

포도구균의 메티실린 내성 정도와 내성 관련 유전자 *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *femA*와의 연관성

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실, 내과학교실*

이혜경 · 이은정 · 박연준 · 김병기 · 강문원* · 심상인

Relationship Between the Level of Methicillin Resistance and *mecA*, *mecI*, *femA* Genes in Staphylococci

Hae Kyung Lee, M.D., Eun Jung Lee, M.D., Yeon Joon Pahk, M.D., Byoung Ki Kim, M.D.
Moon Won Kang, M.D.*, Sang In Shim, M.D.

Department of Clinical Pathology, and Internal Medicine*, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background : About 60~70% of hospital isolates of staphylococci are resistant to methicillin. The level of resistance varies from low to high depending upon the genetic background of the strains. The purpose of this study was twofold: (i) to understand the relationship between β -lactamase and methicillin-resistance genes(*mecA*, *mecI*, *mecR1*, *femA*) and the level of resistance and (ii) to survey the distribution of *mec* regulator genes(*mec I*, *mecR1*) among methicillin-resistant staphylococci.

Methods : Eighty-three isolates of *Staphylococcus aureus* and 29 of coagulase-negative staphylococci(CNS) at Catholic University Hospital were examined. The level of methicillin resistance was studied using disk diffusion test and agar dilution test. *MecA*, *mecI*, *mecR1*, and *femA* genes detected by polymerase chain reaction.

Results : β -lactamase production was significantly high in *S. aureus* and CNS isolates with low-level resistance. *MecA* and *mecR1* genes amplification correlated with the level of resistance in *S. aureus* and CNS isolates. There was no correlation between the level of resistance and *mecI* and *femA* genes amplification in *S. aureus* and CNS isolates. Methicillin-resistant *S. aureus* isolates showed more variety in *mec* regulator region than methicillin-resistant CNS isolates.

Conclusion : From this study, we conclude that *mecR1* gene could be considered as one of the important factors influencing the level of methicillin resistance in staphylococcal strains.

Key Words : β -lactamase, *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *femA*, Staphylococci

서 론

포도구균은 원내 감염(nosocomial infection)을 일으키는 원인균 중 10~20%를 차지하며 이중 60~70%가 메티실린 내성이다. 메티실린 내성 포도구균은 β -lactams, aminoglycosides, macrolides와 같은 여러 항균제에 대해 다제내성일 뿐 아니라 메티실린 내성의 발현은 배지의 온도, pH, 염 농도 같은 여러가지의 성장조건에 영향을 받

이 받으며^{1,2)}, 매우 복잡한 유전적 배경을 가지므로 보통의 항생제 감수성 검사로는 정확한 검출이 어려워 심각한 문제가 되고 있다. 메티실린의 내성 기전은 매우 복잡하며 완전히 규명되지 못하고 있으나, β -lactamase의 과잉생산³⁾, β -lactam항생제에 저 친화성을 보이는 penicillin-binding protein(PBP) 2'를 생산하는 *mecA* 유전자의 발현⁴⁾과 PBP형의 변화⁵⁾ 때문으로 생각되어 왔다. Song 등⁶⁾이 *mecA* 유전자의 상유역에 *mecA* 유전자의 억제유전자로 생각되는 *mecB* 유전자의 존재를 보고하였고, 이 *mecA* 유전자의 상유역을 없애면 PBP 2'의 생성이 증가하고 동시에 메티실린 내성이 상승하는 것으로부터 이 *mecB* 유전자가 PBP 2'의 억제조절인자인 *mecR*인 것이 밝

접수: 1997년 7월 3일, 승인: 1997년 11월 15일
교신저자: 이혜경. 의정부시 의정부2동 432-16
가톨릭대학교 의정부성모병원 임상병리과
Tel: 0351)820-3159, Fax: 0351)847-8077

감 염 제 30 권 제 1 호 1998
Vol. 30, No. 1, 36 ~ 44

□ 원 저 □

혀졌다⁷⁾. Hiramatsu 등⁸⁾은 이 *mecR*이 유도 유전자인 *mecRI*과 억제 유전자인 *mecI*로 구성됨을 밝혔다.

또한 PBP 2'가 메티실린 내성의 근본적인 요인이 되나 내성 균주에서의 PBP 2'의 양과 메티실린 내성의 정도가 일치하지 않는 것 등으로 보아 메티실린 내성은 *mecA*, *mecI*, *mecRI*들과는 다른 유전자 등 기타 여러가지 인자의 영향에 의한다고 추측되며⁹⁾ 여기에 대하여 Hartman 등과⁹⁾ Berger-Bachi 등¹⁰⁾은 *femA* 유전자가 중요한 작용을 한다고 하였다. *femA* 유전자는 아직까지 작용기전이 확실히 밝혀지지 않은 상태이나, PBP 2'생성에는 영향을 미치지 않으면서, 포도구균의 세포벽 구성 성분의 조성에 관여하며 약제감수성에 영향을 주어 메티실린 내성에 관여하는 것으로 생각되고 있다^{10, 11)}.

억제 유전자 *mecI*에 의하여 코드(code)되는 단백질 *mecI*는 123개의 아미노산으로 구성되며¹²⁾, 고도 내성 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)에는 존재하지 않는다고 애초에 생각하였다. 그러나 고도 내성 *S. aureus*의 77%에서 *mecI*가 검출되면서 이 유전자가 비활성화 상태로 존재하거나¹³⁾, *mecI* 유전자의 점변이(point mutation)가 존재하는 것으로 보고되었다^{14, 15)}.

