

국내분리 Erythromycin-Clindamycin 내성 *Streptococcus pyogenes*에 대한 Pulsed Field Gel Electrophoresis 양상 분석

국립보건원 세균질환부 분자세균과, 성신여대 이과대학 생물학과¹

이영희 · 황규잠 · 이광준 · 박강수 · 배송미 · 성화영 · 김기상 · 이종삼¹

=Abstract=

Pulsed Field Gel Electrophoresis Profile of Erythromycin-Clindamycin Resistant *Streptococcus pyogenes* Isolated in Korea

Young Hee Lee, Kyu Jam Hwang, Kwang Jun Lee, Kang Soo Park, Song Mee Bae,
Hwa Young Sung, Ki Sang Kim and Chong Sam Lee¹

Laboratory of Molecular Bacteriology, Department of Microbiology National Institute of Health,
Korea, and Department of Biology, College of Science, Sungshin Women's University, Korea¹

Ninety two strains of *Streptococcus pyogenes* were isolated from patients with pharyngitis, scarlet fever, skin infection, and invasive streptococcal infections in Seoul, Korea from January to December, 1998. All isolates were epidemiologically characterized by T protein serotype, and serum opacity factor (OF) detection to phenotypes. To analyze the genetic relationship, fifty two isolates including 32 erythromycin-clindamycin (Em-Cm) resistant strains, 20 antimicrobial susceptible strains were attempted to the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). T protein serotype showed 16 kinds in distribution including T12 and T4. Among the total isolates, 40 strains (43.5%) belonged to the T12 serotype and twenty strains (21.7%) to T4 serotype. On the other hand, when infection aspect of *S. pyogenes* isolates were analysed by T serotype distribution, T12 type was predominant for pharyngitidis which contributed to 21 strains (53%) and for skin infection isolates which contributed to 11 strains (28%), respectively. In case of T4 type, it was the most predominant pharyngitidis isolates which contributed to 8 strains (40%). In T serotype distribution of Em-Cm resistant strains, 27 strains (84%) of the thirty two showed T12 serotype. In minimum inhibitory concentration (MIC) values of Em-Cm resistance isolates, thirty two isolates showed resistant to erythromycin 27 strains (84%), had high MIC of >128 µg/ml. And also to clindamycin, twenty two strains (69%) had high MIC of >128 µg/ml.

When OF detection of Em-Cm resistance of *S. pyogenes* isolates were analyzed by T serotype distribution, T12 serotype isolates revealed that all of the isolates except one strain were OF negative.

In PFGE profile analysis to Em-Cm resistance isolates, of the twenty seven, Em-Cm resistance of T12 serotype isolates, 26 strains showed identical PFGE profile and all of these isolates revealed that OF negative. Eighty four percent of Em-Cm resistance *S. pyogenes* isolates had identical phenotype and PFGE profile.

These results strongly suggested that the Em-Cm resistant *S. pyogenes* isolates from Seoul area

showed close genetic correlation and PFGE could be available tool for molecular epidemiology.

Key Words: *Streptococcus pyogenes*, Erythromycin-clindamycin resistance, T protein serotype, Serum opacity factor, Pulsed field gel electrophoresis

서 론

*Streptococcus pyogenes*는 인두염 및 피부감염 뿐만 아니라 균혈증을 포함한 괴사성 근막염, 단독, 폐렴 등의 침습성 감염과 급성 사구체신염이나 류마티스 열 등의 비화농성 합병증도 일으키는 중요한 병원체 중 하나이다^{7,9,15,16}.

*S. pyogenes*를 분류하는 전통적인 phenotyping 방법으로는 M 및 T protein 항원과 serum opacity factor (OF) 검출에 의한다. M protein 항원에 의한 혈청형은 현재 100여종 이상이 확인되고 있으며, 균주간의 가장 변별력이 있는 분류 방법이나 M protein 항원에 대한 특이 항혈청이 시판되고 있지 않아 보편적으로 수행하기 어렵다. 반면에 T protein typing은 M typing 보다 변별력은 떨어지나 현재 특이 항혈청이 상품화 되어 있고, 비교적 수행하기 간편하여 역학적인 분석에 널리 사용되고 있다. 한편 OF는 apoproteinase로서 동물의 혈청을 혼탁하게 하는 활성을 가지고 있는데 그 활성은 M protein과 밀접하게 연관되어 있어, M typing을 수행할 수 없는 경우 보조적인 typing 방법으로 유용하다^{4,11}.

*S. pyogenes*의 항균제 내성은 1958년에 Lowbury 에¹⁴) 의해 erythromycin 내성이 처음 보고된 이래 세계 여러 지역에서 산발적인 보고가 있었으나 90년대 초반부터 내성균주에 대한 보고가 증가하였다^{6,12,19,22}). 한편 Clindamycin 내성균은 1970년 Kohn 등¹³)에 의해 처음보고 되었으나 현재까지 드문 편이며, 특히 erythromycin과 clindamycin (Em-Cm)에 동시 내성을 나타내는 균주의 보고는 더욱 드문 편이다. 우리나라의 경우는 *S. pyogenes*의 항균제 내성균주에 대한 보고는 과거에는 거의 없었고, 최근 한 지역에 국한된 결과이지만 점차 증가하는 추세에 있다¹.

