

# 메티실린 내성 황색 포도상 구균에서 mecA, femA 유전자의 임상적 의의

박정은 · 김택선 · 박수성 · 김은령

성애병원 소아과

김일수 · 안일영 · 김영진

성애 유전공학 연구소

김재종 · 강성욱 · 박한오

바이오니아 부설 연구소

## 서 론

페니실린이나 세파로스포린계 등의 베타락탐(beta-lactam)계열 항생제에 내성을 보이는 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA)은 메티실린이 임상에 사용된지 2년 뒤인 1961년 영국에서 최초로 보고되었다. 그 후 MRSA의 내성기전에 대해 많은 연구가 이루어져 1980년 Stewart와 Rosenblum에 의해 transposable element에<sup>1, 2)</sup> 내성 유전자가 존재할 것이라는 보고가 있었고 1983년 Stahl과 Pattee가 포도상 구균 염색체에서 메티실린 내성 유전자(mec)를 mapping하였다<sup>2)</sup>.

1986년 Reynold와 Fuller는 MRSA 균주에서 MSSA의 penicillin-binding protein(PBP)과는 다른 형의 PBP단백을 증명<sup>3)</sup>하는데 이 단백질은 감수상 황색 포도상 구균에 있는 다른 PBP들보다 페니실린에 낮은 친화성을 보여주었고 MSSA에는 이 PBP가 존재하지 않으며 내성 균주에만 발견됨을 알게 되었다. mecA 유전자에는 78 KD의 PBP2a 단백질 유전자가 포함되어 있다<sup>5-7)</sup>.

모든 MRSA는 mecA 유전자를 포함하고 Staphylococcus epidermidis와 같은 coagulase 음성 포도상 구균에도 포함되어<sup>9)</sup> 있는 것으로 알려졌으므로 임상에서 흔히 오염되는 coagulase 음성 포도상

구균과 MRSA를 mecA 유전자만으로 구별하기는 어렵다.

포도상 구균에도 내성기전과 관련된 femA<sup>10)</sup> 유전자가 최근 보고되어 femA 유전자는 coagulase 양성 황색 포도상 구균에만 검출된다고 알려졌다. 임상에서 MRSA의 조기검출은 항생제 선택과 치료에 중요한 의미가 있어 최근 PCR을 이용하여 유전자를 신속하게 검출할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

저자들은 임상에서 검출된 황색 포도상 구균에서 mecA, femA 유전자를 분석하여 MRSA의 조기 검출에 도움이 되는지 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 배양 및 내성검사

1996년 6월 부터 1996년 8월 사이에 성애병원에 입원한 환자의 임상 검체를 Müller-Hinton agar를 이용하여 37°C에서 48시간 배양하였으며 황색 포도상 구균으로 동정된 24개 검체를 disk diffusion법으로 억제대의 지름을 잴 후 NCCLS에서 정한 기준으로 옥사실린 내성을 판단하였다.

Table 1. Sequence of MecA and FemA Specific Primers

mecA 특이 primer set	
1차 PCR primer set (554bp)	
MR 1 : 5'-TGGATGACAGTACCTGAGCC-3'	
MR 2 : 5'-ATGAGATTAGGCATCGTTCC-3'	
2차 PCR primer set (296bp)	
MR 1 : 5'-TGGGTACAAGATGATACCTTCG-3'	
MR 2 : 5'-TAACGATTGTGACACGATAGCC-3'	
femA 특이 primer set	
1차 primer set (372bp)	
MR 3 : 5'-CATGATGGCGAGATTACAGG-3'	
MR 4 : 5'-GCTAAAGGTACTAACACACGG-3'	
2차 primer set (218bp)	
MR 3 : 5'-TGATCCTGTGCTACAAAATTCG-3'	
MR 4 : 5'-TCATCACGATCAGCAAAAGC-3'	

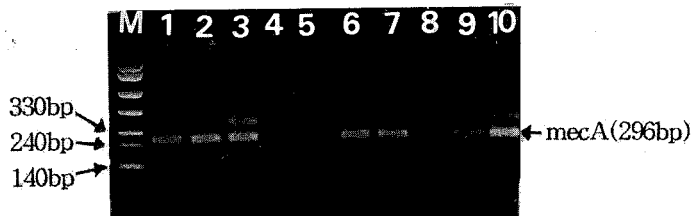


Fig. 1. mecA gene amplification.