유도 유전자 *mecRI*에 의하여 코드되는 단백질 *mecRI*은 585개의 아미노산으로 구성되며¹²⁾, β -lactam제제에 의하여 활성화되면 *mecA*의 촉진 부위 (promotor region)에 결합함으로써 *mec I*에 의한 전사(transcription) 억제가 해제되고 PBP 2'가 생성되면서 내성 표현이 유도되는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

그러나 현재 이러한 조절유전자들의 메티실린 내성에 미치는 영향에 대한 연구는 미미하다. 또한 내성 정도와 내성 관련유전자의 상관성에 대한 연구는 보고가 없는 실정이다.

본 연구에서는 임상검체에서 분리된 포도구균들을 메티실린 저도, 중등도 및 고도 내성주로 나누어 β -lactamase의 생성유무와 내성 관련 유전자 *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *femA*를 검출하여 내성의 정도와 내성 관련 유전자의 상관관계로 규명하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 포도구균 균주는 1996년 1월부터 10월 사이에 가톨릭 의과대학 부속병원에 입원 및 외래환자의

각종 임상검체에서 분리된 *S. aureus* 83균주 (고도 내성 44균주, 중등도 내성 23균주, 저도 내성 16균주)와 coagulase negative staphylococci(CNS) 29균주(고도 내성 11균주, 중등도 내성 3균주, 저도 내성 15균주)를 대상으로 하였으며, 균주는 -70℃에서 20% glycerol을 첨가한 tryptic soy broth(TSB)에 보관한후 면양혈액한천에 계대배양한 후 사용하였다.

균주의 메티실린 내성 유무의 판정법으로 디스크 확산법을 사용하였고 이어서 내성 정도의 분류는 한천 희석법을 사용하였다.

1. 디스크 확산법

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에 따른 직접접종법¹⁷⁾으로 tryptic soy broth (TSB)에 균을 풀고 바로 탁도를 McFarland의 0.5관에 맞추후, 4% NaCl이 첨가된 Mueller-Hinton 한천배지에서 35℃ 24 시간 배양하였다. Oxacillin 1 μ g의 저지대가 10mm이하인 경우 내성으로, 13mm이상인 경우 감수성으로 판정하였다¹⁷⁾.

2. 한천 희석법

시험 세균을 TSB에 접종하여 배양한 후에 식염수를 써서 탁도를 McFarland의 0.5관에 맞추고 이것을 다시 1:100으로 희석한 후 Steers inoculator를 사용하여 oxacillin(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)이 포함된 평판배지에 접종하였다. 이것을 35℃에 24 시간 배양한 후 규정된 방법에 따라 메티실린 최저 발육저지농도를 판독하였다¹⁸⁾. 감수성 검사의 정도관리를 위해서 메티실린 내성인 *S. aureus* 1936 표준균주(明治製菓연구소, 일본)를 동시에 시험하였다. *S. aureus*의 경우¹⁷⁾ 메티실린 최저 발육저지농도가 4~8 μ g/ml, CNS의 경우 York 등¹⁹⁾이 제시한 바에 따라 2~8 μ g/ml인 경우는 저도 내성으로, *S. aureus*와 CNS 모두에서 메티실린 최저 발육저지농도가 16~64 μ g/ml인 경우 중등도 내성으로, *S. aureus*와 CNS 모두에서 메티실린 최저 발육저지농도가 128 μ g/ml이상인 경우 고도 내성으로 분류하였다²⁰⁾.

3. β -lactamase 생성주의 검출

β -lactamase의 검출은 nitrocefin disk법 (Cefinase, BBL, Cockeysville, Maryland)으로 시행하였다¹⁷⁾.

4. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 *mec A*, *mec I*, *mec R1*, *fem A* 유전자 증폭

검체는 균이 자란 한천배지에서 배양한 집락의 약 1 백금이량을 300 μ l의 lysis buffer(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl)에 부유시킨 후 비등에 의해 용균시켰다. 여기에 100 μ l의 lysozyme (100mg/ml)과 50 μ l의 RNase(10mg/ml)를 가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 125 μ l의 25% sodium dodecyl sulfate와 25 μ l의 proteinase K(20mg/ml)를 넣고 37°C에서 하룻밤 처리하였다. Phenol-chloroform 추출을 하고 ethanol로 침전시켜 침전물 DNA를 얻었다¹³⁾. 이 DNA(400~500ng)는 10 μ l의 증류수에 용해한 후 PCR에 사용하였다. *mec A*, *mecI*, *mecR1*, *femA* 유전자를 증폭하기 위한 PCR용 primer는 *mec A*, 1a) 5'-ATGAGATTAGGCATCGT-TCC-3', 1b) 5'-TGGATGACAGTACCTGAGCC-3'; *mec I*, 2a) 5'-CTGCAGAATGGGAAGTTATG-3', 2b) 5'-ACAAGTGA-ATTGAAACCGCC-3'; *mec R1* 후반부(3'말단), 3a) 5'-A-AGCACCGTTACTATCTGCACA-3', 3b) 5'-GAGTAAATTTTG GTCGAATGCC-3'; *femA* 4a) 5'-CATGATGGCGAGATTACA-GG-3', 4b) 5'-CGCTAAAGGTACTAACACACGG-3' 서열의 oligonucleotide를 주문 생산하여 사용하였다(Bioneer, 대전).