저자 등은 1998년도 서울에서 분리된 *S. pyogenes* 중에서 항균제 Em-Cm에 동시 내성을 보이는 균주가 다수 확인되어 이 균주들에 대한 혈청형과 ribotyping 분석을 통하여 Em-Cm 내성균주들 간의 유전적 상관성이 있음을 보고한 바 있다².

본 연구는 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 이용하여 국내분리 Em-Cm 내성균주의 유전적 상관성을 분석하고자 하였으며, 동시에 PFGE 분석이 *S. pyogenes*에 대한 분자 역학적인 방법으로 유용하게 사용할 수 있는지를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

사용균주는 1998년 1월부터 12월까지 서울에 소재한 3개 대학병원과 1개 소아과에서 인두염, 성홍열, 피부감염 및 침습성 환자로부터 분리된 92주로서 Table 1과 같다.

분리주 총 92주 중 Em-Cm 내성 *S. pyogenes* 32주와 대조균으로써 본 실험에서 사용한 6종 항균제에 모두 감수성인 20주 (혈청형 T12: 11주, T1: 1주, T4: 1주, T5: 1주, T6: 1주, T8: 2주, T9: 1주, T11: 1주, TB3264: 1주)를 포함하여 52주를 대상으로 PFGE를 수행하였다.

2. 혈청형 검사 (T 단백질 혈청형)

T 단백질 혈청형은 M 단백을 trypsin으로 분해시킨 균액을 슬라이드 응집반응법으로 수행하였으며, 항혈청은 *Streptococcus agglutination typing sera* (Sevec, Czech)를 사용하였다. 즉, 혈액한천 배지에서 순수 배양된 집락을 Todd-Hewitt (TH) broth 5 ml에 접종하여 30℃에서 하룻밤 배양시킨 다음 원심 분리하여 얻은 침사에 5% trypsin을 2방울 첨가시키고, pH를 8.0으로 조정하여 37℃ 항원수조에서 1~2시간 동안 반응시킨 균액을 PBS로 1회 세척하여 항원으로 사용하였다.

3. 항균제 감수성 검사

한천희석법으로 실시하였으며 시험에 사용한 항균제는 모두 Sigma사 제품으로 erythromycin, penicillin G, vancomycin, clindamycin, cefotaxime, tetracycline 6종의 표준항균제 분말을 사용하여 세균의 성장억제 최소농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하였다. 배지는 5% 면

Table 1. Distribution of clinical type associated with T types among *S. pyogenes* isolated in Korea (1998)

T type	No.	Site of isolation or Disease								
		Pharyngitis	Scarlet fever	Sputum	Skin infection*	Chronic otitis media	Blood	Wound	Vaginitis	Unknown
T12	40	21	3	1	11	3		1		
T4	20	8	4		2		4		1	1
T1	4				4					
T28	4				3			1		
T8	2	1			1					
T25	2				1		1			
T8/25	2				1				1	
T3	2	1			1					
T6	2	1			1					
T5	1	1								
T9	1				1					
T11	1			1						
T11/12	1				1					
T22	1	1								
TB3264	1									1
T3/13/B3264	1					1				
Nontypeable	7	2	2		2	1				
Total	92	36	9	2	29	5	5	2	2	2

*Skin infection: cellulitis 2; impetigo 1; gangrene 1; pus 25

양혈액을 첨가한 Mueller-Hinton 배지에 각 항균제의 최종 농도가 0.015부터 128 µg/ml이 되게 2배 계단희석하여 이를 배지에 첨가하여 사용하였다. 균 접종량과 각 항균제의 감수성 여부 판독을 위한 MIC breakpoint는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory standards) 기준을 따랐다¹⁷⁾ (Table 2 참조). 항균제 검사에 대조균주로는 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 및 *Streptococcus pyogenes* ATCC 10389를 이용하였다.

4. Serum opacity factor (OF) 검출시험

OF 검출시험법은 microwell 법으로, cell extract 는 Rehder 등²⁰⁾의 방법을 변형하여 수행하였다.

즉, 시험균주를 TH broth 8 ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 8,000 rpm에서 10분간

원침시켰다. 상층액을 제거한 후 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)에 부유시켜 37°C water bath에 1시간 동안 흔들어준 다음 12,000 rpm으로 3분간 원심하여 상층액을 깨끗한 시험관에 옮겼다. 96 microwell plate에 마혈청 (Sigma)을 100 µl씩 넣고 여기에 앞서 처리한 균 상층액 10 µl씩을 첨가하여 뚜껑을 닫은 후 37°C에서 하룻밤 방치하였다. 각 well에 100 µl씩 생리식염수를 첨가한 후 ELISA spectrophotometric microplate reader를 사용하여 450 nm에서 판독하였으며, cut off 값은 균 상층액이 포함되지 않은 마혈청을 음성대조로한 평균 흡광도 +(3x 표준편차)로 구하여 흡광도 값이 0.9 이상을 양성반응으로 판독하였다.