M : DNA size marker

1 : positive control

2, 3, 6, 7, 9, 10 : positive samples

4, 5, 8 : negative samples

## 2. mecA, femA 유전자 분석

균주 plate에 PBS solution 3ml를 넣고 colony들을 잘 섞어주었다. 섞은 것 20μl를 취하고 30μl의 lysis buffer (50mM KCl, 10mM Tris (pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.45% Tween 20, 0.45% Triton X-100)에 부유시켰다. Spin down후 mineral oil을 한방울을 떨어뜨린뒤 microtube를 microwave oven에 넣고 15분간 (출력 750 watt 기준)처리하여 cell을 깨 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 microwave로 추출한 DNA 3μl를 PCR에 이용하였다. mecA, femA primer (Table 1)는 각각 20 pmol씩 사용하여 PCR을 이용하여 증폭하였다. 1차 PCR은 94℃에서 300초 동안 pre-

Table 2. PCR Condition

Predenaturation	—	94℃에서 300초
Denaturation	—	94℃에서 30초
Annealing	—	55℃에서 45초
Extension	—	72℃에서 30초

denaturation시키고 94℃에서 30초 동안 denaturation시키고 55℃에서 45초간 annealing 과정을 거쳐 72℃에서 30초간 extension시켰다. 2차 PCR도 Table와 같은 과정을 30cycles 반복하였고 각 반응물 5~10μl 씩을 2.0% agarose gel을 이용하여 DNA를 분석 하였으며 항생제 검사의 표현형과 mecA, femA 유전자 분석 결과를 비교하였다.

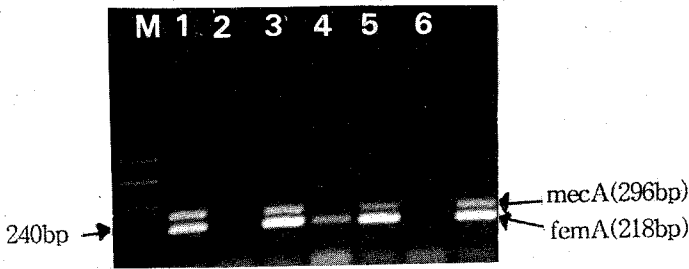


Fig. 2. Multiplex PCR of *mecA* and *femA*  
 M: size marker  
 1: positive control of *mecA* and *femA*  
 2: negative control  
 3, 5: *mecA* and *femA* positive (MRSA genotype)  
 4: *femA* positive (MSSA genotype)

Table 3. Results of *mecA*, *femA* gene by PCR Amplification

	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	<i>mecA</i> & <i>femA</i>
MRSA(n=16)	11	16	11
MSSA(n=8)	3	8	3
total(n=24)	16	24	14

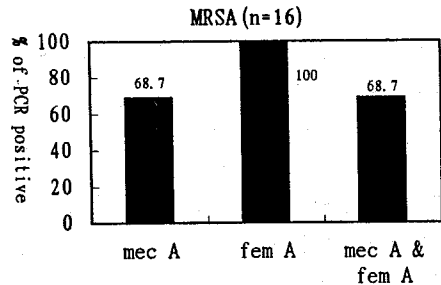


Fig. 3. Genotype of MRSA.

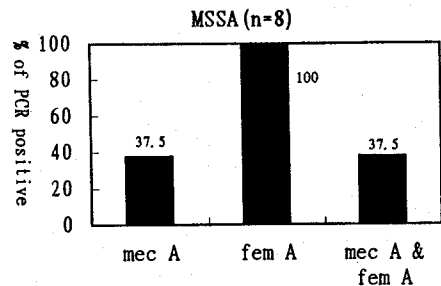


Fig. 4. Genotype of MSSA.

## 결 과

총 24검체중 oxacillin 내성검사서 16개 검체가 내성을 보였으며 8개 검체가 감수성을 나타내었다.

*mecA*와 *femA* primer로 각각 PCR을 시행하여 296bp, 218bp의 band를 얻을 수 있었다(Fig. 1). *mecA*와 *femA* primer를 한 tube에 동시에 넣고 multiplex PCR을 실시했을 때 *mecA*와 *femA* band가 크기별로 동시에 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 각각 primer로 사용한 PCR과 multiplex PCR을 각 검체당 3회씩 시행한 결과 동일한 결과가 나왔으며, 항생제 내성 검사상 메티실린 내성을 보인 MRSA 16균주 중 *mecA* 유전자는 11균주로 68.7% 였고 *femA*는 16균주로 100%였다. 반면 메티실린 감수성을 보이는 MSSA 8균주 중 *mecA* 유전자는 3균주로 MSSA의 37.5% 였고 *femA*는 8균주로 100%였다 (Fig. 3, 4)

총 24균주를 가지고 실시한 유전자 분석 결과 *femA* 유전자는 24건(100%) 의 coagulase positive

인 황색 포도상 구균 균주 모두에서 검출되었다.