Microtube에 증류수 41.5 μ l, PCR buffer 5.0 μ l(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.9, 1% Triton X-100, 15mM MgCl₂), dNTP 각각 0.5 μ l(200 μ M, Behringer-Mannheim, Hamburg, Germany), AmpliTaq polymerase 0.2 μ l(2.5 Units, Behringer-Mannheim), 각각의 primer 0.5 μ l(1 μ M)를 넣어 49.7 μ l씩 분주하고, 조정시료(검체 DNA) 1 μ l를 넣어 Thermocycler(Perkin-Elmer Cetus, CA, U.S.A.)를 사용하여 94°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분을 1 cycle로 하여 35회 시

행하였다. 중합효소연쇄반응 산물은 1.8% agarose gel 상에서 전기영동으로 분획하고 ethidium bromide로 염색 후 특이적인 띠(*mecA*, 554 bp; *mecI*, 268 bp; *mecR1*, 235 bp; *femA*, 372bp)를 자외선 하에서 관찰하였다.

5. 통계학적 검증

내성의 정도에 따른 β -lactamase, *mec A*, *mec I*, *mec R1*, *fem A* 유전자 보유율의 차이는 chi-squared test와 Fisher's exact test로 검정하였다. 내성의 정도와 *mec R1* 유전자 보유율의 관련성에 대한 분석은 Bartholomew's test를 이용하였다. 모든 검정에서 유의수준은 5% 미만으로 하였다.

결 과

1. 메티실린 내성 정도와 β -lactamase 생성과의 관계

β -lactamase를 생성하는 균주는 고도 내성 *S. aureus* 44 균주 중에는 18균주(40.9%)였고, 중등도 내성 23균주 중 21균주(91.3%)였으며, 저도 내성 16균주 중 13균주(81.3%)였다. β -lactamase 생성율은 고도 내성 균주가 중등도와 저도 내성 균주에 비하여 유의하게 낮았다. β -lactamase를 생성하는 균주는 고도 내성 CNS 11균주 중에는 4균주(36.4%)이고, 중등도 내성 3균주 중에는 2균주(66.7%)이며, 저도 내성 15균주 중에는 14균주(93.3%)이었다(Table 1).

β -lactamase 생성율은 내성 정도가 낮은 균주에서 유의하게 높았다($P=0.004$).

2. 메티실린 내성 정도와 *mecA* 유전자 검출

mecA 유전자 양성율은 고도 내성 *S. aureus* 44균주 중에는 33균주(75.0%)이고, 중등도 내성 23균주 중에는 6균주(26.1%)이며, 저도 내성 16균주 중에는 9균주(56.3%)였다. 고도 내성 CNS 11균주 중에는 8균주(72.7%)이고, 저도 내성 CNS 15균주 중에는 12균주(80.0%)이며, 중등도 내성 CNS 3균주는 모두 음성을 나타내었다. *S. aureus*에서 고도 내성 균주에서의 *mecA* 유전자 양성율이 중등도 내성 균주에 비하여 유의하게 높았다(Table 2, Fig. 1).

3. 메티실린 내성 정도와 *mecI* 유전자 양성율과의 관계

MecA 양성 포도구균 중 *mecI* 유전자 양성율은 고도 내성 *S. aureus* 33균주 중에는 21균주(63.7%)이고, 중등도 내

Table 1. Relationship Between the Level of Resistance and β -lactamase Production in *S. aureus* and Coagulase Negative Staphylococci

Species	Resistance level	No. strain tested	No(%) positive β -lactamase(%)
<i>S. aureus</i>	High	44	18(41)
	Intermediate	23	21(91)
	Low	16	13(81)
CNS	High	11	4(36)
	Intermediate	3	2(67)
	Low	15	14(93)

성 6균주중 4균주(66.7%)이며, 저도 내성 9균주중 3균주(33.3%)이었다. 고도 내성 CNS 8균주중에는 5균주(62.5%)이고, 저도 내성 12균주중에는 4균주(33.3%)이었다(Table 2, Fig. 2). *S. aureus*와 CNS 모두에서 내성 정도와 *mecI* 유전자 양성율과의 관계는 통계적인 유의성은 없었다.

4. 메티실린 내성정도과 *mecR1* 유전자 양성율과의 관계

MecA 양성 포도구균 중 *mecR1* 유전자 양성율은 고도 내성 *S. aureus* 33균주중에는 24균주(72.7%)이고, 중등도 내성 6균주 중 메티실린 최저 발육저지농도가 64 μ g/ml인 3균주 중 2균주(66.7%)이고, 메티실린 최저 발육저지농도가 32 μ g/ml인 3균주 중 2균주(66.7%)이었다. 저도 내성 9균주 중 메티실린 최저 발육저지농도가 8 μ g/ml인 7균주 중 2균주(22.2%)에서 *mecR1* 유전자 양성율을 보였고, 메

티실린 최저 발육저지농도가 4 μ g/ml인 2균주는 모두 음성이었다(Fig. 3). 고도 내성 CNS 8균주중에는 7균주(87.5%)이고, 저도 내성 12균주 중 메티실린 최저 발육저지농도가 8 μ g/ml인 4균주 중 3균주(75%)이고, 메티실린 최저 발육저지농도가 4 μ g/ml인 4균주중 2균주(50%)에서 *mecR1* 유전자 양성율을 보였고, 메티실린 최저 발육저지농도가 2 μ g/ml인 4균주는 모두 음성이었다(Table 2). *S. aureus*와 CNS 모두에서 고도 내성 균주에서의 *mecR1* 유전자 양성율은 저도 내성 균주보다 유의하게 높았다. Bartholomew의 검정으로 내성 정도가 높아짐에 따라 *mecR1* 유전자 양성율이 높아지는 것으로 나타났다($P < 0.05$).

