

신생아 중환자실 환아에서 분리된 단일 클론 Toxic Shock Syndrome Toxin 1 생성 Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*

송원근, 오창희*, 김승주**, 이태재, 박민정, 신동훈, 강성하, 이규만

한림의대 임상병리학교실, 소아과학교실,* 감염관리실**

Single Clone of Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from a Neonatal Intensive Care Unit Patients

Won keun Song, Chang Hee Oh*, Seung Joo Kim**, Tae Jae Lee, Min-Jeong Park, Dong Hoon Shin, Sung Ha Kang, and Kyu Man Lee

Departments of Clinical Pathology, Pediatrics*, and Infection Control Office**, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Six babies infected with *Staphylococcus aureus* occurred in a neonatal intensive care unit (NICU) over a period of 2 months, which was successfully controlled with the aid of molecular typing of the isolates.

Methods: We examined the staphylococcal toxins, *mecA* and *tst* gene PCR, and repetitive-element PCR (rep-PCR) typing in *S. aureus* isolated from the clinical specimens of infected babies, nasal swabs of the patients and medical personnels in a NICU, and environmental equipments.

Results: Among all *S. aureus* isolates tested, they were toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)-producing methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) who have *mecA* and *tst* gene, and one identical rep-PCR pattern all, except 3 MRSA isolated from the nasal swabs of 2 non-infected patients and 1 medical personnel.

Conclusions: It was demonstrated that TSST-1 producing MRSA became epidemic in the NICU as a result of the spread of a single clone. (Korean J Clin Microbiol 2002;5(1):21-25)

Key words: Toxic shock syndrome toxin-1, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Neonatal intensive care unit, Repetitive-element PCR

서론

신생아 중환자실 환아의 병원감염이나 세균의 정착률은 매우 높으며 없애기도 매우 힘든 것으로 알려져 있다[1]. 특히 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 의한 병원감염은 면역기능이나 세균의 정상

상재균이 아직 완전히 정착화되지 않은 미숙아에게는 심각한 문제가 될 수 있다[2, 3]. 일부 *S. aureus* 균주 중에는 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), staphylococcal enterotoxin, exfoliative toxin 중 한가지 이상의 외독소를 생성하는 것들이 있다[4]. 이중 TSST-1은 독성쇼크증후군(toxic shock syndrome)뿐만 아니라 다른 *S. aureus* 감염에서도 일부 생성될 수 있으며 초항원(superantigen)의 특성이 있어 면역기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[5]. 병원감염의 역학적 조사방법으로는 항균제감수성양상, 혈청형, biotyping 등의 간편한 방법들이 있으나 분별력이 낮아[6] 최근에는 pulse-field gel electrophoresis (PFGE)와 PCR을 이용한 arbitrarily primed PCR (AP-PCR)

접수번호 : CM 5-01-04

교신저자 : 송원근

(150-071)서울시 영등포구 대림동 948-1

한림대 강남성심병원 임상병리과

Tel : (02) 829-5259 Fax : (02) 847-2403

E-mail : swonkeun@hallym.or.kr

이나 repetitive element PCR (rep-PCR) 등의 분자생물학적 방법들이 많이 이용되고 있다[7]. 본원 신생아중환자실에서 최근 2개월 사이에 6명의 환아에서 동일한 항균제감수성 양상을 보이는 MRSA가 분리되어 이들 균주를 비롯하여 의료진과 비감염 환아의 비강 및 의료장비의 감시배양을 실시하여 여기에서 분리된 MRSA균주에 대해 역학조사를 실시하고 감염균의 상호관계를 파악한 후 적절한 감염관리 조치를 취하여 병원감염을 거의 근절할 수 있었으므로 이를 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상균주

2000년 6월에서 7월 사이에 신생아 중환자실에 입원 중인 6명의 환아에서 *S. aureus* 감염증(패혈증, 4; 폐렴, 2)이 발생하여 신생아 중환자실의 환아 47명(감염 환아, 6; 비감염 환아, 41)과 직원 24명의 비강 및 의료장비 4개를 대상으로 *S. aureus* 감시배양을 시행하였다.