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE 방법은 Stanley 등²¹⁾의 방법을 변형하여

Table 2. *In vitro* susceptibilities of 92 clinical isolates of *S. pyogenes* to 6 antimicrobial agents

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*			Susceptible (%)	Susceptibility breakpoint** ($\mu\text{g/ml}$)
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
Penicillin G	<0.015~0.5	<0.015	<0.015	100	≤ 0.12
Erythromycin	$\leq 0.125 \sim >128$	<0.25	>128	58.7	≤ 0.25
Vancomycin	<0.125~ 0.5	<0.25	<0.5	100	≤ 1
Tetracycline	0.125~ 64	>8	<32	48.9	≤ 2
Ceftriaxone	<0.015~0.25	<0.015	<0.015	100	≤ 0.5
Clindamycin	$\leq 0.125 \sim >128$	<0.125	>128	65.2	≤ 0.25

*MIC₅₀ and MIC₉₀: Concentration of the drug which inhibited 50% and 90% of strains tested, respectively

**Based on NCCLS interpretive guidelines

사용하였다.

각 시험균주를 blood agar (BA) plate에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양한 후 분리된 집락을 TH broth 5 ml에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 하룻밤 배양한 다음 원심 분리하였다. 원침된 침사를 washing buffer (10 mM Tris · Cl, pH 7.6)로 세척한 후 균을 부유하였다. 세균부유액을 50℃ water bath에 넣어 온도를 맞추고, 미리 50℃ water bath에 넣어두었던 1.5% low melt agarose (Bio-Rad 162-0017)와 균액을 1 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 약 100 μl 를 plexiglas mold에 부은 후 4℃에서 냉각시켜 고형화 하였다.

각 agarose plug에 1 ml lysis buffer I [10 mM Tris · Cl (pH 7.6), 100 mM EDTA (pH 8.0), 1 M NaCl], 10 μl lysozyme (100 mg/ml, Sigma), 5 μl mutanolysin (400 $\mu\text{g/ml}$, Sigma), 그리고 1 μl RNase (10 mg/ml, Boehringer Mannheim)을 시험관에 넣고 37℃, 6시간 shaking한 다음 fresh lysis buffer로 교환한 후 37℃에서 하룻밤 shaking 하면서 반응시켰다. Lysis buffer I을 제거하고 1 ml의 lysis buffer II [0.25 M EDTA (pH 8.0), 1% N-lauroylsarcosine]와 50 μl 의 proteinase K (20 mg/ml, Promega Co.)를 시험관에 각각 넣어 56℃에서 6시간 동안 반응시킨 다음 fresh lysis buffer로 교환하여 56℃에서 하룻밤 shaking 하면서 반응시켰다. 반응시킨 plug를 washing buffer [10 mM Tris · Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)]로 5~7회 24시간 세척한 후 1 ml의 restriction buffer를 첨가하여 1시간 동안 4℃에 두었다.

제한효소 처리는 각 agarose plug에 2 μl BSA

(10 mg/ml), 25 μl 10x buffer, 2 μl (20 U) *Sma*I 및 220 μl 멸균된 증류수를 각각 첨가하여 25℃에서 18시간 shaking 하면서 DNA를 절단하였다. PFGE는 contour-clamped homogeneous field machine (CHEF-DRIII system, Bio-Rad Lab)을 이용하여 6 v/cm로 14℃에서 22시간 전기영동 하였으며, pulse time은 5초에서 35초까지로 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide (1 $\mu\text{g/ml}$)로 염색하여 UV transilluminator 상에서 확인하였으며, standard size marker로는 lambda ladder (Promega Co.)를 사용하였다.

결 과

1998년 1월부터 12월까지 서울에 소재한 3개 대학병원과 1개 소아과에서 인두염, 성홍열, 피부감염 및 침습성 환자로부터 분리된 92주 중 항균제 Em-Cm에 동시 내성을 보이는 균주는 32주 (35%)였으며, 총 92주에 대한 혈청형 분포는 T12 및 T4를 포함하여 모두 16종으로, 혈청형 T12가 40주 (43.5%), T4가 20주 (21.7%)로 전체 분리균주의 65%를 차지하였다 (Table 1). 한편 이들 균주의 감염 양상에 따른 혈청형 분포를 보면 혈청형 T12인 경우 인두염, 피부감염 및 만성중이염 환자에서 분리된 균주가 각각 21주 (53%), 11주 (28%), 3주 (8%)로 우세하였다. 혈청형 T4는 인두염 환자에서 분리된 균주가 8주 (40%), 성홍열 환자 및 혈액에서 분리된 균주가 각각 4주 (20%)로 우세하였고, 혈청형 T1은 분리된 균주 4주 모두 피부감염을 일으킨 환자에서 분리되었다.

Table 3. T protein serotype, serum opacity factor, and MIC value of 52 strains of *S. pyogenes* which were analyzed by PFGE

Strain No.	Serum opacity factor	MIC of each antimicrobial agent (µg/ml)		Sero-type
		Erythro-mycin	Clinda-mycin	
Em-Cm resistant strains				
B-5	-	>128	>128	T12
A-8	-	>128	>128	T12
B-6	-	>128	>128	T12
A-13	-	>128	>128	T12
A-22	-	>128	>128	T12
B-19	-	>128	>128	T12
A-25	-	>128	>128	T12
A-26	-	>128	>128	T12
A-29	-	>128	>128	T12
A-32	-	>128	>128	T12
B-013	-	>128	>128	T12
B-018	-	>128	>128	T12
B-019	-	>128	>128	T12
B-025	-	>128	>128	T12
B-027	-	>128	>128	T12
B-030	-	>128	>128	T12
B-031	-	>128	>128	T12
B-41	-	>128	>128	T12
B-43	-	>128	>128	T12
B-45	-	>128	>128	T12
Y8-9121	-	>128	>128	T12
Y8-2152	-	>128	>128	T12
Y8-2360	-	64	64	T12
Y8-3019	-	64	64	T12
Y11-R389	-	64	64	T12
S-95	+	>128	64	T12
S-102	-	>128	64	T12
B-026	-	>128	>128	T1
A-7	+	>128	>128	T28
D-25	+	>128	>128	T28
Y9-9267	+	>128	64	T28
Y10-2120	+	64	64	NT