Table 2. Relationship Between the Level of Resistance and *mecA*, *mecI*, *mecR1* genes Amplification in *S. aureus* and CNS

Species	Resistance level	No. strain tested	<i>mecA</i>	No. strain tested	<i>mecI</i>	<i>mecR1</i>
<i>S. aureus</i>	High	44	33	33	21	24
	Intermediate	23	6	6	4	4 [*]
	Low	16	9	9	3	2 [†]
CNS	High	11	8	8	5	7
	Intermediate	3	0	0	0	0
	Low	15	12	12	4	5

^{*}MIC 64 μ g/ml; 2 strains, 32 μ g/ml; 2 strains

[†]MIC 8 μ g/ml; 2 strains

[‡]MIC 8 μ g/ml; 3 strains, 4 μ g/ml; 2 strains

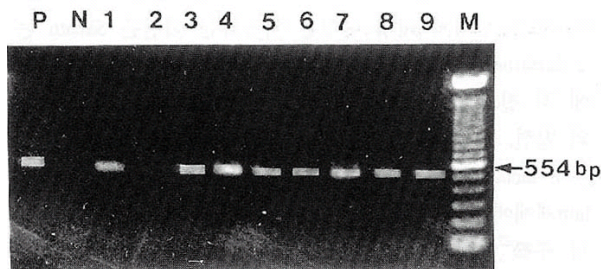


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified 554 bp fragments of the *mecA* gene. The samples in each of the lanes are follows: lane M, 100 base pair DNA ladder size marker; lane P, *S. aureus* ATCC 33591; lane N, negative control(*P. aeruginosa*); lane 1~3, high level methicillin resistant staphylococci; 4~6, intermediate methicillin resistant staphylococci; 7~9, low level methicillin resistant staphylococci.

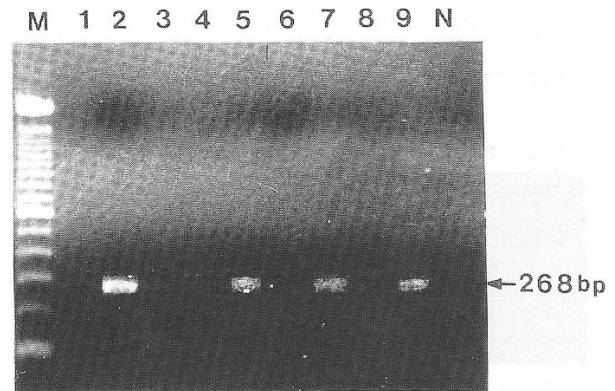


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplified 268-bp fragments of the *mecI* gene. The samples in each of the lanes are follows: lane M, 100 base pair DNA ladder size marker; lane P, *S. aureus* ATCC 33591; lane N, negative control(*P. aeruginosa*); lane 13, high level methicillin resistant staphylococci; 4~6, intermediate methicillin resistant staphylococci; 7~9, low level methicillin resistant staphylococci.

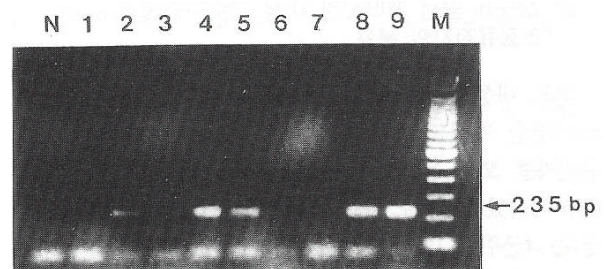


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplified 235 bp fragments of the *mecR1* gene. The samples in each of the lanes are follows: lane M, 100 base pair DNA ladder size marker; lane 9, *S. aureus* ATCC 33591; lane N, negative control(*P. aeruginosa*); lane 1~3, high level methicillin resistant staphylococci; 4~6, intermediate methicillin resistant staphylococci; 7~9, low level methicillin resistant staphylococci.

Table 3. Distribution of *mec* Regulator Genes in Methicillin Resistant *S. Aureus* and CNS

Species	Resistance level	No. strain tested	<i>mec A</i> type(%)	<i>mec A-mec R1-mec I</i> type(%)	<i>mec A-mec R1</i> type(%)	<i>mec A-mec I</i> type(%)
<i>S. aureus</i>	High	33	8(24.2)	20(60.6)	4(12.1)	1(3)
	Intermediate	6	2(33.3)	4(66.7)	0(0)	0(0)
	Low	9	5(55.6)	1(11.1)	1(11.1)	2(22.2)
CNS	High	8	1(12.5)	5(62.5)	2(25.0)	0(0)
	Low	12	7(58.3)	4(33.3)	1(8.3)	0(0)

Table 4. Relationship Between the Level of Resistance and *fem A* Gene Amplification in *S. aureus*

Resistance level	No. strain tested	<i>fem A</i>
High	23	17
Intermediate	9	4
Low	12	5

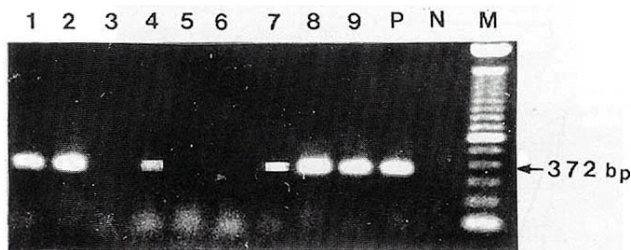


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of amplified 372 bp fragments of the *fem A* gene. The samples in each of the lanes are follows: lane M; 100 base pair DNA ladder size marker, lane N; negative control(*P. aeruginosa*), lane 1~3; high level methicillin resistant staphylococci, 4~6; intermediate methicillin resistant staphylococci, 7~9; low level methicillin resistant staphylococci.