2. 세균학적 검사방법

채취한 검체는 혈액배지에 접종하여 35℃에서 하룻밤 배양한 후 증식된 집락이 그람양성구균이고 catalase 양성이면 Staphaurex 라텍스 응집검사(Abbott Laboratories, IL, USA)와 mannitol salt 배지를 이용하여 *S. aureus*를 동정하였고 *mecA* 유전자가 존재하면 methicillin 내성으로 판정하였다.

3. 독소검사

Staphylococcal enterotoxin type (SEA, SEB, SEC, SED), TSST-1 생성 및 exfoliative toxin type (ETA, ETB)을 검사하기 위하여 역수동(reversed passive) 라텍스 응집 독소검사 키트(SET-RPLA, TST-RPLA, EXT-RPLA; Denka Seiken, Tokyo, Japan)를 이용하여 사용설명서에 따라 각

독소의 생성 여부를 검사하였다.

4. Duplex PCR

mecA 유전자는 GMECAR-1 (5'-ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3')과 GMECAR-2 (CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3') primer를 이용하여, *tst* 유전자는 GISSIR-1 (5'-ACCCCTGTTCCCTTATCATC-3')과 GISSIR-2 (5'-TTTTCAGTATTGTAAACGCC-3') primer를 이용하여 PCR로 검사하였다. PCR 반응액은 200 μM의 deoxynucleoside triphosphates; 5 μL의 10x reaction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 500 mM KCl); 2.0 mM MgCl₂; 각각 20 pmol의 *mecA* 와 *tst* primer; 2.5 U의 *Taq* DNA polymerase를 200 ng의 template DNA와 혼합하였다. DNA 증폭은 Perkin-Elmer thermocycler 2400 (Perkin Elmer Cetus, CT, USA)을 이용하여 다음의 과정으로 시행하였다. 처음 denaturation은 94℃에서 5분간 시행한 후 35회 증폭(94℃에서 2분간 denaturation, 57℃에서 2분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension), 마지막 extension은 72℃에서 7분간 시행하였다[8].

5. Rep-PCR을 이용한 DNA 분석

200 ng의 chromosomal DNA를 rep-PCR의 template로 이용하였고 primer는 *Mycoplasma pneumoniae* repetitive sequence MP3에서 유래한 RW3A (5'-TCGCTCAAACAACGACACC-3')를 이용하였다[9]. Rep-PCR을 위한 *S. aureus* 균주의 chromosomal DNA 분리는 del Vecchio 등[10]의 방법에 따랐다. DNA 증폭은 Perkin-Elmer thermocycler 2400를 이용하여 다음의 과정으로 시행하였다. 처음 denaturation은 94℃에서 3분간 시행한 후 30회 증폭(94℃에서 1분간 denaturation, 54℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension), 마지막 extension은 72℃에서 5분간 시행하였다. Rep-PCR 산물 12 μL를 ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel에 넣어 110 V에서 3.5 시간 전기영동하였다. 100 bp DNA ladder (BRL Life Technologies Inc., MD, USA)를 DNA size standard로 이용하였다. DNA는 UV transilluminator로 관찰하고 폴라로이드 카메라(Spectroliner,

Table 1. Characteristics of the six neonates with toxic shock syndrome toxin 1-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections

Case	Birth weight (g)	Hospital days ^a	Diagnosis	Outcome
1	2,360	18	Sepsis, osteomyelitis	Recovered
2	2,230	11	Sepsis, osteomyelitis	Recovered
3	2,260	18	Sepsis	Recovered
4	2,100	12	Pneumonia	Recovered
5	1,060	6	Pneumonia	Recovered
6	1,190	25	Sepsis, meningitis	Recovered

^a Number of days in the NICU before *S. aureus* isolated

Table 2. Characteristics of staphylococcal toxins, *tst* gene and rep-PCR patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from the patients, medical personnels and equipments in a neonatal intensive care unit