## 고 찰

1940년대 초 페니실린이 발견되었고 여러 세균 특히 포도상 구균에 높은 살균력을 나타내어 세균 감염 치료에 큰 역할을 하였다. 그러나 1950년대 중반 이후에는 대부분의 세균이 페니실린에 내성을

보였고 포도상 구균에 대한 효력이 거의 상실되어 버렸다. 이러한 페니실린 내성 포도상구균에 살균력을 지닌 새로운 항생제는 메티실린이었다.

MRSA는 메티실린이 임상에 사용된지 2년 뒤인 1961년 영국에서 최초로 보고되었다. MRSA는 메티실린에 대한 내성균으로 한정되지 않고 수많은 항생제에도 고도의 약제 내성을 지닌 내성균으로, 사용가능한 항생제에 제한을 받게되었고, 항생제 선택에 어려움을 받게되었다.

MRSA의 내성기전에 대한 연구가 1960년대 이후 계속되어졌으나 내성 현상 기전 규명에 대한 연구와 노력에도 불구하고, 메티실린 내성의 유전적인 요인을 정확히 알 수 없었다. 1980년 Stewart와 Rosenblum에 의해 메티실린 내성의 유전적인 요소가 transposable element에 존재할것이라고 제안되었으며<sup>1)</sup>, 1986년 Reynold와 Füller에 의해 감수성 포도상구균에서 발견되는 PBP와는 다른 형태의 새로운 PBP가 존재함을 MRSA에서 증명함으로써 그 가능성을 뒷받침하였다.

이 PBP는 PBP2a라고도 불리며 기존의 MSSA에 존재하는 PBP보다 페니실린에 낮은 친화성을 보여 주어 MRSA의 내성기전으로 알려지게 되었다. 1986년 Matsushashi 등이 wild type MRSA의 chromosome DNA로부터 PBP를 clone하여 대장균에서 PBP를 생산하고 PBP2a, PBP2'이라고 명명하였으며, 1987년 Song 등은 PBP2a에 대한 유전자와 promotor 염기서열을 기술하였다<sup>7)</sup>. mecA 유전자는 MRSA에서 PBP2a 단백을 code하는 유전자를 포함하는 MRSA의 내성유전자임이 확인되었다<sup>11, 12)</sup>.

1987년 Mattew 등은 acriflavine을 이용하여 MRSA에서 mecA 유전자를 deletion시켜서 내성 소실을 확인하였다<sup>8)</sup>. 1987년 Henry는 beta-lactam 항생제에 내성을 보이는 coagulase 음성 포도상 구균에서도 PBP2a의 생산을 증명하였고, mecA 유전자가 메티실린 내성 황색 포도상 구균뿐만 아니라 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 coagulase 음성에도 존재함을 밝혔다<sup>9)</sup>.

최근에는 mecA뿐만 아니라 메티실린 내성과 관계된 유전자로 femA 유전자가 보고되었으며, femA 유전자는 MRSA뿐만 아니라 MSSA에도 나

타지만 coagulase 음성 포도상구균에서는 검출되지 않는 것으로 알려졌다.

이와 같은 MRSA의 기전에 대한 분자생물학적 연구로, mecA 유전자와 femA 유전자 분석을 통한 MRSA의 genotyping을 가능하게 되어, 임상검체에서 mecA, femA 유전자를 PCR에 의해 증폭함으로써 MRSA를 신속하게 검출할수 있는 가능성이 대두되었다. 이에 저자들은 임상검체에서 mecA, femA 유전자 분석이 MRSA의 조기 검출에 도움이 되는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

항생제 내성 검사상 메티실린 내성을 보이는 MRSA균주 중 mecA 유전자는 11균주로 68.7%였고, femA는 16균주로 100%였다. 반면 메티실린 감수성을 보인 MSSA 8균주 중 mecA균주는 3균주로 MSSA의 37.5%였고 femA는 8균주로 100%였다. 포도상 구균에서 femA 유전자는 표현형과 유전자형이 100% 일치하였다. 표현형이 MRSA인 균주 중 mecA는 68%가 검출되어 표현형과 유전자형의 근소한 차이를 보였다.

## 결 론

연구결과, femA 유전자는 황색 포도상 구균에서 100% 검출됨으로, femA 유전자 분석으로 황색 포도상 구균의 조기 동정에 도움이 되리라 생각된다. 항생제 내성 검사의 표현형과 mecA, femA의 유전자형 사이에는 근소한 차이를 보여 주었다. 이는 최근 보고되고 있는 mecA 유전자의 조절유전자인 mecI, mecR 등의 유전자에 의해 mecA 유전자 표현이 조절되어, 표현형과 유전자형의 차이가 보이는 것으로 생각된다.

