

*Staphylococcus aureus*의 Coagulase 생성능과 R-플라스미드 분리에 관한 연구

신홍실업전문대학 임상병리학과·전국대학교 생물학과*

윤효숙·이형환*·김수영*

=Abstract=

Studies of Coagulase Production and Isolation of R-plasmid from *Staphylococcus aureus*

Hyo-Sook Yoon, Hyung-Hoan Lee* and Soo-Young Kim*

Department of Clinical Pathology, Shin Heung Junior College, Kyungido, Korea

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea*

A total of 129 clinical isolates of *Staphylococcus* species was characterized by the tests of coagulase production, haemagglutination, mannitol fermentation, DNase production and hemolysis. Ninety-nine out of them showed positive reactions to the tests, therefore they were identified as *Staphylococcus aureus*. The isolates showing positive reaction in haemagglutination test also showed 100% of tube coagulase positive reaction. The haemagglutination test was a reliable method for identifying *Staphylococcus aureus* in the clinical laboratory. *S. aureus* produced stronger hemolysis with human blood agar than with sheep blood agar.

Antibiotic resistant *S. aureus* isolates(S-46, S-112, S-126) had 4 to 6 plasmid DNA elements. The S-112 strain had 6 plasmid DNA elements(1.8, 2.2, 3.7, 26.3~50, and 70 Mdaltons), the S-126 had 4 elements(2.6, 4.2, 4.6~60Md), and the S-46 had 1 element(~100Md). PPSA strain had 4 plasmid DNA elements(2.5, 4.2, 4.6~60Md) and *S. aureus*(ATCC) strain contained 9.4, 26.3 and ~50Md plasmid DNA elements.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, coagulase, plasmids.

서 론

인체에 부스럼, 화농, 신우염 등 흔한 감염성 질환에서부터 식중독, 패혈증, 수막염, 뇌종양 및 골수염 등의 질병을 야기시키는 *Staphylococcus aureus*는 *Micrococccae* 과에 속하는 그람양성 구균이다^{1,21}. 최근에는 여성생리대인 탐폰(tampon)을 사용할 때 여기에 감염된 *S. aureus*가 분비하는 enterotoxin F에 의하여 toxic shock syndrome이 나타나는 것으로 알려져 있고, 이러한 질병에서 검출되는 *S. aureus*는 penicillin에 모두 저항성을 나타낸다고 보고되어 있다^{7,8,22}.

또한 *S. aureus*는 병원에서 감염되는 주요 세균으로, 식중독을 일으키는 enterotoxin B와 scalded

skin syndrome을 일으키는 exfoliative toxin을 생산하며, 이 독소들은 플라스미드 DNA에서 생산되는 것으로 알려져 있다¹³.

S. aureus 중에서는 종래에 사용해 온 항생제에 저항성을 나타내는 균주가 보고되고 있으며^{6,20}, 특히 최근에는 penicillin에 대한 저항성을 나타내는 균주가 거의 90%에 이르고 있고⁷, 이러한 항생제 저항성 균주의 빠른 전파는 R-플라스미드의 전달에 의한다고 알려져 있다^{5,12,24}.

오늘날 항생제에 저항성을 나타내는 균종들은 플라스미드 DNA의 상호전달(interspecific intergeneric plasmid transfer)과 전위성 DNA인자(transposable DNA element)의 기전에 의해 저항성을 갖게 되며, 이러한 R-플라스미드의 연구는 penicillinase를 생산하고 있는 플라스미드 DNA에 대해서 가장

많이 연구되어 있으며, pI524, pI258, pII147 등이 알려져 있다^{14, 15, 17}. 일본에서 분리된 erythromycin에 저항성을 나타내는 *S. aureus*는 전위성 DNA 인자에 의해 저항성을 갖는다고 하였으며^{14, 17, 19}, 한편 호주에서 분리된 methicillin에 저항성을 나타내는 *S. aureus*는 streptomycin, tetracycline, kanamycin, chloramphenicol 등에서 저항성을 나타낸다고 하였으며, 이는 염색체 DNA가 저항성에 관여한다고 보고한 반면, gentamicin에 대한 저항성의 빠른 전파는 플라스미드 DNA에 의한다고 보고된 바 있다⁸.