Subject	Specimen	Toxin	<i>tst</i> gene	rep-PCR
Patient 1	Blood	TSST-1	+	A
	Nares	TSST-1	+	A
Patient 2	Blood	TSST-1	+	A
	Nares	TSST-1	+	A
Patient 3	Blood	TSST-1	+	A
	Nares	TSST-1	+	A
Patient 4	Respiratory	TSST-1	+	A
Patient 5	Respiratory	TSST-1	+	A
Patient 6	Blood	TSST-1	+	A
	Nares	TSST-1	+	A
Patient 7	Nares	Negative	-	B
Patient 8	Nares	TSST-1	+	A
Patient 9	Nares	TSST-1	+	A
Patient 10	Nares	SEA	-	B
Patient 11	Nares	TSST-1	+	A
Doctor 1	Nares	Negative	-	B
Doctor 2	Nares	TSST-1	+	A
Nurse 1	Nares	TSST-1	+	A
Nurse 2	Nares	TSST-1	+	A
Equipment 1	Incubator	TSST-1	+	A
Equipment 2	UV sterilizer	TSST-1	+	A

TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1; SEA, staphylococcal enterotoxin A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

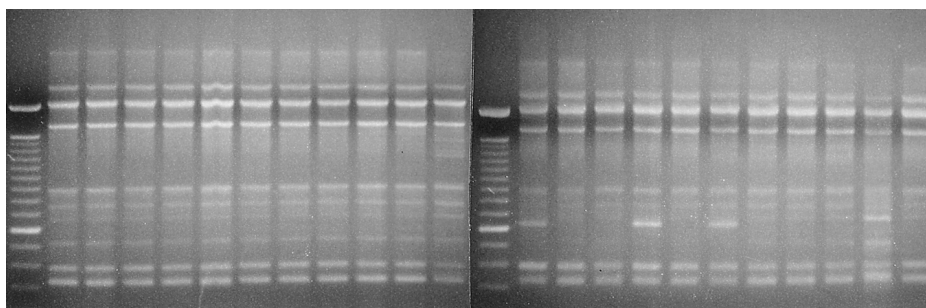


Fig. 1. Repetitive-element PCR patterns of chromosomal DNA of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the neonatal intensive care unit. Lane M is molecular weight marker (100 bp DNA ladder). Lanes 1 to 11 are isolates from six infected babies: clinical (lanes 1, 3, 5, 7, 8, and 10) and nasal isolates (lanes 2, 4, 6, 9, and 11). Lanes 12 to 16 are isolates from nasal swabs of non-infected babies. Lanes 17 to 20 are isolates from nasal swabs of medical personnels. Lanes 21 and 22 are isolates from medical equipments.

NY, USA)로 사진을 찍었다. DNA band가 하나 이상 차이가 있을 때 다른 형으로 판독하였다[9].

결 과

2개월 동안 6명의 신생아중환자실 환자에서 MRSA

감염이 발생하였다. 이중 4명은 혈액에서, 2명은 호흡기 검체에서 분리되었다. 6명의 환자 모두 저체중아이었다(1,060-2,360 g). MRSA가 분리되기까지의 입원기간은 평균 15일(6-25일)이었다. 2명과 1명이 각각 골수염과 수막염이 동반되었으나 6명의 환자 모두 vancomycin 투여 후에 회복되었다(Table 1).

MRSA감염 환자 6명 중 5명(83.3%), 신생아중환자실의 병원직원 24명 중 4명(16.7%)과 비감염 환자 41명 중 20명(48.8%)에서 MRSA의 비강정착이 있었고, 4개의 의료장비중 한 개의 incubator와 한 개의 자외선소독기에서 MRSA가 분리되었다. 분리된 MRSA 균주 중 3균주(비감염 환자 2명, 병원직원 1명)를 제외한 모든 균주가 TSST-1과 *tst* 유전자가 검출되었다. 또한 이 TSST-1 생성 MRSA 균주는 rep-PCR 결과 모두 동일한 band 형을 보였다(Table 2, Fig. 1).

