

## Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus* 의 검출을 위한 분자유전학적 기법에 관한 연구

조태흠<sup>†</sup> · 김민정 · 오양호

부산대학교 의학과 미생물학교실

### Comparison between Dot Blot Hybridization and Southern Blot Hybridization in Detecting Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

Tae-Hum Cho<sup>†</sup>, Min-Jung Kim and Yang-Hyo Oh

Department of Microbiology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan 604-739, Korea

#### Abstract

Thirty strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* were obtained from the clinical isolates. In order to investigate the pursuit of the pathogens of nosocomial infection, these strains were studied for antibiotic sensitivity as well as its resistant pattern. Among the methods of hybridization which directly confirm the specific antibiotic resistant genes by means of the recently developed specific probe DNA, dot blot hybridization and southern blot hybridization were performed and these two methods were compared in their sensitivity and specificity. Strains that is sensitive to cephalothin to the subject of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* were in 43%. Those that are sensitive to cefoperazone and cefuroxime were 26% and 23%, respectively. In case of MIC, MIC<sub>50</sub> of cefoperazone was 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and MIC<sub>90</sub> was 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to be the lowest. As the results of plasmid DNA electrophoresis, most of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains had more than 4 plasmids. These plasmids digested by *Bam*HI, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* is distributed as 10 fragments with the size of 65 kb to 1.5 kb. Dot blot hybridization were performed to examine the existence of *mecA* gene to show the detection rate of 50%. Southern blot hybridization were done to see if DNA bands which amplify the activity of digoxigenium-labeled probe by PCR were actually PCR products of *mecA* gene and it showed the detection rate of 53%. It can be concluded that the southern blot hybridization seemed to be better in sensitivity and specificity when it is compared with the results of dot blot hybridization.

**Key words** – Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *MecA*, Southern blot hybridization, Dot blot hybridization

#### 서 론

병원내에 정착된 각종 세균에 의해서 입원 후 감염이

유발된 것을 원내감염(nosocomial infection)이라 정의한다 [2]. 원내감염을 일으키는 원인균은 각종 그람음성균들과 황색포도구균이 우위를 점하고 있다[17]. 항균제 구입이

<sup>†</sup> Corresponding author

자유로운 실정에서 적절한 세균학적인 검사 없이 항생제를 투약하여 약제에 대한 항생제 남용 내지는 오용의 문제점이 있다. 이러한 문제점으로 즉시 및 지연형 과민증이나 인체의 정상균총의 변화로 인한 약제 내성균의 교대 감염 질병의 발생빈도가 증가할 수 있다. 뿐만아니라 임상가검물에서 분리한 균주에서 주로 나타나는 항생물질 내성균주의 발견이 환자들에게 중증의 감염증을 발생하는 경우와 다량의 염증성 삼출물이나 창상 부위의 염증 등으로 세균감염이 육안적으로 확산되는 경우가 자주 발생되는 추세이다[7,25,37]. 이들 균종의 공통성은 항생제에 중복내성을 보인다는 것이며, 균 종 자체의 병원성보다도 고도의 항생제 내성이 문제가 되고 있다[15]. 이러한 원내감염균들 가운데 그람음성균들이 패혈증을 발생했을 경우는 치명적인 결과를 초래할 수 있다.

특히 수술 후 창상감염이 원인이 된 원내감염으로 사망하는 경우가 있고 항생제 치료의 효과를 볼 수 없는 치료상의 어려움을 수반하게 된다. 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*중에서도 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 피부 연조직 감염, 균혈증 및 폐렴 등의 중증 감염증을 일으키는 병원체로 오래전부터 중요성이 인식되어 왔다[15].

항생제가 개발되어 세균성 감염증의 치료에 새로운 전기가 마련되었으나, 약제에 대한 다제 내성을 획득됨에 따라 여전히 중요한 병원체로 남아 있는 실정이다. 따라서 병원내 환경에서 이들 균의 동정과 항생제 내성 유전자의 cloning에 가장 신속한 방법의 확립이 무엇보다도 시급한 문제이다[5]. 그리고 각 종 방법에 따른 정확성을 비교하여 원내 감염균이 어떤 항생제의 내성 유전자를 보유하고 있는 지를 최단 시간내 신속한 진단과 동시에 치료가 가능하다고 보겠다. 기존의 역학조사에서 plasmid양상 조사나 plasmid를 이용한 분자적 분석은 비교적 단순하고 형별법이 확립되어 있지 않은 균종에도 적용할 수 있는 감별법으로 알려지고 있다[4,19,32]. 이 방법은 주로 한정된 지역에서 나타나는 집단적인 발생시 원인 균주의 추적에 이용되어 왔지만 최근에는 비교적 광범위한 지역에서 분리되거나 유래가 전혀 다른 균주의 감별에도 이용될 수 있다고 보고되고 있다[8]. 그러나 때때로 plasmid에 나타나는 전위(translocation)나 조합(recombination) 등 분자적 변화는 결과 분석을 다소 모호하게하여 DNA-hybr-

idization법과 같은 보조적 방법을 필요로 하며 일부 균주에서는 plasmid를 보유하지 않는 관계로 기존의 형별 방법과 병용해야 할 경우도 있다[24,28].