이러한 *S. aureus*를 비병원성인 *staphylococci*와 동정하는데, 가장 유용한 방법은 혈장을 응고시키는 효소생산을 측정하는 것이며(coagulase test), 슬라이드 혈장응고 효소시험과 시험관 혈장응고 효소시험을 사용하고 있다. 그러나 슬라이드 혈장응고 효소시험은 위양성 또는 음성결과를 초래할 수도 있으며, 시험관 혈장응고 효소시험은 약한 양성반응을 나타낼 수도 있고, 반응시간도 오래 걸리는 단점이 있다¹¹. 그러므로 보다 정확하고 빠른 시간 내에 판독할 수 있는 방법이 요구된다.

본 실험에서는 신속하고 정확한 동정을 위하여 임상검체에서 분리된 *Staphylococci*를 이용하여 종래에 사용한 슬라이드 혈장응고 효소시험과 시험관 혈장응고 효소시험 및 새로 개발된 혈구응집 반응검사(haemagglutination test)를 시행하여 효과적인 *S. aureus*의 진단방법을 조사하였으며, 더불어 *S. aureus*의 항생제 저항성을 분자적 수준에서 연구하기 위하여 플라스미드 DNA를 추출하여 비교 실험 하였고, 또한 *S. aureus*의 정확한 동정을 위하여 mannitol 분해능, 내염성, DNase 생산 및 용혈능 검사와 항생제 저항성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

임상검체에서 분리된 129주의 *Staphylococcus* species와 *S. aureus* ATCC 25923, 그리고 penicillin 저항성인 PPSA를 본 실험에 사용하였다.

2. 배양 및 동정

Brain heart infusion 배지에 증균시킨 균을 혈액 한천배지(human blood agar and sheep blood agar)에 접종하여 순수분리하고, 용혈능을 관찰하였으며, mannitol 분해능 및 내염성 검사를 위해 mannitol salt agar를 사용하였고, DNA 분해 효소 생성 시험을 보기 위하여 DNase test agar에 배양하여 이상의 배지에서 양성반응을 나타내는 균을 *S. aureus*로 추정하였다.

3. 혈장응고 효소시험과 혈장응집 반응법

깨끗한 슬라이드에 멸균 증류수를 한방울 떨어 뜨리고 그위에 혈액 한천배지에서 자란 한 개의 집락을 잘 섞은 후 신선혈장 한 방울을 첨가하여 잘 섞어 15초에서 20초 사이에 응집이 일어나는 것을 양성, 2~3분 후에 도응집이 일어나지 않는 것은 음성으로 판정하였다.

또한 멸균된 시험관에 신선혈장 0.5ml를 넣고 혈액 한천배지에서 자란 집락을 한 루푸 가득 따서 잘 풀어 혈장과 섞은 후 37°C 온수조에서 30분간격으로 4시간 동안 혈장응고를 관찰하였다. 4시간 안에 반응이 없으면 24시간 후 판독하며, 피브린 응고가 일어나면 양성으로 응고가 없으며 음성으로 판정하였다.

혈구응집 반응법은 면양혈구에 피브리노젠을 감작시켜 만든 staphyslide test kit(bioMérieux, France)와 *S. aureus*의 단백질 수용체가 반응하여 혈구응집 반응을 일으키는 방법으로 15초 안에 응집이 일어나면 양성으로 판정하였다.

4. 항생제 감수성 검사

Kirby-Bauer 법에 따라 Mueller-Hinton 평판배지에 MacFarland tube No. 1/2에 맞춘 균액을 멸균된 면봉으로 빈틈없이 접종한 후, 각각의 항생제 디스크(BBL 제품)를 일정한 간격으로 놓고 37°C에서 18~24시간 배양하여 발육억제대를 정확히 측정하여 항생제 감수성 검사를 시행하였다.