5. *MecA* 양성 메티실린 내성 포도구균에서 *mec* 조절유전자의 분포

고도 내성 *S. aureus* 33균주 중에는 조절 유전자 없이 *mecA*만을 가진 균주(*mecA* 형)는 8균주(24.2%)이고, 조절 유전자를 모두 동반한 균주(*mecA-mecR1-mecI*형)는 20균주(60.6%)이었다. 유도 유전자만을 가진 균주(*mecA-mecR1* 형)는 4균주(12.1%)이고, 억제 유전자만을 가진 균주(*mec A-mecI* 형)는 1균주(3.0%)이었다. 중등도 내성 6균주 중에는 *mecA* 형은 1균주(16.7%)이고, *mec A-mecR1-mecI* 형은 4균주(66.7%)이었다. *mecA-mecR1* 형은 1균주(16.7%)이었다. 저도 내성 9균주 중에는 *mecA* 형은 5균주(55.6%)이고, *mecA-mecR1-mecI* 형은 1균주(11.1%)이었다. *mec A-mecR1* 형은 1균주(11.1%)이고, *mecA-mecI* 형은 2균주(22.2%)이었

다(Table 3). 고도 내성 CNS 8균주 중에는 *mecA* 형은 1균주(12.5%)이고, *mec A-mecR1-mecI* 형은 5균주(62.5%)이었다. *mecA-mecR1* 형은 2균주(25.0%)이고, *mecA-mecI* 형은 없었다. 저도 내성 12균주 중에는 *mec A* 형은 7균주(58.3%)이고, *mecA-mecR1-mecI* 형은 4균주(33.3%)이었다. *mecA-mecR1* 형은 1균주(8.3%)이고, *mecA-mecI* 형은 없었다(Table 3).

6. 메티실린 내성 정도와 *femA* 유전자 증폭과의 관계

FemA 유전자 양성율은 고도 내성 *S. aureus* 23균주 중에는 17균주(73.9%)이고, 중등도 내성 9균주 중에는 4균주(44.4%)이며, 저도 내성 12균주 중에는 5균주(41.7%)이었다(Table 4, Fig. 4). 고도 내성 CNS 6균주, 중등도 내성 2균주, 저도 내성 9균주는 모두 음성을 나타내었다. 내성 정도가 높을수록 *femA* 유전자 양성 비율은 높았으나 통계적인 유의성은 없었다.

고 찰

메티실린 내성 *S. aureus*가 메티실린을 포함한 β -lactam 항생제에 대해 내성을 획득하는 기전은 Sabath³⁾는 β -lactamase의 과잉생산, Ubukata 들⁴⁾은 β -lactam 항생제에 저 친화성을 보이는 PBP 2'를 생산하는 *mecA* 유전자의 발현, 또 Wyke 들⁵⁾은 PBP 형의 변화라고 하였다.

β -lactamase를 다량으로 생산하는 포도구균은 β -lactam제에 저도 내성으로 되는 것이 알려져있다²¹⁾. 그러나 平松²²⁾는 β -lactam제에 대한 중등도 이상의 내성은 공통적으로 PBP의 변화에 의하여 초래된다고 하였고, 權山¹³⁾는 메티실린 감수성 *S. aureus* 28균주 중 21균주(75.0%)에서 β -lactamase 양성인 반면, 최저발육저지농도가 12.5 μ g/ml 이상인 메티실린 내성 *S. aureus* 30균주 중 β -lactamase 양성인 균주는 13주(43.3%)에 불과하여 메티실린 내성 정도에 따라 β -lactamase 양성율의 차이를 보고

하였다. 본 연구에서도 *S. aureus* 고도 내성균중 β -lactamase 생성주는 40.9%에 불과하였으나, 저도 내성균에서 81.3%를 보였고, CNS 고도 내성균중 β -lactamase 생성주는 36.4%에 불과하였으나, 저도 내성균에서 93.3%를 보여(Table 1), β -lactamase의 생성율이 내성정도가 낮은 균주에서 높게 나타났으며, 메티실린 내성 *S. aureus*중 penicillinase 음성 변이주가 메티실린에 고도 내성을 보이는 능력을 가진다는 Seligman의 결과²³⁾와도 일치하였다. 이에 저자들은 저도 내성균에서는 내성 관련 유전자의 존재보다는 β -lactamase의 생산이 주된 내성 요인으로 작용하는 것으로 추측하였다.

메티실린 내성 *S. aureus*와 메티실린 내성 CNS 모두에서 공통적으로 *mecA* 유전자의 산물인 PBP 2'에 의한 내성기전이 있는 것으로 보고되어 있고²⁴⁾, 이러한 *mecA* 유전자가 cloning 되고²⁵⁾ 서열이 결정되었다⁶⁾. Tanabe 등²⁶⁾은 메티실린 내성 *S. aureus* 62균주 중에는 57균주 (91.9%)에서 *mecA*를 검출하였고, 김정만 등²⁷⁾은 메티실린 내성 *S. aureus* 40균주 모두에서 *mecA* 양성을 보고하였으며, Suzuki 등²⁸⁾은 메티실린 내성 CNS중 125균주중에는 121균주(93.4%)에서 *mecA*검출을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 고도 내성 *S. aureus* 44균주중에는 33균주(75.0%), 고도 내성 CNS 11균주중에는 8균주(72.7 %)의 낮은 *mecA* 양성율을 보였는데(Table 2), 이는 균주의 냉동, 저장, 부활의 과정에서 내성의 손실이 많이 발생하였을 것으로 추측되었으며, 이러한 *mecA* 유전자는 중등도 내성주가 저도 내성주보다 더 많이 손실이 된 것으로 추측되었다. PBP2'의 유도 생산은 β -lactam항생제에 의한 것^{29,31)}, penicillinase plasmid에 의한 것이 알려져 있다^{4,7)}. 그러나 penicillinase 음성 균주에서도 또한 PBP 2'의 유도생산이 존재하였으며 이는 PBP 2'의 표현을 조절할수 있는 다른 요소가 있음을 암시하였다^{29,30)}. 이러한 요소를 Tesch 등⁷⁾이 *S. aureus* E 67-0에서 확인한후 *mecR*이라 하였고, 이 *mecR*은 일부의 포도구균에 존재하는 것으로 특별한 유전적 배경에서 PBP 2' 합성을 강하게 억제하고 메티실린 내성 표현에 영향을 미친다고 하였다. 이 *mecR* 조절하에서의 메티실린 내성은 디스크 확산법이나 액체배지 희석법에서 *mecA* 유전자의 억제 해제(derepression)가 매우 늦게 일어나서 검출되지 못하는 경우가 있다. Ryffel 등³²⁾이 처음으로 PBP 2'의 생산이 전사 수준에서 억제 조절을 받고 있으며 두가지 종류의 *mecA* 조절기전, 즉 *mecR*에 의한 조절과 β -lactamase에 의한 조절을 밝힌 바 있고 이