따라서 최근에 개발된 probe DNA를 이용하여 특정 항생제 내성 유전자를 직접 확인하는 실험 방법들 가운데 dot blot hybridization법[9]과 southern blot hybridization법[10]을 비교하여 감염균의 확인과 진단에 시간 단축과 경비절감 등을 고려하여야 한다. 그리하여 원내감염의 분자생물학적 역학조사에 효과적인 plasmid profile분석법을 추가하여 병원 환경 내에 정착된 균주가 어떤 감염경로로 전파경로를 추적함에 도움을 주고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

1998년 9월에서 1999년 2월까지 임상환자에서 분리배양한 MRSA 30주를 대상으로 실험하였다.

### 사용배지

균의 분리 및 증균용으로는 nutrient broth를 사용하였으며, 항생제 검사에는 Mueller-Hinton broth와 Mueller-Hinton agar로 Difco사(Difco Lab., Detroit, MI., USA) 제품을 사용하였다.

### 항생물질

Paper disk법[21]에는 aminoglycoside계 3종, 즉 kanamycin (KM), gentamicin (GM), streptomycin (STM)과  $\beta$ -lactam계 3종, 즉 cefoperazone (CPZ), cefuroxime (CFX), cephalothin (CPT) 등 도합 6종류를 사용하였으며, 항생제 disk는 미국 BBL사(Cockeysville, MD., USA) 제품을 사용하였다. 평판회석법[35]에는 aminoglycoside계 3종 kanamycin (동아제약), gentamicin (제일제당제약), streptomycin (Sigma Co. St., Louis, USA),  $\beta$ -lactam계 3종, cefoperazone, cefuroxime 및 cephalothin은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

### 항생제 감수성 검사

#### 1) Paper disk법

항생제 감수성 검사를 위하여 Mueller-Hinton broth에

서 24시간 배양한 균액을 표준 백균이를 이용하여 일정량을 Mueller-Hinton agar 표면에 균등하게 도말한 후, 화염 멸균된 감자를 이용하여 paper disk를 Mueller-Hinton agar 표면에 기포가 생기지 않도록 밀착시켰다. 배양기에 항생제가 평판배지에 효과있게 확산하기 위하여 실온에서 약 2 내지 3시간 방치한 후에 배양하여 paper disk 주변의 균발육저지대를 측정하였다 (Table 1)[21].

2) 평판회석법

항생물질을 phosphate buffered saline (PBS, 80 mM disodium hydrogen orthophosphate anhydrous, 20 mM sodium dihydrogen orthophosphate, 100 mM sodium chloride, pH 7.5) 또는 증류수로 희석하여 사용하였으며, 순차적으로 배수 희석된 농도로 함유하는 평판배지에 Mueller-Hinton broth에 37°C, 24시간 배양한 균액을 생리식염수로 100배 희석하여 Steer 등[36]의 접종용기로 접종하였다. 접종한 뒤 37°C, 24시간 배양한 후, 접종부위의 균발육 유무를 보아서 항생제의 최소발육저지농도 (MIC: minimal inhibitory concentration)를 결정하였다. 항생제별 내성 범위는 미국 National Committee for Clinical Laboratory Standards[22]에 준하며, 결과의 정도관리를 위하여 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 및 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1644를 대전의 생명공학연구소 유전자원 센터 유전자은행에서 분양 받아 함께 사용하였다.

Plasmid 검색

1) Plasmid DNA의 분리와 전기영동

Plasmid DNA의 분리는 Lyon 등[19]과 Gillespie 등[14]의 방법을 수정하여 분리하였다. 시험균주를 50 ml Luria

broth (LB)에 접종하여 37°C에서 18시간 100 rpm으로 진탕 배양한 후, 3,000 g로 15분간 원심분리하여 (VS-15000 CFN) 균체를 모으고, 200 µl의 lysostaphin 과 2.5 µl의 RNase를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 3 mM potassium acetate 2.5 ml를 넣고 혼합하여 얼음상에서 30분 반응시킨 후, 12,000 g로 원심분리하여 상등액만 다른 시험관으로 옮긴 후 SS-phenol/chloroform 용액으로 단백질을 추출하였다. 2배의 95% 냉각된 ethanol을 가하여 -20°C에서 18시간 정지한 후, 12,000 g에서 15분간 원심분리하여 침전된 plasmid DNA를 얻었다. 이 plasmid DNA 침전물을 TE 완충액 (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) 500 µl에 녹인 후 전기영동하여 plasmid를 확인하였다. 전기영동은 0.8% agarose gel에 0.25% bromophenol blue (BPB)에 40% sucrose가 첨가된 염색액 (pH 8.0) 5 µl와 TE 완충액에 부유된 plasmid DNA 20 µl를 혼합하여 loading하였다. 50 volt에서 4시간 동안 전개시켜서 ethidium bromide (EtBr) 용액 (0.53 µg/ml)으로 30분간 염색하여 short wave transilluminator (SL-20 DNA Image Visualizer Seolin Scientific Co. Korea)로 확인하였다.