5. 플라스미드 DNA 분리

플라스미드 DNA는 Lyon 등¹³, Gillespie 등⁸의 방법을 수정하여 이용하였다. 250ml의 삼각 플라스크에 50ml의 LB 배지를 제조하여 멸균한 후, 균

Table 1. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* isolates

No. of isolates	Reaction results	Mannitol fermented	DNase production	NaCl tolerance	Coagulase production		Haemagglutination
					Slide test	Tube test	
129	Positive	110	104	129	102	99	105
	Negative	19	25	0	27	30	24

을 접종하고 37°C에서 16시간 동안 100r.p.m.으로 진탕 배양하였다. 배양된 균체를 3,000r.p.m.으로 15분간 원심분리 하여(Hettich universal)균체를 모은 후 이것을 10ml의 TES(50mM Tris · Cl, 5mM EDTA, 50mM NaCl, pH 8.0)로 2회 세척하였다. 세척된 균체에 100 μ l의 lysostaphin(Sigma, 2mg/ml in 10mM Tris · Cl, 1mM EDTA, pH 8.0, 25% W/V, sucrose)을 첨가하고 37°C에서 1시간 배양시킨 후 4% SDS, 0.2N NaOH 혼합용액을 4ml 첨가하여 알칼리 처리한 후 얼음위에서 30분 세워두었다. 균분쇄액에 3M K-acetate를 3ml 첨가하여 중화시킨 후 5M NaCl 1.5ml를 첨가하여 4°C에서 16~18시간 방치시키고, 12,000 \times g로 30분간 원심분리한(Centrifon H-401) 상층액에 RNase(Sigma type I, 10mg/ml in 10mM Tris · Cl, pH 7.5, 15mM NaCl)를 50 μ l 첨가한 후 30분간 반응시키고, proteinase K(20mg/ml in H₂O)를 15 μ l 첨가하여 1시간 반응시켰다. 이 용액을 phenol/chloroform(1:1, V/V)용액으로 1회 정제시키고, ethanol침전을 시켜 얻은 DNA pellet에 TE(10mM Tris · Cl, 1mM EDTA, pH 8.0) 300 μ l로 녹인후 전기영동으로 플라스미스 DNA 양상을 조사하였다. 전기영동은 TBE buffer(89mM Tris, 89mM Boric acid, 2.5mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 0.7% agarose gel을 조성한 후 70V에서 5시간 전개시켰다.

성 적

임상검체에서 분리된 129주의 *Staphylococci* 분리균을 동정한 결과 mannitol을 분해한 것은 110주였고, 7.5% NaCl농도에서도 성장한 균은 129주

이었으며, DNase 시험에서 양성을 나타낸 것은 104주였다. 또한 혈장응고 효소시험의 결과는 총 129개의 주중 슬라이드 시험에서 양성을 나타낸 것은 102주이며, 시험관내 반응에서 양성을 나타낸 것은 99주였다. 반면 혈구응집 반응시험에서는 양성을 나타낸 것은 105주였다.

이상의 시험에 모두 양성반응을 나타낸 균주는 99주로 이들 균주를 *S. aureus*로 동정하였다(Table 1).

그리고 시험관 혈장응고 효소시험 결과로 얻은 99양성 분리균주와 30음성 분리균주를 슬라이드 혈장응고 효소시험 및 혈구응집 반응시험과 비교한 결과 Table 2에서와 같이 시험관 혈장응고 효소시험에서 양성으로 나타난 99분리균주는 슬라이드 혈장응고 효소시험에서 97개의 균주가 양성으로 판명된 반면 2균주가 음성으로 나타났으며, 혈구응집 반응시험에서는 99분리균주 모두 양성인 것으로 나타났다. 한편 시험관 혈장응고 효소시험에서 음성으로 나타난 30분리균주는 슬라이드 혈장응고 효소시험에서 5분리균주는 양성으로 25분리균주는 음성으로 나타난 반면, 혈구응집 반응시험에서는 6분리균주가 양성으로 24개 분리균주가 음성으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 혈구응집 반응시험이 시험관 혈장응고 효소시험과 비교할 때 위양성 반응은 나타냈으나 양성반응이 100% 일치하므로 특이성이 좋게 나타났다.