*mecR*을 가진 *S. epidermidis* WT55균주에서 디스크 확산법 시 24 시간에 oxacillin에 대한 억제대가 21 mm이던 것이 48 시간에 6mm를 보여 내성 발현이 지연되었다고 하였다. 이와같이 *mecR*의 존재시 메티실린 내성 표현이 약해진다고 하였다. 이 *mecR*이 *mecA* 유전자의 상류역(upper stream)에 존재하는 2개의 유전자 *mecI*와 *mecR*으로 밝혀졌다. 이 유전자를 Hiramatsu 등⁸⁾은 cloning, sequencing하였고, 또한 *mecI*는 억제 단백 *mecI*을 코드하고, 한편 *mecR*은 PBP 2'의 생성 유도에 필요한 유도인자 단백 *mecR*을 코드하고 있으며 유도인자에 해당하는 β -lactam 제제가 MRSA와 접촉하면 *mecR*이 활성화되어 그 신호가 *mecA*의 촉진 부위에 결합하여 전사를 억제하고 있는 *mecI*에 전달되어 억제가 해제되는 것으로 설명하였다.

Hurlimann-Dalel 등³³⁾은 *mecI*와 *mecR*을 동반한 메티실린 내성 포도구균의 변화 추세를 보고하였는데, 1966년에 처음으로 분리한 후 두번째로 1972년에 분리하였으며, 1977년에 다량으로 분리하였고, 1984년에는 이 포도구균들이 전부 *mecA-mecR-mecI* 형으로 대체되었다고 보고하였다. 그후 그들은 1992년 메티실린 내성 포도구균에서 조절 유전자가 없는 *mecA* 형(117 균주)이 조절 유전자를 가지고 있는 *mecA-mecR-mecI* 형(33균주)보다 많이 분리되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 *mecA* 형은 *S. aureus*와 CNS를 포함하여 23균주였고, *mecA-mecR-mecI* 형은 34균주로 조절 유전자가 존재하는 형이 더 많이 분리되어 지역적인 특성으로 생각되었으며, 추후 우리나라에서도 이런 변화가 일어날지 관찰할 필요가 있다고 생각하였다.

메티실린 내성의 이질성 표현(heterogenous expression)은 메티실린 내성 포도구균의 대표적인 성격이다. 본 연구에서는 소수의 집락이나 엷은 증식이 억제대 속에 관찰되어 이질성이라고 추측되는 균주(4균주, 3.6%)가 조절 유전자가 있는 균주와 없는 균주 모두에서 관찰되어 조절 유전자의 유무와 내성 표현형간에 차이를 발견할 수 없었으며, 이는 Hurlimann-Dalel 등³³⁾과 Suzuki 등¹⁴⁾의 소견과 일치하는 결과였다. Hurlimann-Dalel 등³³⁾은 조절 유전자가 없는 균주에서 *mecA* 상류역의 배열 순서 상동성(sequence homology)이 높음을 발견하였다고 하면서, 조절 유전자가 있는 균주가 조절 유전자가 없는 균주보다 복잡한 유전적 배경을 가진다고 하였다.

내성의 정도는 유전적 배경에 따라 결정되는 것으로 보고되고 있다^{12, 34, 35)}. 본 실험에서 고도 내성 *S. aureus*

33균주 중 21균주(63.6%), 고도 내성 CNS 8균주 중 5균주 (62.5%)에서 *mecI* 유전자가 존재하여, Suzuki 등²⁸⁾의 고도 내성 *S. aureus* 8균주 중에는 5균주 (62.5%), 고도 내성 CNS 12균주 중에는 7균주 (58.3%)가 *mecI*를 가졌다고 보고한 성적과 유사하였다. Suzuki 등²⁸⁾은 *mecA* 유전자의 억제단백을 코딩하는 *mecI* 유전자가 고도 내성 *S. aureus*에 존재시 모두 점변이가 존재하는 것으로 보고하였으며, 완전한 *mecI* 유전자를 가지는 균주 N315에 비하여 *mecA* 유전자 전사의 기본 수준이 증가 되었다고 하였다. 본 실험에서 저도 내성 *S. aureus* 9균주 중에는 3균주(33.3%)가 *mecI*를 가져, Suzuki 등¹⁴⁾의 8균주의 저도 내성균 중 3균주(37.5%)가 *mecI*를 가졌다고 보고한 성적과 유사하였다. 그러나 본 연구에서 억제 유전자 *mecI*의 존재 유무는 내성의 정도와 유의한 연관성을 보이지 않았으며, 이는 앞으로 더 추구해야할 문제라고 사료되었다.