2) 제한효소 처리

Jordan 및 Hall의 방법[16]에 준하였다. 증류수에 녹인 DNA에 BamHI을 처리한 후, 완충액 [150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5)]에 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 1 mM dithiothreitol을 넣고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 정지액 (0.5 M EDTA, 0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol 및 40% (w/w) sucrose) 6 µl를 첨가한 후, 전기영동에 사용하였다. 이때 사용된 agarose gel의 농도는 0.8%로 하여 분자량 측정을 위해서 size marker로는 λ DNA/HindIII fragment를 사용

Table 1. Zone diameter standards by paper disk method

Antibiotics	Concentrations	Inhibitor zone diameter (mm)*		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Kanamycin	30 mcg	< 14	14-17	> 17
Gentamicin	10 mcg	< 13	13-14	> 14
Streptomycin	10 mcg	< 12	12-14	> 14
Cefoperazone	75 mcg	< 16	16-20	> 20
Cefuroxime	30 mcg	< 15	15-22	> 22
Cephalothin	30 mcg	< 15	15-17	> 17

\*National Committee for Clinical Laboratory Standards

하였다.

### 3) Template DNA의 준비

Tryptic soy broth (TSB)로 37°C에서 24시간 배양한 다음, 배양액 1 ml을 취하여 원심분리하고, TE 완충액으로 재부유시켜 세척하였다. 다시 원심분리하고 TE 완충액으로 재부유시킨 다음, lysozyme을 최종농도 100 µg/ml되게 첨가하여, 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 1% SDS와 20 µg/ml의 proteinase K를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 위의 lysates를 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)로 2회 추출하고 마지막 1회는 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)로 처리하여 DNA가 녹아 있는 수용액층을 단백질 성분과 분리하였다. 위의 수용액층에 3 M의 sodium acetate (0.1 volume)와 absolute ethanol (3 volume)을 첨가하여 -20°C에서 DNA를 침전시켰다. 원심분리하여 생긴 침전물을 70% ethanol로 세척하고 공기중에서 건조시켜서 증류수에 용해시킨 다음, UV spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu Co., Japan)로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 각각 DNA 농도를 정량하여 사용하였다.

### 4) *mecA* gene의 검출을 위한 digoxigenium-labeled probe의 제조

Oligonucleotide는 MRSA의 DNA에 multiple copy로 존재하는 *mecA*의 DNA sequence중에서 5'-ATCTGTAC-TGGGTTAATC-3'을 한국생공 (Korea Biotech, Taejeon, Korea)에서 주문제작하였다. Probe의 labeling은 random primed DNA labeling법[33]에 의해서 digoxigenin-11-deoxyuridinetriphosphate (Promega Co., WI, USA)로 labeled시켜 사용하였다. 정제된 DNA를 10분간 끓이고 급냉하여 변성된 20 µl의 probe DNA에 10 µl의 hexanucleotide, 10 µl의 dNTP labeling mixture 및 5 µl의 klenow enzyme (Promega, Co., Masdison, USA)을 첨가하고 증류수로 total volume을 100 µl로 맞추어서 37°C에서 24시간 반응시켜 labeled하였다. 여기에 0.2 M EDTA (pH 8.0) 10 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고 10 µl의 4 M LiCl과 300 µl의 냉각 ethanol로 혼합하여 -70°C에서 30분간 labeled된 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 원심분리하여 ethanol을 제거하고 70% ethanol을 첨가하여 1회 세척한 후, 실온에서 건조시켜서 50 µl의 TE 완충액에

녹여 hybridization에 사용하였다.