고 찰

MRSA는 1980년대부터 신생아 병원감염의 중요 균주로 보고되기 시작하였고 특히, 신생아중환자실에서 흔하며 1500 g 이하의 저체중아 중 50%에서 MRSA 감염이 있었다는 보고가 있다[11]. 저자들의 경우도 MRSA 감염 환자 모두 약 2400 g 이하의 저체중아 이었다. 한국의 경우 김 등[12]은 MRSA에 의한 감염이 전체 staphylococci 감염의 58%를 차지하며 원내감염의 80%에 이른다고 하여 원내감염의 가장 중요한 원인균의 하나로 확인된 바 있다. MRSA 감염은 균 집락화에서 시작되는 것으로 알려져 있으며, 특히 비강 정착이 이와 관련이 높다[13, 14]. 본 연구에서도 MRSA 감염 환자 6명 중 5명(83.8%)에서 비강 정착이 동반되어 비감염 환자의 48.8%와 신생아중환자실 직원의 16.7%에 비해 월등히 높았다. 또한 이 MRSA 감염 환자 6명의 rep-PCR에 의한 분석 결과 모두 동일한 band 양상을 보였고, 신생아중환자실의 비감염환자와 병원직원의 비강 및 의료장비에서 분리된 MRSA 균주도 3균주를 제외하고는 모두 동일한 band 형을 보임과 동시에 이들 균주 모두 *tst* 유전자를 갖고있는 TSST-1 생성균주이었다. 따라서 의료진이나 환자에서 정착된 TSST-1을 생성하는 단일 클론의 MRSA 균주가 감염을 일으킨 것으로 판단되었다. TSST-1과 enterotoxin은 발열을 일으키는 독소 초항원으로 알려져 있다. 이러한 외독소들은 최소한 3가지의 생물학적 특징을 갖고 있다. 즉, 발열원성(pyrogenicity), 초항원성 및 내독소의 치사를 증진능력이다[15]. 특히 TSST-1은 점막의 표면을 통과하는 독특한 능력이 있고[16], TSST-1 생성을 하지 않거나 다른 독소를 갖고있는 staphylococci 감염에 비해 높은 사망률과 더 관련이 많은 것으로 보고되고 있다[17]. 저자들의 경우는 6명의 감염 환자 중 3명에서 골수염과 수막염 등의 합병증이 동반되었으나 모두

vancomycin 투여 후에 회복되었다. 그러나 TSST-1을 생성하지 않은 3균주는 모두 비감염 환자나 병원직원의 비강에서만 분리되었고 감염을 일으킨 균주는 없었다. TSST-1은 독성쇼크증후군을 일으키는 독소로 알려져 있으나 이와 무관한 *S. aureus* 감염 환자의 5-20%에서도 TSST-1이 생성된다[18].

Rep-PCR의 장점은 AP-PCR에 비해 재현성이 좋고 PFGE보다 검사가 간편하다는 점이다[9]. MRSA에 대한 rep-PCR 검사에는 inter-IS256, 16S-23S rRNA 또는 MP3가 repetitive element로 이용되고 있다. 유럽에서는 inter-IS256 PCR이 rep-MP3 PCR보다 좋다고 보고된 바 있으나, 미국의 보고는 rep-MP3 PCR의 분별력이 더 우수하다고 하여 지역에 따라 차이가 있다[9, 19].

병원 종사자나 장비에 정착된 MRSA가 환자에게 전파되는 것이 병원에서의 집단감염의 주원인인 것으로 알려져 있는데[20], 저자들의 경우도 rep-PCR 조사 결과를 볼 때 단일 클론의 TSST-1 생성 MRSA가 신생아중환자실 환자에게 연속적인 감염을 일으킨 것으로 생각된다. 이후 감염관리간호사에 의한 손 씻기 등의 병원감염 예방 교육을 실시하였고, MRSA가 정착된 환자와 신생아중환자실 직원을 대상으로 일주일간 mupirocin 연고를 비강내 도포하고 신생아중환자실 환경 소독을 실시한 결과 5개월이 지난 지금까지 더 이상의 MRSA 감염은 발생하지 않았다. 본 연구 결과로 MRSA 감염의 집단발생 시 rep-PCR 등을 이용한 분자생물학적 역학조사를 실시하여 원인균을 파악한 후 적절한 감염대책을 세움으로써 감염을 줄일 수 있다고 생각된다.