Continued

Em-Cm susceptible strains				
B-2	-	0.125	<0.125	T12
A-27	-	0.25	0.125	T12
B-017	-	0.125	<0.125	T12
B-022	-	<0.125	<0.125	T12
Y6-2416	-	0.125	<0.125	T12
Y10-2293	-	0.125	<0.125	T12
C-1	+	0.125	<0.125	T12
Y9-9294	+	<0.125	<0.125	T12
Y10-2255	+	0.125	<0.125	T12
Y10-9226	+	0.125	<0.125	T12
S-122	+	0.125	0.125	T12
B-033	-	<0.125	<0.125	T1
D-15980	+	<0.125	<0.125	T8
D-15981	+	<0.125	<0.125	T8
A-1	+	0.125	<0.125	T4
B-012	+	<0.125	<0.125	T9
B-021	+	<0.125	<0.125	TB3264
B-020	-	<0.125	<0.125	T6
B-024	-	<0.125	<0.125	T5
B-032	+	<0.125	<0.125	T11

NT: nontypable

1. T 단백질 혈청형, OF 검출 및 항균제 내성 분석

페니실린을 포함한 6가지 각 항균제에 대한 감수성과 최소 억제 농도의 범위, MIC₅₀과 MIC₉₀은 Table 2와 같다. 검사된 92주 중 Em-Cm에 동시 내성을 보이는 균주는 32주 (43.8%)였으며, 그중 혈청형 T12가 27주 (84%)로 대부분을 차지하였고, 다음은 혈청형 T28로 3주였다 (Table 3).

Em-Cm 내성균주의 MIC는 erythromycin에 대해 내성균주 32주 중 27주 (84%)가 MIC 128 µg/ml 이상, clindamycin의 경우는 22주 (69%)가 128 µg/ml 이상의 내성 정도를 나타내었다. 또한 OF 양상은 혈청형 T12인 경우 항균제 Em-Cm 내성을 나타낸 27주 중 1주를 제외한 26주가 음성반응을 나타내었으나, 혈청형 T28은 항균제 Em-Cm에 내성을 보인 3주 모두가 양성반응을 나타내었다. 한편 혈청형 T12 중 모든 항균제에 감수성을 보인