그러므로, mecA 유전자의 조절유전자 연구와 PCR을 이용한 MRSA의 유전자 분석이 임상검체에서 MRSA의 조기검출에 도움이 되리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Stewart GC, ED Rosenblum: *Genetic behavior of the methicillin resistance determinant*

- in *staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 144: 1200-1202, 1980
- 2) STAHL. ML, PATTEE PA: Confirmation of protoplast fusion-derived linkages in *staphylococcus aureus* by transformation with protoplast DNA. *Journal of Bacteriology* 154: 406-412, 1983
- 3) Reynolds, PE, C Fuller: Methicillin-resistant strains of *staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. *FEMS Microbiol Lett* 33:251-254, 1986
- 4) Wolfgang Tesch, Anni Strassle: Cloning and Expression of Methicillin Resistance from *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus carnosus*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 32:1494-1499, 1988
- 5) Oshima T, Miyachi H, Fusegawa H, Masukawa A, Ikeda M, Ando Y: Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by *in vitro* enzymatic amplification of *mecA* and *femA* genes. *Rinsho Byori* 41:773-8, 1983
- 6) Matwuhashi M, MD Song, F Ishino, M Doi, M Inone, K Ubukata, N Yamashita, M Konno: Molecular cloning of the gene of a penicillin binding protein supposed to cause high resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 167:975-980, 1986
- 7) Song MD, M Doi, F Ishino, M Matsuhashi: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett*. 221:167-171, 1987
- 8) Inglis B, PR Matthews, PR Stewart: The expression in *Staphylococcus aureus* of the cloned DNA encoding methicillin resistance. *J Gen Microbiol* 134:1465-1469, 1988
- 9) Henry F: Chambers. Coagulase-Negative *Staphylococci* resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics in vivo produce Penicillin-Binding Protein 2a. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 32: 1494-1499, 1987
- 10) Berger-Baechi B, Barberis-Maino L, Straessle A, Kayser FH: *FemA*, a host mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 219:263-269, 1989
- 11) Brown FJ, Reynolds PE: Intrinsic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphococcus aureus*. *FEBS Lett* 122:275-278, 1980
- 12) Dyer DW, Iandolo JJ: Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 46:283-285, 1983
- 13) Georgopapadakou NH, Smith SA, Bonner DP: Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 22:172-175, 1982
- 14) Hartman BJ, Tomasz A: Low affinity penicillin-binding protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158:513-516, 1984
- 15) Hayes MV, Curtid NAC, Wyke AW, Ward JB: Decreased affinity of a penicillin-binding protein for  $\beta$ -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol Lett* 10:119-122, 1981
- 16) Utsui Y, Yokota T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 28:397-403, 1985
- 17) Trees DL, JJ Iandolo: Identification of a *Staphylococcus aureus* transposon (Tn4291) that carries the methicillin-resistance gene(s). *J Bacteriol* 170:149-154, 1988
- 18) Ubukata K, Yamashita N, Konno M: *Antimicrob. Agents Chemother* 27:851-857
- 19) Rossi L, Tonin E, Cheng YR, Fontana R: *Antimicrob. Agents Chemother* 27:828-831, 1985

= Abstract =

**Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by In Vitro Enzymatic Amplification of mecA and femA Gene**

Jung-Eun Park, M.D., Taek-Sun Kim, M.D., Su-Sung Park, M.D.  
and Eun-Ryoung Kim, M.D.

*Department of Pediatrics, Sung-Ae General Hospital, Seoul, Korea*

Il-Su Kim, M.D., Il-Young Ann and Young-Jin Kim

*Institute of Genetic Engineering research, Sung-Ae General Hospital, Seoul, Korea*

Jae-Jong Kim, Sung-Ok Kang and Han-Ho Park

*Bioneer Corp. R & D Center*

**Purpose :** In the treatment of MRSA infection, rapid detection of MRSA is extremely important. The mecA gene codes the new drug resistant polypeptides called PBP2' which mediates the clinically relevant resistance to all beta-lactam antibiotics. The identical mecA gene has been found in coagulase-negative staphylococcus with the methicillin-resistant phenotype. On the other hand, the femA gene was absent from coagulase negative staphylococcus strains with the methicillin resistant phenotype. This study is aimed at early detection and definite diagnosis of MRSA.

**Methods :** A total of 24 MRSA strains were studied. All strains were tested for antimicrobial susceptibility and purified DNA. We amplified both mecA and femA genes by PCR in 24 strains.

**Results :** In MRSA all the 16 strains (100%) carried femA gene and 11 strains (68.7%) carried mecA gene. In contrast, in methicillin sensitive staphylococcus all the 8 strains (100%) carried femA and only 3 strains (37.5%) were detected mecA.

**Conclusions :** As results, there are difference in the phenotype and genotype of methicillin resistance by PCR of mecA and femA. Such disparities between methicillin resistance and the presence of mecA gene suggest the presence of control gene of the mecA.

**Key Words :** mecA, femA, MRSA, PCR