시험관 혈장응고 효소시험에서 양성으로 나타난 99분리균주를 30분 간격으로 4시간 동안 조사한 결과 Table 3과 같이 30분 반응시 양성으로 나타난 것은 9균주이었으며, 60분에서는 75균주, 90분

Table 2. Comparison of the results shown by coagulase test methods and haemagglutination test

Test methods	No. of isolates screened the tube coagulase test		Total no. of isolates Screened
	Positive	Negative	
	99	30	129
Slide coagulase test	Positive	5	102
	Negative	2	27
Haemagglutination test	Positive	6	105
	Negative	0	24

Table 3. The most adequate time to read the results of the tube coagulase test

No. of isolates	Time of maximal coagulase positive reaction					
	30min	60min	90min	120min	150min	24hr
99	9	75	10	2	1	2

에는 10균주, 120분 후에는 2균주, 150분 후에는 1균주이었으며, 2균주는 24시간 후에 양성반응을 나타냈다. 시간에 따른 혈장응고 효소시험은 60분에서 가장 많이 양성반응을 나타냈다.

위시험 방법에서 모두 양성으로 나타난 99분리균주의 용혈능을 관찰한 결과 Table 4와 같이 사람의 혈액이 첨가된 배지에서 93.9%의 용혈능을 나타냈고, 면양혈액이 첨가된 배지에서는 89.9%의 용혈능이 있었으며, 용혈을 일으킨 반응정도도 사람의 혈액이 첨가된 배지에서 더 뚜렷하게 나타났다. 또한 혈액 한천배지에서 *S. aureus*가 나타내는 색소 생성능도 사람혈액이 첨가된 배지에서는 전형적인 황금색 집락을 형성한 것에 비해 면양혈액이 첨가된 배지에서는 색소생성능이 거의 없었다.

*S. aureus*로 분리된 균주중 임의로 선택한 5균주와 항생제에 감수성을 나타내는 ATCC 25923 그리고 penicillin에 저항성을 나타내는 PPSA 균주등 7개 균주를 사용하여 Kirby-Bauer 법에 의한 항생제 감수성 검사를 실시한 결과 Table 5와 같이 ATCC 25923균주를 제외한 6개의 균주는 penicillin에 저항성을 나타냈으며, ampicillin에서도 6균주 모두 마찬가지로 나타났다. 그러나 amikacin에는

7균주 모두 감수성인 결과를 보였다.

5균주의 *S. aureus*로부터 분리한 플라스미드 DNA를 0.7% agarose gel에서 70V로 5시간 전개시킨 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 모든 항생제에 감수성을 나타내는 *S. aureus* ATCC 25923균주 (lane A)는 3 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었고, 분리균주 S-112(lane B)는 6 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었으며, 분리균주 S-126(lane C)은 4 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었다. 또한 penicillin에 저항성을 나타내는 대조균주인 PPSA (lane D)는 4 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었으며, 분리균주 S-46(lane E)은 한 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었다.

Table 4. Comparison of hemolysis produced on human blood and sheep blood agar by the *Staphylococcus aureus* isolates

Hemolysis	Human blood agar*	Sheep blood agar*(%)
Positive	93(93.9)	89(89.9)
Negative	6(6.1)	10(10.1)
Total	99	99

*The results determined by the naked eye readings, and judged as positive when the hemolysis was occurred.

Fig. 1. Plasmid DNA patterns of *Staphylococcus aureus* strains. lane A: *S. aureus* ATCC 25923 (P sensitive), B: S-112, C: S-126, D: PPSA, E: S-46, Chr.: Chromosomal DNA.