이영희 등: Em-Cm 내성 *S. pyogenes* 균주의 PFGE 양상

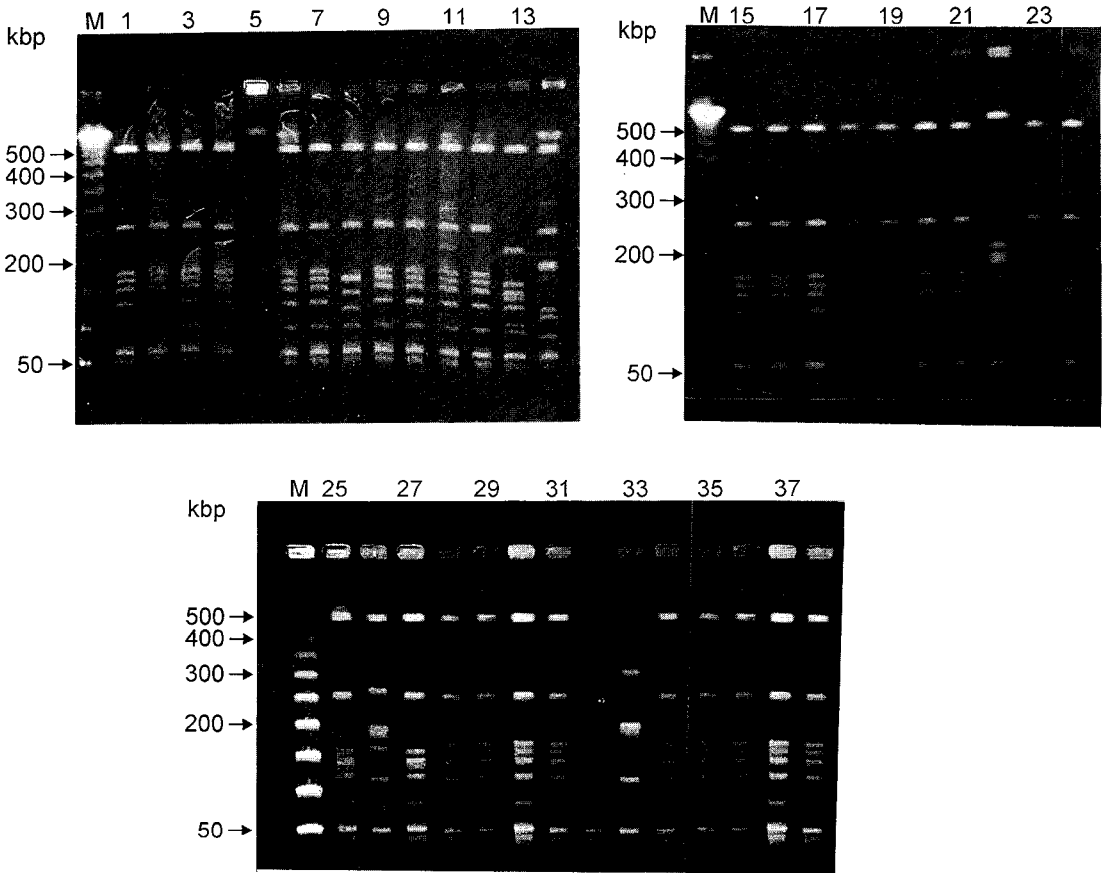


Figure 1. PFGE pattern of Clinical isolates of *S. pyogenes* serotype T12 digested with *Sma*I

Lane M, lamda phage DNA marker; lane 1~4, 6, 7, 9~12, 15~21, 28~31, 34~38, **Em-Cm resistant strains**; lane 5, 8, 13, 14, 22~27, 32, 33, **susceptible strains**; lane 1, A-29 OF-; lane 2, A-32 OF-; lane 3, B-19 OF-; lane 4, B-013 OF-; lane 5, B-017 OF-; lane 6, B-019 OF-; lane 7, B-018 OF-; lane 8, B-022 OF-; lane 9, B-025 OF-; lane 10, B-027 OF-; lane 11, B-030 OF-; lane 12, B-031 OF-; lane 13, S-122 OF+; lane 14, S-95 OF+; lane 15, A-25 OF-; lane 16, A-26 OF-; lane 17, B-5 OF-; lane 18, A-8 OF-; lane 19, A-13 OF-; lane 20, A-22 OF-; lane 21, B-6 OF-; lane 22, C-1 OF+; lane 23, B-2 OF-; lane 24, A-27 OF-; lane 25, Y6-2416 OF-; lane 26, Y9-9294 OF+; lane 27, Y10-2293 OF-; lane 28, Y8-9121 OF-; lane 29, Y8-2152 OF-; lane 30, Y8-2360 OF-; lane 31, Y8-3019 OF-; lane 32, Y10-9226 OF+; lane 33, Y10-2255 OF+; lane 34, Y11-R389 OF-; lane 35, B-41 OF-; lane 36, B-43 OF-; lane 37, B-45 OF-; lane 38, S-102 OF-.

11주의 경우는 OF 양성이 5주, 음성이 6주 이었다 (Table 3).

2. PFGE 양상 분석

총 52주에 대한 *S. pyogenes*의 PFGE 양상은 균주에 따라 DNA size가 40~500 kbp 사이에서 10~15개의 절편이 관찰되었다 (Fig. 1, 2).

혈청형 T12인 경우 항균제 Em-Cm 내성균주는 감수성 균주의 PFGE 양상과는 구별되는 다른 양상을 보였으며, Em-Cm에 내성을 보인 27주 중 OF 반응 양성인 1주 (Fig. 1; lane 14)를 제외하고

OF 음성반응을 보인 26주는 동일한 PFGE 양상을 나타내었다. 한편 Em-Cm에 내성을 보인 균주 중 혈청형 T1 및 T28은 T12와 다른 양상을 보였으나 nontypable 균주와는 동일한 양상을 나타내었다 (Fig. 2; lane 2, 5, 6, 7, 14).

항균제 Em-Cm에 감수성을 보인 11주의 PFGE 양상은 모두 6가지로 구별되었고 그중 OF에 음성반응을 보인 균주는 모두 동일한 PFGE 양상 (Fig. 1; lane 8, 23, 24, 25, 27)이면서 내성균주와의 DNA 밴드 수가 5개의 차이를 나타낸 반면에, OF에 양성반응을 보인 균주는 서로 구별된 다른

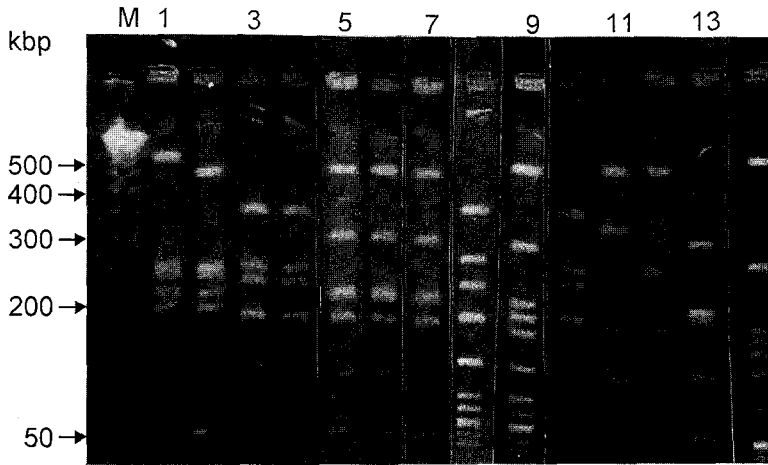


Figure 2. PFGE pattern for various T serotypes of *S. pyogenes* isolates after digestion with *Sma*I
 Lane M, lamda phage DNA marker; lane 1, B-033 T1; lane 2, B-026 T1 R^{*}; lane 3, D-15980 T8; lane 4, D-15981 T8; lane 5, A-7 T28 R^{*}; lane 6, D-25 T28 R^{*}; lane 7, Y9-9267 T28 R^{*}; lane 8, A-1 T4; lane 9, B-012 T9; lane 10, B-021 TB3264; lane 11, B-020 T6; lane 12, B-024 T5; lane 13, B-032, T11; lane 14, Y10-2120 nontypable R^{*}. R^{*}; Em-Cm resistant strains

PFGE 양상 (Fig. 1; lane 13, 22, 26, 32, 33)을 나타내었다.