요 약

배 경 : 최근 2개월 간 신생아중환자실 환자 6명에서 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 감염이 발생하여 이들 균주와 의료진 및 의료장비의 감시배양에서 분리된 MRSA 균주를 대상으로 분자생물학적 역학조사를 실시함으로써 감염원을 성공적으로 제거할 수 있었다.

방 법 : 신생아실 환자의 *S. aureus* 감염균주, 비감염 환자와 의료진의 비강 및 의료장비에서 분리된 *S. aureus*를 대상으로 staphylococcal toxin, *mecA*와 *tst* 유전자 PCR 및 repetitive-element PCR (rep-PCR) 분석을 실시하였다

결 과 : 2명의 비감염 환자의 비강과 한 개의 의료장비에서 분리된 3주의 *S. aureus*를 제외하고 분리된 모든 *S. aureus* 균주들이 *mecA*와 *tst* 유전자를 갖고있는 toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1)을 생성하는 MRSA 이었고 이들의 rep-PCR 양상도 모두 동일하였다.

결 론 : TSST-1을 생성하는 단일 클론의 MRSA가 신생아중환자실의 환자, 직원 및 환경에 정착되어 환자의 감염원으로 작용한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Goldmann DA. *The bacterial flora of neonates in intensive care-monitoring and manipulation. J Hosp Infect* 1988;11:340-51.
2. Haddad Q, Sobayo EI, Basit OBA, Rotimi VO. *Outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect* 1993;23:211-21.
3. Haley RW, Cushion NB, Tenover FC, Bannermann TL, Dryer D, Ross J, et al. *Eradication of endemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections from a neonatal intensive care unit. J Infect Dis* 1995;171:614-24.
4. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. *Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev* 2000;13:16-34.
5. Zumula A. Superantigens, T cells, and Microbes. *Clin Infect Dis* 1992;15:313-20.
6. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Gaering R, et al. *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol* 1994;32:407-15.
7. Power EGM. RAPD typing in microbiology - a technical review. *J Hosp Infect* 1996;34:247-65.
8. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol* 2000;38:1032-5.
9. Van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, et al. *Molecular genotyping of Staphylococcus aureus strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. J Clin Microbiol* 1999;37:342-9.
10. Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, et al. *Molecular genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. J Clin Microbiol* 1995;33:2141-4.
11. Reboli AC, John JF Jr., Levkoff AH. *Epidemic methicillin-gentamicin-resistant Staphylococcus aureus in a neonatal intensive care unit. Am J Dis Child* 1989;143:34-9.
12. 김미나, 정재심, 김봉철, 송재훈, 배직현. 원내감염과 원외감염에서 분리된 원인균의 항균제 감수성 비교. *감염* 1993;25:333-42.
13. Corbella X, Dominguez MA, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallares R, et al. *Staphylococcus aureus nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:351-7.
14. 송원근, 이태재, 김승주, 박민정, 이규만. 중환자실 환자의 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* 감염: *Staphylococcus aureus* 비강 정착과의 연관성. 대한임상미생물학회지 2001;4:45-51.
15. Marrack P and Kappler J. *The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science* 1990;248:705-11.
16. Hamad AR, Marrack P, Kappler JW. *Transcytosis staphylococcal superantigen toxins. J Exp Med* 1997;185:1447-54.
17. Nada T, Ichiyama S, Iinuma Y, Inuzuka K, Washida H, Ohta M, et al. *Types of methicillin-resistant Staphylococcus aureus associated with high mortality in patients with bacteremia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:340-3.
18. Bonventre PF, Weckbach L, Harth G, Haidaris C. *Distribution and expression of toxic shock syndrome toxin 1 gene among Staphylococcus aureus isolates of toxic shock syndrome and non-toxic shock syndrome origin. Rev Infect Dis* 1989;11(Suppl 1):S90-5.
19. Deplano A, Schuermans A, van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, et al. *Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains by repetitive-element PCR analysis. J Clin Microbiol* 2000;38:3527-33.
20. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Robner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, et al. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am J Med* 1993;94:313-28.