Table 5. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains

Strains	Antibiotics	P	K	Ce	G	Cl	Em	M	N	Ap	Cm	Tc	An*
S-20		R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
S-46		R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
S-81		R	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S
S-112		R	R	S	R	S	R	I	S	R	R	R	S
S-126		R	S	S	S	S	S	I	S	R	S	R	S
PPSA		R	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S
ATCC 25923		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*P: penicillin, K: kanamycin, Ce: cephalothin, G: gentamicin, Cl: clindamycin, Em: erythromycin, M: methicillin, N: neomycin, Ap: ampicillin, Cm: chloramphenicol, Tc: tetracycline, An: amikacin, R: resistant, S: sensitive, I: intermediate.

Table 6. Plasmid numbers and estimated size of extrachromosomal DNA of *Staphylococcus aureus* by 0.7% agarose gel electrophoresis

Strains	No. of plasmids	Molecular weight ($\times 10^6$ daltons)
ATCC 25923	3	9.4, 26.3, ~50
S-112	6	1.8, 2.2, 3.7, 26.3, ~50, ~70
S-126	4	2.6, 4.2, 17.7, ~60
S-46	4	2.6, 4.2, 4.6, ~60
PPSA	1	~100

각각의 플라스미드 DNA에 대한 분자량을 측정 한 결과 Table 6과 같이 ATCC 25923의 플라스미드 DNA는 9.4, 26.3, ~50Md으로 나타났으며, S-112균주의 플라스미드 DNA는 1.8, 2.2, 3.7, 26.3, ~50, ~70Md인 것으로 나타났고, S-126균주의 플라스미드 DNA는 2.6, 4.2, 17.7, ~60Md인 것으로 나타났다. 한편 penicillin에 저항성을 나타내는 PPSA균주의 플라스미드 DNA는 2.6, 4.2, 4.6, ~60Md인 것으로 나타났으며, S-46균주의 플라스미드 DNA는 매우 큰 ~100Md의 플라스미드 DNA인 것으로 나타났다.

고 찰

*S. aureus*는 혐기적인 상태에서도 mannitol을 분해하여 산을 생성하며^{11, 12}, 혈장응고 효소시험에서 양성을 나타내므로 *S. aureus*를 비병원성 *Staphylococci*와 동정하는데 혈장응고 효소시험과 mannitol 분해능 시험을 주로 이용하여 동정하고 있다^{3, 9}.

한편 *S. aureus*는 형특이 항원(group-specific antigen)인 protein A를 갖고 있으며, 이 protein A와 혈장응고 효소능과는 서로 상관관계가 있는 것으로 보고되어 있으며¹, Dibb 등¹⁰에 의하면 시험관 혈장응고 효소시험은 반응균주의 절반이상이 2시간 정도에서 양성반응을 나타낸다고 보고한 반면, 본 실험에서는 1시간에서 86%, 2시간에서 97%가 양성반응을 나타냈다. 이 점은 Sperber 등²⁰이 *S. aureus*의 99%가 2시간 안에 양성반응을 나타낸다는 보고와 일치하는 것이었다.

또한 신속 동정법인 간접 혈구응집 방법은 균체의 양이 적으면 반응이 약하고 지연되는 경우가 있어 잘못된 결과를 나타낼 수 있다³. 그러나 본 실험에서 사용한 혈구응집 반응시험은 시험관 혈장응고 효소시험과 비교할 때 위양성은 있었지만, 시험

관 혈장응고 효소시험에 양성으로 나타난 99분리균주에 하나의 오차도 없이 모두 양성을 나타냈다(Table 2).

Essers 등⁴과 Barryett⁵ 등은 혈장으로 코팅된 latex particle을 이용하여 응고인자(clumping factor)와 protein A를 1분안에 검출하는 신속응집법(latex agglutination test)을 시도한 결과와 혈장응고 효소시험의 결과는 서로 97%의 상관관계가 있음을 보고하였다.