항균제에 감수성을 나타내는 혈청형 T12 이외의 다른 혈청형에 대한 PFGE 양상 (Fig. 2; lane 1, 3, 4, 8~13)은 서로 다른 양상이었다.

고 찰

*S. pyogenes*의 역학적 연구에서 가장 기본이 되는 phenotype 분류 방법은 M 및 T protein typing과 OF 검출에 있다. 이중 가장 중요한 분류 방법은 병원성 인자인 M type으로, 이들은 어떤 특정 한 M type이 인두염, 침습성 감염 및 비화농성 합병증 등의 특정한 감염증과 보편적으로 연관되어 있는 것으로 알려져 있으므로 역학적으로 중요한 의의를 갖고 있기 때문이다¹⁰⁾. 그러나 현재 M typing sera는 시중에서 시판되고 있지 않으며, 100여종이나 되는 항혈청을 실험실에서 제조하기 어려울 뿐만 아니라 M protein 항원은 변이가 심하여 특히 항혈청으로 typing 하더라도 분류율이 50% 미만으로 낮기 때문에 널리 사용되지 못하고 있는 실정이다. T protein 항원은 M protein 항원과는 독립적으로 표현되는 것으로 알려져 있으나, 대부분의 type이 M type과 연관되어 표현됨으로 M type의 분류가 불가능할 경우 보조적인 분류 방법으로 유용하다¹⁸⁾. 한편 OF의 검출 유무

는 보편적으로 M type과 상호 관련되어 표현되는 것으로 알려져 있고, 또한 실험실에서 간편하게 수행할 수 있음으로 T typing과 더불어 *S. pyogenes* 균주들의 보조적인 phenotype 분류 system으로 널리 사용되고 있다. 따라서 어떤 특정 지역에서 유행하는 균주들의 M type 분류가 불가능할 지라도 T type 및 OF의 분석 결과를 토대로 추정이 가능하다. Beall 등⁹⁾은 미국의 5개 도시로부터 수집한 *S. pyogenes* 1,531주를 M 및 T protein typing과 OF의 검출을 수행하여 상호 관련성을 비교 분석하였으며, 그 결과 T type과 OF의 유무에 따라 M type이 특이적으로 연관되어 있음을 보고하였다. 즉, T12 type이며 OF 음성일 경우, 시험균주 132주 중 130주가 M12 type에 속하였고, T12 type으로서 OF 양성일 경우는 M11 type의 모두 12종의 M type으로 분류되었다. T4 type의 경우는 분리주 모두가 OF에 양성을 나타내었고 46주 중 35주 (78%)가 M4 type에 속하였고 나머지는 5가지 다른 M type으로 분류되었다.

본 실험에서 T12 type으로 분리된 균주 중 OF 음성균주가 34주 (85%), 양성균주가 6주 (15%)로 (Table 2, 3) Beall 등의 phenotype 분석을 고려해 볼 때 분리주 대부분이 M12 type일 가능성이 높고, T4 type인 경우는 분리주 20주 모두가 OF 양성으로 M4의 가능성이 많은 것으로 추정되었다.

한편 각 분리균주들의 감염 양상을 살펴보면

인두염을 비롯한 성홍열과 침습성 감염 환자에서 분리한 92균주의 T type 중 가장 많이 분리된 혈청형은 T12와 T4이며 각각 40주 및 20주로서 전체 분리주의 65%를 차지하였다 (Table 1). 이들 균주들의 감염 양상에 따른 T type 분포는 T12가 인두염과 피부감염에서 각각 21주 (53%)와 11주 (28%)로 우세하였고, T4의 경우는 인두염 환자가 8주 (40%)로 가장 우세하였으며 성홍열 및 혈액에서 분리된 균주가 각각 4주 (20%) 이었다. 이들 균주들을 각각 M12와 M4 type으로 추정할 경우 국내 유행 *S. pyogenes*의 대부분은 M12 및 M4 type일 것이며, 국부적이긴 하나 국내에서 유행하는 균주의 감염 양상과 M type간의 연관성은 국외에서 보고된 결과와 유사한 양상을 보였다⁹⁾. 그러나 *S. pyogenes*의 혈청형 분포나 감염 양상은 시기나 또는 국가적으로 다르게 나타난다는 보고로 미루어 볼 때 앞으로 이에 대한 지속적인 조사가 이루어져야 할 것이다.