### Dot blot hybridization

DNA sample 0.5 ml (20 µg)에 NaOH와 EDTA를 각각 최종농도 0.4 M과 10 mM이 되도록 첨가하여 DNA를 변성시키고, 다시 100°C에서 10분 동안 끓임으로써 완전한 변성을 발생하였다. Zeta-Probe GT Membrane (Bio-Rad Laboratories.)를 미리 증류수에 적신 다음, microfiltration apparatus의 well에 sample을 loading하였다. 진공건조시켜 sample을 membrane에 blotting시킨 다음, 0.4 M NaOH 0.5 ml로 well을 세척하고 microfiltration apparatus를 해체하였다. Membrane을 2 × SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate) 에서 간단히 세척하고 공기중에서 말린 후, 80°C에서 30분 동안 진공 건조시켰다. Hybridization은 *mecA*-specific probe를 이용한 hybridization은 ECL direct nucleic acid labelling과 detection system (Amersham International Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)을 이용하였다. Hybridization 완충액에 sodium chloride와 blocking agent가 각각 0.5 M, 5%되게 첨가하여 완전히 녹인 다음, 42°C에서 1시간 동안 pre-heating시켰다. Hybridization 완충액 (1% bovine serum albumin, 1 mM EDTA, 0.5 M sodium phosphate, pH 7.2, 7% SDS)에 membrane을 넣고 orbital shaker를 이용하여 1시간 동안 pre-hybridization을 시행하였다. 사용할 probe은 10 ng/µl의 농도를 희석한 다음, 100°C에서 5분간 끓인 후, 얼음속에서 5분간 cooling시킨 다음, labeling reagent와 glutaraldehyde를 DNA양과 동량 섞어서 37°C에서 10분간 반응시켰다. 위의 labeled probe를 pre-hybridization시켰던 완충액에 첨가하여 다시 42°C에서 24시간 hybridization을 시행하였다.

42°C에서 미리 heating시켜놓고 urea가 들어있는 primary wash buffer (0.5% bovine serum albumin, 1 mM EDTA, 40 mM Na-phosphate, pH 7.2, 5% SDS)를 사용해서 42°C에서 20분씩 2번 세척한 다음, 상온에서 secondary wash buffer (1 mM EDTA, 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, 1% SDS)로 5분씩 2번 세척하였다. Detection reagent 1과 detection reagent 2를 동량 섞어서 blot위에 직접 첨가하고 상온에서 정확하게 1분 동안 반응시킨 후, 과량의 detection reagent를 제거하고 wrap으로 blot를 싸

후에 film과 함께 developing시켰다[26].

#### PCR condition

MRSA-*mecA* 유전자의 amplification은 45  $\mu$ l의 PCR master mixture-2.5 unit *Taq* polymerase: 10  $\times$  PCR buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ l dNTP's, 0.25  $\mu$ M의 각 primer (Takara Shuzo Kyoto, Japan)에 5  $\mu$ l DNA template를 넣고 반응중 수분이 증발되지 않도록 하기 위해서 50  $\mu$ l mineral oil로 증충하여 Delta Cyclor I TM system, Easy Cyclor series (Ericomp, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 denaturation은 94  $^{\circ}$ C에서 30초, annealing은 55  $^{\circ}$ C에서 30초, extension은 72  $^{\circ}$ C에서 1분의 cycling parameter로 automated program을 이용하여 30 cycles의 PCR을 실시하고 final extension은 72  $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하였다.

#### Southern blot hybridization

Southern blotting은 전기영동이 끝난 agarose gel을 denaturation용액인 1.5 M NaCl와 0.5 N NaOH에 15분간 2회 처리 후, 증류수로 세척하고 neutralization용액 (0.5 M/L Tris HCl, pH 7.5, 1.5 M/L NaCl)으로 15분간 2회 세척하였다. Nylon membrane (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham, Germany)을 gel 크기로 잘라서 0.4 N NaOH를 transfer용액을 사용하여 gel을 capillary transfer방법[20]으로 nylon membrane에 24시간 transfer하였다.

Blotting을 UV transilluminater상에서 확인하고 membrane을 100 ml의 2  $\times$  SSC 용액에 담구어 rocker를 이용하여 5분간 세척하였다. Membrane을 forceps으로 꺼내 3 MM paper를 gel 크기의 2배 보다 크게 잘라서 그 안에 membrane을 놓고 3면을 고정시킨 다음 254  $\lambda$ 의 단파 UV에 노출시켜 DNA를 membrane에 crosslink한 후, hybridization을 실시하였다.

Hybridization은 southern transfer하여 보관한 membrane을 밀봉된 용기에 넣고 20 ml의 hybridization buffer 3  $\times$  SSPE (0.54 M NaCl, 0.03 M sodium phosphate, 0.003 M EDTA, pH 7.7), 5  $\times$  Denhardt's solution (0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone), 0.2 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% SDS, 30% formamide를 첨가하여 hybridization incubator (Finemould Precision

Ind., Co., Germany)를 이용하여 42  $^{\circ}$ C에서 4시간 prehybridization을 실시하였다[34]. 1  $\mu$ Ci의 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Amersham, Life Science, Germany)와 T4 polynucleotide kinase (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)로 labeled된 10  $\mu$ l의 probe를 10분간 끓여서 변성시킨 후, 1분간 급냉하여 hybridization용액 0.1 ml를 넣고 얼음에서 혼합한 다음 prehybridization된 membrane에 10 ml의 hybridization용액을 가한 후 denatured probe mixture 10  $\mu$ l를 혼합하여, 42  $^{\circ}$ C에서 18시간 이상 반응시켰다. Hybridization이 끝난 membrane은 0.1% SDS가 포함된 2  $\times$  SSPE로 42  $^{\circ}$ C에서 20분간 3회 세척한 후, RX film (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)에 -70  $^{\circ}$ C에서 24시간 노출시킨 다음, developed하였다[18].