이러한 점들을 고찰할 때 본 실험에서 혈구응집 반응시험은 15초 이내에 반응을 판독할 수 있다는 점을 고려하면, latex agglutination test보다 더 민감한 방법이라고 생각하며, 종래의 혈장응고 효소 시험보다 짧은 시간내에 정확히 *S. aureus*를 동정하는데 유용한 방법이라고 생각한다.

그리고 본 실험에서 5균주의 플라스미드 DNA양상(Fig. 1, Table 6)과 항생제 감수성 결과(Table 5)를 살펴보았을 때 penicillin, kanamycin, gentamicin, erythromycin, ampicillin, chloramphenicol, tetracycline 등 7종류의 항생제에 내성을 가진 균주는 S-112분리균주였으며, 1.8, 2.2, 3.7, 26.3, ~50, ~70Md의 분자량을 갖는 6종류의 플라스미드 DNA가 존재하는 것으로 나타났고, 분리균주 S-126은 penicillin, ampicillin, tetracycline의 3종류의 항생제에 저항성을 나타냈으며, 2.6, 4.2, 17.7, ~60Md의 분자량을 갖는 4종류의 플라스미드 DNA가 존재하는 것으로 나타났다. 또한 분리균주 S-46은 penicillin과 ampicillin의 2종류의 항생제에 저항성을 나타냈으며, ~100Md의 거대한 분자량을 갖는 1종류의 플라스미드 DNA가 존재하는 것으로 나타났다. Penicillin에 저항성을 나타내는 대조균주로 사용한 *S. aureus*(PPSA)는 penicillin과 ampicillin 2종류의 항생제에 저항성을 나타냈고, 2.6, 4.2, 4.6, ~60Md의 분자량을 갖는 4종류의 플라스미드 DNA가 존재하는 것으로 나타났으며, 모든 항생제에 감수성을 나타내는 *S. aureus* ATCC 25923균주는 9.4, 26.3, ~50Md의 분자량을 갖는 3종류의 플라스미드 DNA를 갖고 있는 것으로 나타났다.

S-112분리균주의 플라스미드 DNA는 6종류가 분리되며, 7종류의 항생제에 저항성을 나타내는 반면, S-126분리균주의 경우 4종류의 플라스미드 DNA가 분리되며, 3종류의 항생제에 저항성을 나타내는 것으로 보아서 여러 종류의 플라스미드가 존재하면 여러 종류의 항생제에 저항성을 나타내는 것으로 생각되며, 이 점은 각각의 플라스미드 DNA가 서로 다른 항생제 저항성에 관여함을 암시하는

것이라고 생각한다.

그런데 Lacey와 Rosdahl은¹⁰⁾ *S. aureus*로 부터 penicillinase를 생산하고 있는 플라스미드 DNA의 분리와 이 플라스미드 DNA의 자연상태에서의 전이에 대하여 연구한 결과 이 플라스미드 DNA의 분자량은 16×10^6 달톤이며, Cd²⁺과 fusidic acid(ramycin), penicillin에 저항성을 나타내는 유전인자를 포함하고 있고, 이 유전자는 자연상태에서 전이된다고 보고하였다.

한편 Wilson과 Baldwin은²⁶⁾ *S. aureus*에서 cloning vehicles의 구조와 특성에 관한 연구에서 tetracycline 저항성을 나타내는 4균주의 *S. aureus*에서 2.9Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA를 분리하였으며, 또한 chloramphenicol에 저항성을 나타내는 4균주의 *S. aureus*로부터 2.6Md(pCW 6), 2.8Md(pCW 7), 1.9Md(pCM 8)과 2.9Md(pC 221)의 분자량을 갖는 4개의 플라스미드 DNA를 분리하였다.

