaki. Mechanism of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Balliere's Clin. Infect. Dis.* 5, pp221-242(1999)
 19. Chambers, H. F., Methicillin resistance in staphylococci—molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, pp781-791(1997)
 20. Jorgensen, J. H., Mechanisms of methicillin resistance in *staphylococcus aureus* and method for laboratory detection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12, pp14-19(1991)
 21. Cha, J. O., J. K. Lee, Y. H. Jung, J. I. Yoo, Y. K. Park, B. S. Kim and Y. S. Lee. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Micro.*, 101, pp864-871(2006)
 22. Park, E. H., G. Y. Jeoung. Distribution of enterotoxin type in *Staphylococcus aureus* isolates from stool samples. *Rep. Busan. Inst. Health & Environ.*, 14, pp28-43(2004)