## 결 과

### 항생제 감수성 검사

#### 1) Paper disk법

30주의 MRSA를 대상으로 한 paper disk법으로 저지 직경을 측정된 결과는 Table 2와 같았다. Cephalothin에 감수성인 균주가 13균주 (43%)로 가장 많았으며, cefoperazone과 cefuroxime에 대하여 각각 8균주 (26%), 7균주 (23%)가 감수성을 보였다.

#### 2) 평판희석법에 의한 MIC

MRSA에 대한 균 발육 유무에 따라 측정된 MIC는 Table 3과 같았다. Cefoperazone의 MIC<sub>50</sub>이 8  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub>이 128  $\mu$ g/ml로 가장 낮았다. 그 다음으로 cefuroxime과 cephalothin이 각각 MIC<sub>50</sub>이 16  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub>이 256  $\mu$ g/ml, MIC<sub>50</sub>이 16  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub>이 512  $\mu$ g/ml로 비교적 낮았다.

### Plasmid 검색

#### 1) Plasmid DNA의 분리과 전기영동

MRSA에서 분리된 plasmid DNA의 전기영동은 Fig. 1에 나타나 있다. 그림 1은 실험균의 plasmid DNA의 영동상으로 대부분의 균주에서 4개 이상의 plasmid를 보유하고 있었으며, 분자 크기는 48 kb에서 2.0 kb까지의 plasmid가 관찰되었다.

#### 2) 제한효소처리

MRSA의 plasmid DNA를 제한효소인 *Bam*HI으로 처리

Table 2. Antibiotics sensitivity of MRSA by paper disk method

Antibiotics	Disc content of Antibiotics ( $\mu\text{g}$ )	No. of Strains		
		Sensitive	Weakly sensitive	Resistant
KM	30	1	2	27
GM	10	2	4	24
STM	10	10	10	10
CPZ	75	16	10	4
CFX	30	17	10	3
CPT	30	23	5	2

Table 3. MIC range of antibiotics against MRSA

Antibiotics	MIC range ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
KM	0.125 - 512	512	1024
GM	0.5 - 1024	512	2048
STM	0.5 - 1024	128	256
CPZ	0.5 - 2048	8	128
CFX	0.25 - 1024	16	256
CPT	0.25 - 1024	16	512

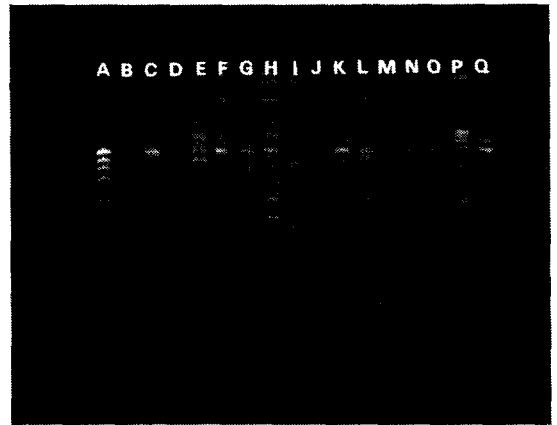


Fig. 2. Restriction enzyme fragmentations of plasmid DNAs after digestion with *Bam*HI.

Lane A; molecular size markers (in kilobase pairs), lanes B to Q; MRSA.

Table 4. Electrophoresis patterns of restricted enzyme from MRSA

Restriction enzyme	No. of fragments	Size of fragments (kb)
<i>Bam</i> HI	10	65, 60, 55.9, 23.1, 19, 6.6, 4.4, 2.8, 2.3, 1.5



Fig. 1. Plasmid profiles of 17 representative strains of MRSA by agarose gel electrophoresis.

한 결과는 Fig. 2와 같았다. Lane B에서 E와 M에서 Q까지는 절편들이 거의 유사한 것으로 보여, 동일한 환경에서의 분리주인 경우에 있어서 single strain일 가능성이 높을 것으로 나타났다. 제한효소 처리된 각 절편의 분자 크기는 Table 4에 나타나 있으며, 65 kb에서 1.5 kb까지 10개의

fragment로 분류되었다.

#### Dot blot hybridization

*mecA* gene의 존재를 알아보기 위한 dot blot hybridization을 실시한 결과는 Fig. 3과 같았다. Specific *mecA* gene probe와 반응하는 균주는 15주가 검출되었으며, 검출 빈도는 50%였다.