*S. pyogenes*의 인두염 치료시 폐니실린 과민성 반응에 대한 우려 등으로 erythromycin 등 macrolide 계통 항균제를 많이 이용하며, 이들 항균제를 많이 사용하는 지역에서의 내성률이 높은 것으로 알려져 있다^{3,22)}. 우리나라의 경우는 최근에 erythromycin 내성률이 점차 증가하는 추세에 있으며, 본 연구에서는 erythromycin 뿐만이 아니라 clindamycin에서도 동시 내성을 갖는 균주의 분리율이 92주 중 32주 (35%)를 나타내었고, 이들 균주들 중 Em, Cm에 대해 128 µg/ml 이상의 높은 MIC를 보이는 경우가 각각 27주 (84%), 22주 (68%)로 나타났다. Cocuzza 등²³⁾은 Em-Cm에 내성이면서 MIC가 둘다 128 µg/ml 이상으로 높을 때 구성형 *ermAM* 유전자를 발현한다고 하였는 바, 차후 우리나라에서 분리되는 Em-Cm 내성균주의 내성 기전을 밝히는 후속 연구가 필요하다고 생각된다. 한편 Em-Cm에 내성을 보인 균주의 혈청형 중 T12 type이 27주 (84%)로 우세하여 국내분리 균주의 혈청형과 내성균주와의 상관관계가 있음을 시사하였고, 이에 따라 저자들은 유전적 상관성을 밝히고자 PFGE를 수행하였다. 본 연구 결과 혈청형 T12인 경우 항균제 Em-Cm 내성균주와 감수성 균주의 PFGE 양상은 확연히 다른 양상을 보였고 (Fig. 1), Em-Cm 내성을 보인 균주 중 1주만이 다른 PFGE 양상을 보였으나 이 균주는 OF 검출에서 양성반응을 나타내어서 같은 T12 type 일지라도 다른 M type일 가능성이 높다. T12 type 이면서

OF에 음성을 보인 Em-Cm 내성균주들의 PFGE 양상은 100%의 일치율을 보여 균주들 간의 상호 유전적 상관성이 있음을 나타내었다. 한편 T12 type 중 Em-Cm에 감수성을 보인 11주의 PFGE 양상은 모두 6가지로 구분되었고, 그중 OF 검출에서 음성반응을 보인 5주 (Fig. 1; lane 8, 23, 24, 25, 27)는 모두 동일한 양상으로 Em-Cm 내성균주와의 DNA 밴드 수가 5개의 차이를 나타내었다. 반면에 나머지 Em-Cm에 감수성이면서 OF에 양성반응을 보인 6균주는 서로 다른 DNA 전개 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 앞서서도 언급했듯이 T type은 OF 검출 유무와 함께 M type을 유추해 낼 수 있으므로, T12 type이며 OF 음성인 균주는 대부분 M12 type에 속하며, OF 양성인 균주는 M11 type 외 12가지 M type으로 분류된 것을 감안한다면, 본 실험에서 T12 type이며 OF 양성인 균주들이 다양한 PFGE 양상을 보인 것은 추정되는 M type이 서로 다르다는 것을 예측할 수 있는 결과로 보인다.

또한 항균제 Em-Cm에 내성인 균주가 T1 type 및 T28 type일 경우도 PFGE 양상은 T12 type과는 확연히 다른 양상이었고 (Fig. 2; lane 2, 5, 6, 7), 항균제 감수성인 균주일 경우에도 T12 type과는 혈청형이 다른 T8, T4, T9, TB3264, T6, T5 및 T11 type (Fig. 2; lane 3, 4, 8~13)의 PFGE 양상은 많은 차이를 보였다. 이러한 결과는 phenotype에 따라 PFGE 양상은 구분되는 다른 차이를 보이며 또한 특이성을 나타냄으로써 분자 역학적인 방법으로서 *S. pyogenes*의 PFGE 양상 분석은 변별력이 우수하다 하겠으나 T12 type 외에 다른 serotype들의 분리균주가 극히 적어 정확히 판단하기 어려우며 앞으로 더 많은 분리주에 대한 지속적인 분자 역학적 연구가 요구된다.

이상의 결과로 '98년도 우리나라 서울지역에서 분리된 Em-Cm 내성균주의 84%가 동일한 phenotype과 PFGE 양상을 나타냄으로써 균주 상호간의 유전적 상관성을 가지고 있음을 확인하였으며, 또한 *S. pyogenes*의 PFGE 양상 분석은 분자 역학적인 방법으로서 유용한 것으로 판단되었다.

결 론

본 연구는 1998년도 1월부터 12월 사이에 서울 지역에서 분리한 *S. pyogenes* 92주에 대한 T protein serotyping 및 OF 검출을 시도하여 역학적인

특성을 파악하였고, 그중 Em-Cm에 내성을 보인 32주와 대조군으로써 본 실험에서 사용한 항균제에 모두 감수성인 20주로서 총 52주에 대한 PFGE를 수행하여 내성균주들 간의 유전적 연관성을 분석하였다. 분리균주의 T type 분포는 T12 및 T4를 포함하여 모두 16종이었으며, 혈청형 T12가 40주 (43.5%), T4가 20주 (21.7%)로 전체 분리주의 65%를 차지하였다. 한편 감염 양상에 따른 T 혈청형 분포는 T12가 인두염과 피부감염에서 각각 21주 (53%)와 11주 (28%)로 우세하였고, T4의 경우도 인두염 환자가 8주 (40%)로 가장 우세하였다.