본 실험에서는 *mecRI* 유전자가 고도 내성 *S. aureus*의 72.7%(24/33균주)에서 나타나 Suzuki 등¹⁴⁾이 보고한 62.5% (5/8 균주)보다 더 많이 관찰되었으며, 고도 내성 CNS의 87.5%(7/8균주)에서 나타나 Suzuki 등¹⁴⁾이 보고한 75.0% (6/8균주)보다 높았다. 저도 내성 *S. aureus*는 9균주 중 2균주(22.2%)에서 *mecRI*를 가져 Suzuki 등¹⁴⁾이 8균주의 저도 내성 *S. aureus* 중 3균주(37.5%)가 *mecRI*를 가졌다고 보고한 성적보다 낮았다. 이러한 차이의 의미는 알 수 없으나 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험에서 내성 정도와 *mecRI* 유전자 검출 유무와의 관계는 통계적으로 유의하였으며, 내성 정도가 높아짐에 따라 *mecRI* 유전자의 보유율이 높아지는 것으로 나타나 고도 내성으로의 변화에 *mecRI*이 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되었다.

Suzuki 등¹⁴⁾은 메티실린 내성 *S. aureus*에서 *mec* 조절 유전자 부위의 대략적인 분류는 2가지의 형, 즉 전체적인 *mec* 조절유전자를 가지면서 *mecI*의 점변이가 존재하는 형(59.5%)과 *mecI*와 *mecRI*의 3'말단이 결손된 형(40.5%)이 있으며, CNS는 두가지 형(각각 59.3%, 18.5%) 이외에 *mecI*만 결손된 형(11.1%)과 *mecRI*의 5'말단만 가지고 나머지는 모두 탈락된 형(11.1%)의 4가지 종류를 기술하면서 메티실린 내성 *S. aureus*보다는 메티실린 내성 CNS에서 *mec* 조절 유전자 부위의 다양성이 존재하는 것으로 생각된다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 메티실린 내성 CNS에서 3가지 형이 존재한 반면(Table 3), 메티실린 내성 *S. aureus*에서 4가지 형이 모두 존재하여(Table 3) 메티

실린 내성 CNS보다는 메티실린 내성 *S. aureus*에서 *mec* 조절유전자 부위의 다양성이 존재하는것으로 생각되었다.

Berger-Bachi³⁶⁾는 *S. aureus*의 세포벽 합성에 관여하는 fem 단백질의 합성을 저해하였을때, 메티실린 내성 *S. aureus*의 약제 내성이 매우 감소함에도 불구하고 PBP 2' 단백질에는 변화가 없었다는 결과로 미루어 보아 *femA*의 활성화와 메티실린 내성 *S. aureus*의 내성 상승과의 관련이 있음을 지적하였으며, *femA*는 염색체 분절 18번에 위치하며 *mec*과는 멀리 떨어져서 존재하며 *femA*에 의해 코딩되는 48-kDa의 단백질은 메티실린 고도 내성의 표현에 필요하며, PBP2'의 합성과는 무관하다고 주장하였다³⁷⁾. 포도구균에 transposon Tn 551을 삽입시켜 *femA*를 변이시키면 포도구균의 peptidoglycan의 glycine 함량이 60%까지 감소하고, 세포벽 교체(turnover)와 세포의 자가 용해가 감소하고, β -lactam 항생제에 대한 감수성이 증가하는 것으로 알려졌다^{38, 39)}. 또한 *femA* 변이주에서는 박테리아 세포 분리의 지연으로 pseudomulticellular cell이 존재한다고 보고되었다⁴⁰⁾. 본 연구에서는 고도 내성 *S. aureus* 23균주 중 17균주(73.9%), 중등도 내성 *S. aureus* 9균주 중 4균주 (44.4%), 저도 내성 *S. aureus* 12균주 중 5균주(41.6%)에서 *femA* 유전자 양성을 나타내었으며, CNS는 내성 정도에 관계없이 모두 음성을 나타내었다. 내성 정도가 높을수록 *femA* 유전자 양성 비율은 높았으나 통계적인 유의성은 없었다. Oshima 등⁴¹⁾은 *femA* 유전자가 메티실린 내성과 감수성인 *S. aureus*에서는 검출이 되나 CNS에서는 검출이 되지 않는다고 하였으며, 본 연구에서도 같은 결과를 보여 *femA* 유전자가 *S. aureus*와 CNS를 구별하는 세균 분류상의 유용한 지표로써 생각된다.

요 약

목 적 : 저자들은 임상 검체에서 분리된 메티실린 내성 *Staphylococcus aureus* 83균주(고도 내성 44균주, 중등도 내성 23균주, 저도 내성 16균주), coagulase negative staphylococci(CNS) 29균주(고도 내성 11균주, 중등도 내성 3균주, 저도 내성 15균주)를 대상으로 β -lactamase와 내성 관련 유전자 *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *femA*가 메티실린 내성 정도와 연관을 보이는지를 규명하여 보고자 하였다.

방 법 : 메티실린 내성 검출은 디스크 확산법과 한천 희석법을 이용하였으며, 내성 관련 유전자의 검출은 중합

효소연쇄반응을 이용하였다.

결 과 : 내성의 정도와 β -lactamase 생성, 내성 관련 유전자와의 연관성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) β -lactamase 생성율은 내성 정도가 낮은 균주에서 유의하게 높았다.
- 2) *S. aureus*에서 고도 내성 균주에서 *mecA* 유전자의 양성율이 중등도 내성 균주보다 유의하게 높았다.
- 3) *S. aureus*와 CNS 모두에서 내성 정도와 *mecI* 유전자 존재 유무는 유의성이 없었다.
- 4) *S. aureus*와 CNS 모두에서 내성 정도와 *mecRI* 유전자 존재와의 관계는 내성 정도가 높아짐에 따라 *mecRI* 유전자의 양성율이 높아지는 것으로 나타났다.
- 5) *mec* 조절유전자의 분포는 메티실린 내성 *S. aureus*가 메티실린 내성 CNS보다 다양한 양상을 보여주었다.
- 6) 메티실린 내성 정도가 높을수록 *femA* 유전자 양성 비율은 높았으나 유의성은 없었다.