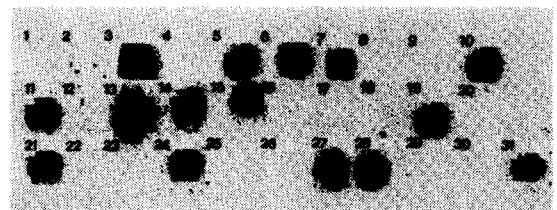


Fig. 3. Dot blot hybridization of DNA from 30 MRSA strains with digoxigenium-dUTP-labeled probe. Spot 1, negative control, spots 2 to 31, MRSA.

Southern blot hybridization

Digoxigenium-labeled probe의 activity를 PCR에 의해 증폭된 DNA band가 실제로 *mecA* gene의 PCR product 인 지를 southern blot hybridization으로 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. *mecA* gene이 표적으로 하는 533 bp에서 증폭된 DNA의 signal이 관찰되는 균주는 16주로 검출율은 각각 53%였다. 따라서 dot blot hybridization결과와 비교해 볼 때 southern blot hybridization이 특이도와 민감도가 높은 것으로 나타났다.

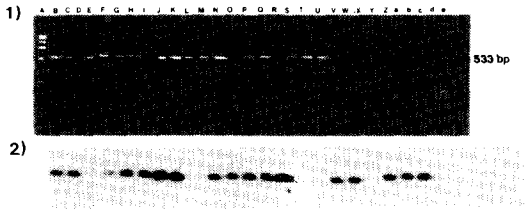


Fig. 4. PCR (1) and southern blot hybridization (2) of *mecA* gene related MRSA using an 18-mer oligonucleotides as probe. Lanes; A, *Hae*III digest of  $\phi$ X174 DNA, e, negative control a *mecA*-negative strains; B to d, MRSA. The size of the DNA fragments in the bands are indicated in kb.

고 찰

원내감염의 분자유전학적인 역학조사는 병원내에 정착된 균주가 어떤 경로로 전파되는 가를 추적하는데 있어서 중요하다. 역학조사에 있어서 중요한 부분은 동일한 균종내의 균주 감별법으로 혈청학적인 또는 생화학적인 성상에 따른 형별 phage나 bacteriocin에 대한 감수성 그리고 항생제 내성 양상 등이 이제까지 주로 사용되어 온 실험 방법들이다[30]. 항생제 감수성 검사는 역학조사에서 약제의 지역별 연령별 연차적 추이와 약제 투여량의 결정을 위한 보조적 검사로써 널리 시행되고 있는 실정이다[6]. 본 실험에서 분리된 MRSA는  $\beta$ -lactam계열 약제에 비교적 감수성이 높음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 약제 감수성에 있어서도 빈도와는 상관없이 자연계에서 서로 관계있는 균총, bacteriophage, bacteriocin 및 항생제 등에 기인하는 일정한 변이가 일어날 수 있으며 기존의 표현형의 특성에만 의존하는 형별법 만으로는 완벽하다고 볼 수

없으므로 역학조사에서는 내성의 유래와 균주간 감염원의 이동경로를 규명하는 것이 매우 중요하다. 그래서 최근에는 분자유전적 기술을 응용하는, 즉 균주가 보유하고 있는 plasmid 양상이나 제한효소처리 후 나타나는 분획상의 분석[11,12], 전달성 R plasmid의 비적합성에 의한 분류[23], 그리고 DNA hybridization 방법이 주목받고 있으며 그 외에 chromosomal DNA를 이용한 DNA fingerprinting도 *Staphylococcus spp*, *Neisseria meningitidis* 및 *Candida spp*. 등의 균종에서 시도되고 있다[3].

또한 약제 내성 결정 인자의 원인을 밝히기 위한 plasmid와의 연관성을 이용한 분자 생물학적인 연구로 추적하는 감별법이 실시되고 있다[1]. 본 분리주에서 plasmid DNA의 양상을 비교한 결과, *Bam*HI 처리시 30주의 MRSA에서는 65 kb에서 1.5 kb까지 10개의 fragment를 가진 것으로 나타나 거의 모든 분리주에서 plasmid를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 plasmid profile을 통한 감별이 유용함을 알 수 있었다.

또한 미생물의 여러 가지 병원성 또는 개체가 갖고 있는 특징은 세포내에 존재하는 특성의 구조 유전자에 의해 조절되고 있으므로 그 유전자의 유무를 직접 검출하는 것이 근년에 주목받게 되었다[3].