그리고 Novick 등¹⁷⁾은 *S. aureus*의 penicillinase 플라스미드 DNA에 관한 연구에서 penicillinase에 관계하는 플라스미드 DNA인 pI 258(MW; 28.2 Kb)과 pI 147(MW; 32.6 Kb)을 분리하고, 이것에 대해 제한효소를 이용하여 유전자 지도를 조사하였으며, Lyon 등¹⁴⁾은 항생제에 다제내성을 갖는 *S. aureus*에 대해 연구한 결과 15~22Md의 플라스미드 DNA와 gentamicin, kanamycin, tobramycin의 저항성에 관계되어 있는 3Md의 플라스미드 DNA 및 1Md의 기능이 알려지지 않은 플라스미드 DNA 등이 있음을 밝혔다.

또는 Gillespie 등⁹⁾은 methicillin에 저항성을 나타내는 *S. aureus*의 플라스미드 양상과 항생제 감수성에 대한 연구에서 20Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA는 중금속에 저항성을 나타내며, penicillinase생성에 관여하는 유전자를 암호화하고 있다고 밝혔으며, 2.8Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA는 tetracycline의 저항성에 관계하는 것이며, 18Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA는 tobramycin과 kanamycin에, 3Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA는 chloramphenicol의 저항성에 관계하는 것이라고 밝혔다.

최근에 Gillespie 등⁹⁾은 항생제에 저항성을 나타내는 *S. aureus*로부터 혼합배양 전이(mixed-culture transfer)와 제한효소(restriction endonuclease) 분석 방법을 이용하여 penicillin과 중금속에 저항성을 나타내는 15~23Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA와 tetracycline에 저항성을 나타내는 2.8Md의 분자량을 갖는 플라스미드 DNA를 보고한 바 있

다.

이러한 점을 고찰할 때 여러 연구자들에 의해 분리된 플라스미드 DNA는 수와 크기에 대해 각각 다르게 나타났으며, 이 점은 본 실험에서 얻은 결과와 상이함을 나타냈다. 이 점은 플라스미드 DNA가 세균체 안에서 매우 불안정한 상태로 존재하고 있는 것으로 생각되며, 또는 "F" 플라스미드 DNA와 같이 염색체 속에 삽입되는 능력을 갖고 있기 때문인 것으로 생각한다.

그리고 각각의 플라스미드 DNA가 어떤 항생제의 저항성에 관여하는가를 조사하기 위해서는 각 플라스미드 DNA를 혼합배양 전이실험과 형질전환 실험을 병행한 연구가 시행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

임상검체에서 129개의 *Staphylococcus* species를 분리하여 이중 *Staphylococcus aureus*를 정확하게 신속하게 분리 동정하기 위하여 혈구응집 반응시험과 혈장응고 효소생성시험을 비교 조사하였고, 계속 증가하고 있는 *Staphylococcus aureus*의 여러 항생제에 대한 저항성 균주의 R-플라스미드의 존재를 연구하였다.

1. 129개의 임상검체 중에서 생화학적 특성 및 혈장응고 효소시험과 혈구응집 반응시험에 모두 양성반응을 일으키는 99균주를 *Staphylococcus aureus*로 동정하였다.

2. 혈구응집 반응시험은 시험관 혈장응고 효소시험의 양성반응 균주 모두에 100% 일치율을 보여주어 특이성이 좋았으며, 짧은 시간내에 *Staphylococcus aureus*를 정확히 동정할 수 있었다.

3. 용혈능 시험은 사람혈액이 첨가된 배지가 면양 혈액이 첨가된 배지에서 보다 강하고 뚜렷하게 일어났다.

4. 임상검체에서 분리한 항생제 내성을 나타내는 *Staphylococcus aureus*의 플라스미드 양상은 S-112균주에서 1.8, 2.2, 3.7, 26.3, ~50, ~70Md의 분자량을 나타내는 6종류의 플라스미드 DNA가 분리되었으며, S-126균주에서 2.6, 4.2, 17.7, ~60Md의 분자량을 갖는 4종류의 플라스미드 DNA가, S-46에서 ~100Md의 거대 분자량을 나타내는 한 종류의 플라스미드 DNA가, penicillin에 내성을 갖는 PPSA에서 2.6, 4.2, 4.6, ~60Md의 분자량을 나타내는 4종류의 플라스미드 DNA가 분리되었다. 반면 모든 항생제에 감수성을 나타내는 *S. aureus* ATCC 25923 표준균주는 9.4, 26.3, ~

50Md의 분자량을 나타내는 3 종류의 플라스미드 DNA가 분리되었다.