결 론 : 메티실린 고도 내성의 발현에는 *mecA* 유전자 뿐만 아니라 *mecA*의 조절 유전자 중 유도 유전자 *mecRI*의 존재가 중요한 역할을 할 것으로 사료되었으며, 정확한 작용 기전에 관한 추후의 연구가 필요하다고 사료되었다.

참 고 문 헌

- 1) Chambers HF: Coagulase-negative staphylococci resistant to β -lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1919-1924, 1987
- 2) Madiraju MVVS, Brunner DP, Wilkinson BJ: 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, 1987
- 3) Sabath LD: Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 97:339-344, 1982
- 4) Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, Konno M: Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mec A* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 171: 2882-2885, 1989
- 5) Wyke AW, Ward JB, Hayes MV, Curtis NAC: A role in vivo for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 119:389-393, 1981
- 6) Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsushashi M: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett* 221:167-171, 1987
- 7) Tesch W, Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B: Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mec R*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1703-1706, 1990
- 8) Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T: Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mec A* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *FEBS Lett* 298: 133-136, 1992
- 9) Hartman BJ, Tomasz A: Expression of methicillin resistance in heterogenous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 29:85-92, 1986
- 10) Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH: *Fem A*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 219:263-269, 1989
- 11) Berger-Bachi B, Strassle A, Gustafson JE, Kayser FH: Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1367-1373, 1992
- 12) Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T: Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*;36:445-453, 1992
- 13) 槇山俊伸: 메チシリン 耐性 フトウ 球菌における *mec* gene に 関する 検討. *感染症學雜誌* 67:1203-210, 1993
- 14) Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K: Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant staphylococcus clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1219-1226, 1993
- 15) Yamashita K, Takarada Y, Li L, Otsuka N, Kagawa S, Matsuoka A: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and non-radioactive DNA probes: IV. Mutational sequences in the region upstream of the *mec A* gene in clinical staphylococcal strains. *Jpn J Clin Pathol* 42:1069-1076, 1994
- 16) Kagawa S, Yamashita K, Matsuoka A: MRSA-detection of *mec A* and its regulatory genes. *Jpn J Clin Pathol* 41:1223-1231, 1993
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-fifth edition, approved standard. NCCLS Document M2-A5 Villanova, Pa, 1993
- 18) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 4th edition Villanova, Pa. 1990
- 19) York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF: Comparison

- of PCR detection of *mec A* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 34:249-253, 1996
- 20) Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J: New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1869-1874, 1989
- 21) McDougal LK, Thornsberrry C: The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 23:832-839, 1986
- 22) 平松啓一: MRSA의 分子遺傳學. *日本臨床* 50:938-944, 1992
- 23) Seligman SJ: Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature* 209:994-996, 1966
- 24) Chambers HF, Hackbarth CJ: Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogenous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1982-1988, 1987
- 25) Matsuhashi M, Song F, Ishino M, Wachi M, Doi M, Inoue M et al.: Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 167:975-980, 1986
- 26) Tanabe F, Sato T, Nozawa A, Nihonmatsy H, Okamura H, Imafuku Y et al.: The properties and *mec A* gene of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Fukushima medical college hospital. *Fukushima J Med Sci* 39: 35-42, 1993
- 27) 김정만, 久保信彦, 櫻林郁之介: PCR법을 이용한 MRSA 신속 검사법에 관한 임상적 평가. 대한 임상병리학회지 13:387-393, 1993
- 28) Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T: Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase negative staphylococci for *mec A* gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 36:429-434, 1992
- 29) Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A: Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J Clin Invest* 76:325-331, 1985
- 30) Rossi L, Tonin E, Cheng YR, Fontana R: Regulation of penicillin-binding protein activity: Description of a methicillin-inducible penicillin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 27:828-831, 1985
- 31) Murakami K, Tomasz A: Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 171:874-879, 1989
- 32) Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B: Correlation between regulation of *mec A* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 36:25-31, 1992
- 33) Hurlimann-Dalel RL, Ryffel C, Kagawa S, Yamashita K, Matsuoka A: MRSA-detection of *mec A* and its regulatory genes. *Jpn J Clin Pathol* 41:1223-1231, 1993
- 34) Murakami K, Nomura K, Doi M, Yoshida T: Production of low-affinity penicillin-binding protein by low and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1307-1311, 1987
- 35) Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B: Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:724-728, 1994
- 36) Berger-Bachi B: Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn551. *J Bacteriol* 154:479-487, 1983
- 37) Berger-Bachi B, Kohler ML: A novel site on the chromosome of *Staphylococcus aureus* influencing the level of methicillin resistance: genetic mapping. *FEMS Microbiol Lett* 20:305-309, 1983
- 38) Maidhof H, Reinicke B, Blumel P, Berger-Bachi B, Labischinski H: Fem A, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 173:3507-3513, 1991
- 39) 和田昭仁, 鈴木映子: Fem A 遺傳子の 特性と機能. *日本臨床* 50:1020-1025, 1992
- 40) Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B: Influence of fem B on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 175:1612-1620, 1993
- 41) Oshima T, Miyachi H, Fusegawa H, Masukawa A, Ikeda M, Ando Y: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by in vitro enzymatic amplification of *mec A* and *fem A* genes. *Jpn J Clin Pathol* 41:773-778, 1993