따라서 자기 다른 크기를 가진 DNA의 공동 부분을 밝히거나 특이 유전자 (*mecA* gene)를 이용한 분자생물학적 기법은 미생물의 DNA진단에 크게 도움을 주고 있다 [31,27]. 이러한 유전학적 기법에는 dot blot hybridization, southern blot hybridization 및 PCR 등이 있다. PCR법을 이용하여 미량의 검체에서 신속한 유전자 검출이 가능함으로써 양호한 결과를 얻을 수 있을 것이다. 분리주에서 이들 유전학적 실험들을 비교한 결과 dot blot hybridization에 비해서 PCR법에서 원인균의 검출빈도가 3% 이상 차이가 나는 것으로 나타나, PCR법이 민감도가 더 높았으며 southern blot hybridization으로 확인한 결과에서 특이도는 100% 일치하였으며 시간과 경비가 절약되는 PCR법이 다량의 검체에 적용할 경우 보다 더 효과적임을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구결과는 *mecA*를 이용하여 특정 항생제 내성 유전자를 직접 확인하는 hybridization방법들과 PCR법을 비교 검토하여 병원내에 정착된 각 종 세균에 의해서 발생하는 원내감염의 대책 및 예방을 위한 여러 가지

역학조사에 활용될 수 있을 것으로 사료된다[13].

또한 Ryffel 등[29]의 보고에서는 *mecA* gene의 전달과 관련이 있는 IS431*mecA*사이의 DNA sequence를 hypervariable region (HVR)이라고 명하고 동질성이 높은 단위구조들의 직렬 반복 회수의 나열상태를 비교 분석하는 polymorphism을 통한 분별력을 시도하였으며, pulse-field gel electrophoresis를 이용하여 mini-prep 수준의 DNA 단편을 분리한 다음 primer를 이용하여 Ampli-Taq DNA polymerase로 PCR한 후에 반응산물을 automated DNA sequencer로 유전자의 염기배열의 상동성을 알아내는 방법으로 돌연변이의 부위별 분석이 시도되고 있다.

원내감염의 원인균을 추적하기 위한 이러한 분자유전학적 기법들을 비교한 상기의 실험들은 원내감염의 근절을 위한 장, 단기적인 역학조사에 필수적이고도 중요한 자료들을 제시하는 것으로 생각된다.

## 요 약

임상가검물에서 분리한 30주의 *Staphylococcus aureus*를 대상으로 원내감염 원인균의 역학 조사를 위하여 항생제 감수성 검사와 약제 내성의 양상을 알아보고 최근에 개발된 probe DNA를 이용한 특정 항생제 내성 유전자를 직접 확인하는 유전학적 기법들을 비교하여 그 민감도와 특이도를 비교한 결과는 아래와 같았다.

1. 항생제 감수성 검사중 paper disk법을 이용한 결과 cephalothin에 감수성인 균주가 13주 (43%)로 가장 많았으며 cefoperazone과 cefuroxime에 대하여 각각 8주 (26%), 7주 (23%)에서 감수성을 보였다. 평판회석법에 의한 MIC 측정에서는 cefoperazone의 MIC<sub>50</sub>이 8 µg/ml, MIC<sub>90</sub>이 128 µg/ml로 가장 낮았다.

2. Plasmid DNA의 전기영동 결과 대부분의 균주에서 4개의 fragment가 존재하였으며, BamHI 처리시, 65 kb에서 1.5 kb까지 10개의 fragment로 분류되었다.

3. *mecA* gene의 존재를 알기 위하여 dot blot hybridization을 실시한 결과 15주 (50%)에서 *mecA* gene이 검출되었다.

4. Digoxigenin-labeled probe의 activity를 PCR에 의해 증폭된 DNA band가 실제로 *mecA* gene의 PCR product인 지를 southern blot hybridization으로 확인한

결과, 16주 (53%)에서 검출되었다.

5. 상기의 결과에서 원인균의 신속한 검출을 위한 유전학적 기법에서는 southern blot hybridization이 dot blot hybridization보다 민감도와 특이도가 높은 것으로 나타났다.

## 감사의 말

본 연구는 1997년도 기초의학 진흥기금 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 김진모, 이상화, 조동택. 1988. *Staphylococcus aureus*의 plasmid 양상 및 Phage 형과 관계된 재반특성. *대한미생물학회지* **23**, 419-43.
2. 정윤섭, 이경원. 1998. 그람양성 세균과 그람음성 구균의 항생제 내성. pp. 54-58, 제1판. 서울.
3. Anderson, D. J., J. S. Kugns, M. L. Vasil, D. N. Geraldine and E. D. Janoff. 1991. DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 648-649.
4. Birnboim, I. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
5. Cormican, M. G. and R. N. Jones. 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria, enterococci, staphylococci and nonpneumococcal Streptococci. *Drugs* **51(1)**, 6-12.
6. Courvalin, P. 1991. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1019-1023.
7. Craven, D. E. 1995. *Staphylococcus aureus* colonization and bacteremia in persons infected with human immunodeficiency virus: a dynamic interaction with the host. *J. Chemother.* **7(3)**, 19-28.
8. Crossly, K. D. Loesch, B. Landesman, K. Mead, M. Chern and R. Strate. 1979. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* **139**, 273-278.
9. Elwell, L. P., J. M. Inaminea and B. H. Minshew. 1978. Common plasmid specifying tobramycin resistance found in two enteric bacteria isolated from