Em-Cm 내성균주의 T 혈청형 분포는 T12가 32주 중 27주 (84%)로 대부분을 차지하였다. Em-Cm 내성균주의 MIC 분포는 erythromycin은 내성균주 32주 중 27주 (84%)가 128 µg/ml 이상, clindamycin의 경우는 22주 (69%)가 128 µg/ml 이상의 높은 내성 정도를 나타내었다. T 혈청형에 따른 OF 검출은 혈청형 T12인 경우 항균제 Em-Cm 내성을 나타낸 27주 중 1주를 제외한 모든 균주가 음성반응을 나타내었다. Em-Cm 내성균주의 PFGE 양상은 혈청형 T12인 경우 항균제 Em-Cm에 내성을 보인 27주 중 OF 반응 양성인 1주를 제외하고 OF 음성반응을 보인 26주는 동일한 PFGE 양상을 나타내었다.

이상의 결과로 '98년도 서울지역에서 분리된 Em-Cm 내성 *S. pyogenes* 균주들은 유전적 상관성을 가지고 있었으며, PFGE 양상 분석은 분자역학적 방법으로 유용하였다.

참 고 문 헌

- 1) 김윤정, 이혜수, 최삼임, 김선주: Erythromycin 내성 *Streptococcus pyogenes*에서 *ermAM* 유전자와 *mefA* 유전자의 검출. *감염* **31(6)**: 494-499, 1999.
- 2) 이영희, 주영란, 황규잠, 이광준, 박강수, 배송미: 국내분리 *Streptococcus pyogenes* 균주에 대한 rRNA gene restriction 양상 및 항균제 감수성. *대한미생물학회지* **34(3)**: 221-231, 1999.
- 3) 정혜선, 박수은, 이환중, 김의중, 김제학: *Streptococcus pyogenes*의 소아에서의 감염 양상 및 항균제 감수성. *감염* **30**: 419-425, 1998.
- 4) Beall B, R Facklam, T Thompson: Sequencing

- emm*-specific PCR products for Routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* **34**: 953-958, 1996.
- 5) Beall B, RR Facklam, JA Elliott, AR Franklin, T Hoenes, D Jackson, L LaClaire, T. Thompson, R Viswanathan: Streptococcal *emm* types associated with T-agglutination types and the use of conserved *emm* gene restriction fragment patterns for subtyping group A streptococci. *J Med Microbiol* **47**: 893-898, 1988.
- 6) Cornaglia G, M Ligozzi, A Mazzariol, M Valentini, G Orefici, R Fontana: Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993~1995. *Emerg Infect Dis* **2**: 339-342, 1996.
- 7) CDC: Division of bacterial and mycotic diseases program plans: Prevention program for group A streptococcal infections. 58-63, 1996.
- 8) Cocuzza C, G Blandino, R Mattina, F Nicoletti, G Nicoletti: Antibiotic susceptibility of group A streptococci in 2 Italian cities: Milano and Catania. *Microb Drug Resist* **3(4)**: 379-383, 1997.
- 9) Gardiner DL, KS Sriprakash: Molecular epidemiology of impetiginous group A Streptococcal infections in aboriginal communities of Northern Australia. *J Clin Microbiol* **34**: 1448-1452, 1996.
- 10) Gray BM: Bacterial infections of Humans epidemiology and control, 3rd ed.: Streptococcal infection. Plenum medical book Co. New York and London. 673-711, 1999.
- 11) Johnson DR, EL Kaplan: A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. *J Med Microbiol* **38**: 311-315, 1993.
- 12) Kataja J, P Huovinen, A Muotiala, J Vuopio-varikila, A Efstratiou, G Hallas, H Seppala: Clonal spread of group A streptococcus with the new type of erythromycin resistance. *J Infect Dis* **177**: 786-789, 1998.
- 13) Kohn J, Evans AJ: Group A streptococci resistant to clindamycin. *Br Med J* **1**: 423, 1970.
- 14) Lowbury EJJ, L Hurst: The sensitivity of Staphylococci and other wound bacteria to erythro-

- mycin, oleandomycin and spiramycin. *J Clin Pathol* **12**: 163-169, 1959.
- 15) Muotiala A, H Seppala, P Huovinen, J Vuopio-Varkila: Molecular Comparison of group A streptococci of T1M1 serotype from Invasive and Noninvasive infections in Finland. *J Infect Dis* **175**: 392-399, 1997.
- 16) Musser JM, V Kapur, J Szeto, X Pan, DS Swanson, DR Martin: Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: Recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. *J Infect Immun* **63**: 994-1003, 1995.
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 5th ed. M7-A5, Pennsylvania, USA. vol 20. No. 2, p7-1, 2000.
- 18) Navarre WW, O Schneewind: Surface proteins of Gram-positive bacteria and Mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Micro Mol Biol Rev* 193-199, 1999.
- 19) Nicolau DP, PR Tessier, R Quintiliani, CH Nightingale: Emergence of erythromycin-resistant, clindamycin-susceptible *Streptococcus pyogenes* isolates in Marid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 989-990, 1998.
- 20) Rehder CD, DR Johnson, EL Kaplan: Comparison of Methods for obtaining serum opacity factor from group A Streptococci. *J Clin Microbiol* **33**: 2963-2967, 1995.
- 21) Stanley J, D Linton, M Desai, A Efstratiou, R George: Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. *J Clin Microbiol* **33**: 2850-2855, 1995.
- 22) Van Asselt GJ, JH Sloos, RP Mouton, CPA Van Boven, JAM Van De Klundert: Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to azithromycin, clarithromycin, erythromycin and roxithromycin in vitro. *J Med Microbiol* **43**: 386-391, 1995.