REFERENCES

- 1) Baird-Parker AC: The classification of *Staphylococci* and *Micrococci* from world-wide sources. *J. Gen. Microbiol.* **38**:363, 1965.
- 2) Barryett AM and Paul DE: Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:275, 1982.
- 3) Dibb WD, Hellum KB, Østervold B and Oeding P: Comparison of four methods for differentiation of *Staphylococcus aureus* from other *Micrococcaceae* in the routine laboratory. *Acta. path. microbiol. immunol. scand.* **91**:307, 1983.
- 4) Essers L and Radebold K: Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **12**:641, 1980.
- 5) Gillespie MT, May JW and Skurray RA: Antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **17**:295, 1984.
- 6) Gillespie MT, May JW and Skurray RA: Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated at an Australian hospital between 1946 and 1981. *J. Med. Microbiol.* **19**:137, 1985.
- 7) John N. Sheagren: Medical progress *Staphylococcus aureus*. *The New England J. Medicine* **310**:1437, 1984.
- 8) Jolik, Willet, Amoës: Zinsser microbiology. 8th ed. Appleton Centry Crofts. Norwalk, Connecticut, 1984.
- 9) Kloos WE and Schleifer KH: Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **1**:82, 1975.
- 10) Lacey RW and Rosdahl VT: An unusual "Penicillinase plasmid" in *Staphylococcus aureus*; evidence for its transfer under natural conditions. *J. Med. Microbiol.* **7**:1, 1974.
- 11) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ and Jean SH: Manual of clinical microbiology. 4th ed. A.S.M., Washington, D.C. 1985.
- 12) Lyon BR, Iuorio JL, May JW and Skurray RA: Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australian hospitals. *J. Med. Microbiol.* **17**:79, 1984.
- 13) Mass WK: Genetics of bacterial virulence in genetics as a tool in microbiology. **31**:341. Cambridge University Press 1981.
- 14) Murphy E and Novick RP: Physical mapping of *Staphylococcus aureus* penicillin plasmid pI 524 characterization of an invertible region. *Mol. Gen. Genet.* **175**:19, 1979.
- 15) Novick RP and Richmond MH: Nature and interactions of genetic element governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **90**:467, 1965.
- 16) Novick RP: Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Fed. Proc.* **26**:29, 1967.
- 17) Novick RP, Murphy E, Gryczan TJ, Baron E and Edelman I: Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: Restriction-deletion maps. *Plasmid* **2**:109, 1979.
- 18) Novick RP, Edelman I, Schwesinger MD, Gruss AD, Swanson EC and Pattee PA: Genetic translocation in *Staphylococcus aureus*. *Prep. Nat. Acad. Sci.* **76**:400, 1979.
- 19) Pattee PA, Thompson NE, Handbrich D and Novick RP: Chromosomal map locations of integrated plasmids and related elements in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **1**:38, 1977.
- 20) Pavillard R, Harvey K, Douglas D, Hewstone A, Andrew J and Collopy B et al: Epidemic of hospital-acquired infection due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in major victorian hospital. *Med. J. Australia* **1**:451, 1982.
- 21) Peter HA, Nicholas SM, Elisabeth SM and John GH: Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins 1986.
- 22) Sperber WH and Tatin SR: Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**:502, 1975.
- 23) Todd J. Fishaut M and Capral F et al: Toxic shock syndrome associated with phage group I *Staphylococci*. *Lancet* **2**:1116, 1978.
- 24) Townsend DE, Grubb WB and Ashdown N: Gentamicin resistance in methicillin resistant

Staphylococcus aureus. *Pathology* **15**:169, 1983.
25) Wilson CR and Baldwin JN: Characterization
and construction of molecular cloning vehicles

within *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*
136:402, 1978.