- burn patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 312-317.
10. Farrar, W. E. 1983. Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. *J. Infect. Dis.* **148**, 1-6.
  11. Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-11.
  12. Fisk, N., A. Vindel, P. Trincado, E. Gomez and P. Aparicio. 1994. An additional set of phage to characterize epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Epidemiol. Infect.* **112**(2), 229-306.
  13. Geha, D. J., J. R. Uhl, C. A. Gustafarro and D. H. Persing. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **32**(7), 1768-1772.
  14. Gillespie, M. T., J. W. May and R. A. Skurray. 1984. Antibiotic susceptibility and plasmid profiles of nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A retrospective study. *J. Med. Microb.* **17**, 295-310.
  15. Hashimoto, H. 1994. Drug resistance of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan until 1993. *Jpn. J. Antibiot.* **47**(6), 575-584.
  16. Jordens, J. Z. and L. M. C. Hall. 1988. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. *J. Med. Microbiol.* **27**, 117-123.
  17. Kloos, W. E. and T. L. Bannerman. 1985. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, In: Murray, P. R., E. J. Tenover, F. C. Tenover, F. C. Tenover, F. C. Tenover. Manual of clinical microbiology. pp. 282-298, 6th ed. ASM Press. Washington D. C.
  18. Kreiswirth, B. N., S. M. Lutwick, S. M., Chaonick, E. K. Gradon, J. D. Lutwick, L. I. Sepkowitz, D. V. Eisner and M. H. Levi. 1995. Tracing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by southern blot hybridization using gene-specific probes of *mec* and *Tn554*. *Micro. Drug Resist.* **1**(4), 307-313.
  19. Lyon, B. R., W. H. John and R. A. Skurray. 1983. Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 817-826.
  20. Ming, Y. Z., X. Di, E. P. Gomez-Sanchez and C. E. Gomez-Sanchez. 1994. Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Biotechniques* **16**(1), 58-59.
  21. Morgan, M. S. 1995. Perceptions of a medical microbiology service: a survey of laboratory users. *J. Clin. Pathol.* **48**(10), 915-918.
  22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1983. Standard methods of dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically. Villanova, NCCLS, USA.
  23. Novick, R. P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381-395.
  24. O'Brien, T. F., D. G. Ross, M. A. Guzman, A. A. Medeiros, R. W. Hedges and D. Botstein. 1980. Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 537-543.
  25. Okamoto, R. and T. Okubo. 1992. Aminoglycosides resistance of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Nippon Rinsho* **50**(5), 1036-1041.
  26. Olsson-Liljequist, B. P. Larsson, S. Ringertz and S. Lofdahl. 1983. Use of a DNA hybridization method to verify results of screening for methicillin resistance in *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* **12**(7), 527-533.
  27. Radstrom, P., G. Swedberg and O. Skold. 1991. Genetic analyze of sulfonamide resistance and its dissemination in gram negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1840-1848.
  28. Reed, K. C. and D. A. Mann. 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* **13**, 7207-7210.
  29. Ryffel, C., W. Tesch, I. Birch-Machin, P. E. Reynolds, L. Barberis-Maino, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi. 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* **94**, 137-138.
  30. Shaginian, I. A. 1996. Genomic polymorphism in the resolution of the fundamental and applied problems of microbiology and epidemiology. *Microbiol. Epidemiol. Immunobiol* **4**(3), 21-24.
  31. Shaw, K. J., R. S. Hare, F. J. Sabatelli, M. Rizzo, C. A. Cramer, L. Naples, S. Kosci, H. Munayyer, P. Mann, G. H. Miller, L. Verbist, H. V. Landuty Y. Glupczynski, M. Catalano and M. Wolo. 1991. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chmother.* **35**, 2253-2261.
  32. Sheagren, J. N. 1984. Medical progress: *Staphylococcus*. *New Eng. J. Med.* **310**, 1437.
  33. Smith, D. R. 1996. Random primed <sup>32</sup>P-labeling of DNA. *Methods Mol. Biol.* **58**, 27-29.
  34. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electro-

- phoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
35. Staphylococcus Reference Lab. 1972. Propagating of phages. Colidale, London.
36. Steer, E., E. L. Plotz and B. S. Raves. 1959. Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiol. Chemother.* **9**, 307-311.
37. Torralba, M. D., S. E. Frey and L. M. Lagging. 1995. Treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection with quinupristin-dalfopristin. *Clin. Infect. Dis.* **21(2)**, 460-461.