

국내 임상분리주 *Streptococcus pneumoniae*의 혈청형에 따른 유전적 상관성

정경석[†]

안산1대학 임상병리과

The Genetic Correlations Among Serotypes and PFGE Patterns of *Streptococcus pneumoniae* Isolated in Korea

Kyung Suk Chung[†]

Department of Clinical Pathology, Ansan College

(Received December 13, 2003; Accepted February 24, 2004)

ABSTRACT

In an attempt to analyze the characteristics of domestic pathogenic strains of *S. pneumoniae*, the basic epidemiological characteristics of pathogenic strains such as their serotypes and frequency of penicillin resistance, and pattern of chromosomal DNA from PFGE(pulsed-field gel electrophoresis) were observed. For this study, 56 strains of *S. pneumoniae* isolated from inpatients and outpatients in the four domestic university hospitals were collected from January to December in 1998. Among those strains, a total of 56 pathogenic strains from blood(39 isolates), cerebrospinal fluid(8 isolates) and other specimen(9 isolates) were selected and isolated. The penicillin resistance frequency of those 56 strains was identified with disk diffusion method with 66.1%. From the invasive strains, predominant serotypes were isolated in the order of 19F(12.5%), 23F(10.7%), 14(10.7%) and 9V(10.7%), totalling 45 percent. This experiment also used PFGE patterns to compare the correlations among genetic subtypes in several serotypes. The DNA fragments digested with *Sma* I and *Apa* I were resolved by PFGE. The PFGE patterns digested with *Sma* I were better than *Apa* I for analysis. In the DNA fragments digested with *Sma* I, PFGE analysis of 56 *S. pneumoniae* isolates showed 25 different patterns. As a result, serotype was on the whole correlated to PFGE pattern on the ground that each different PFGE pattern by serotype was observed. This study can be utilized not only for the study of incidence trend of domestic pneumococcal diseases but also as a useful basic data for the development of identification tool and treatment.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, PFGE patterns

I. 서 론

Streptococcus pneumoniae(폐렴구균)는 감염성 질환 중 사망률과 발병율이 가장 높은 질환인 폐렴의 주 원 인균으로 폐렴 이외에 세균성 수막염 및 균혈증 등의 침습성 질환과 부비동염, 중이염 등의 국부적 질환을 일으킨다.^{1,2)}

최근 노인연령층의 증가와 만성질환자 및 면역력 저하 환자들의 증가로 인해 *S. pneumoniae*에 의한 감염 질환 발생이 증가하고 있고 또한 치료제인 페니실린에

내성을 보이는 *S. pneumoniae*가 전세계적으로 급속하게 증가, 확산되고 있어 치료에 많은 어려움을 겪고 있다. 국내의 경우 역시 페니실린 내성 *S. pneumoniae*의 비율이 70-80%에 이르고, 다제 내성 *S. pneumoniae*의 비율도 높아 항생제 치료시 간과할 수 없는 실정이다.^{3,4)}

폐렴구균은 협막 다당체 구조에 따라 90여종의 혈청형으로 세분된다.⁵⁾ 폐렴구균 감염시 90여개에 달하는 혈청형들이 동일한 독성을 나타내지는 않으며, 일반적으로 세균성 폐렴 및 수막염에 걸린 환자로부터는 14, 4, 1, 6A/6B, 3, 8, 7F, 23F, 18C 혈청형 순으로 분리된다. 특정 혈청형에 의한 감염 빈도와 연령 사이에는 연관성이 존재한다. 한 예로 미국에서 1978년부터 1994년까지 침습성 질환을 가진 3,900명의 어린이로부터 분리된 폐렴구균의 86%는 14, 6B, 19F, 18C,

[†]Corresponding author : Department of Clinical Pathology, Ansan College

Tel: 82-31-400-6934, Fax: 82-31-400-6933

E-mail : kschung@asan.ac.kr

23F, 4, 9V, 19A, 6A, 3 혈청형에 해당되었고, 성인 3,600명으로부터 분리된 폐렴구균의 65%는 4, 14, 23F, 9V, 12F, 6B, 3, 8, 1, 9N 혈청형에 해당되었다. 지리적 위치도 특정 혈청형에 의한 감염 빈도에 영향을 나타내었다. 아시아에서는 혈청형 15A, 23A, 24F, 27, 34가 종종 분리되는데 비해 네덜란드에서는 7F가 어린이와 성인에서 분리되며, 아프리카와 Papua New Guinea에서는 12와 46 혈청형이 주로 분리되었다. 더욱이 개도국 어린이는 성인에서 주로 분리되고 되고 있는 혈청형에 의한 감염이 보고되기도 하였다.^{6,8)} 이와 같이 폐렴구균은 연령, 지역, 시대에 따라 유행 혈청형 분포에 차이를 보이고 있어 백신 개발을 위해 질환의 유형 분석 및 역학적 조사 그리고 우세 혈청형을 중심으로 하는 혈청형 분석이 선행되어야 한다. 국내에서는 아직 *S. pneumoniae* 침습성 균주에 대한 폭넓은 혈청형 분석 및 각 혈청형에 따른 특성 비교, 항생제 내성 빈도 등 기초적 역학 조사연구가 매우 미흡한 실정이다. 특히 전 세계적으로 특정혈청형의 유행이 보고되고 있어 혈청형별 유전적 상관성의 규명이 요구된다.

이에 본 연구에서는 대학병원에서의 환자 병력을 확인하여 폐렴구균 관련 유사 질환환자로부터의 가검물을 대상으로 penicillin 내성 및 혈청형을 조사하고 그들의 유전적 상관성을 알아보고자 하였다.

II. 연구방법

1. 사용 균주 및 배양

본 실험에서는 1998년 1월부터 12월 사이에 서울에 소재한 4곳의 대학 병원에 내원 및 입원한 환자들로부터 분리된 침습성 균주를 선별하여 56주를 시험 균주로 사용하였다. 폐렴구균의 분리는 5%의 섬유소를 제거한 면양 혈액을 첨가한 혈액한천평판배지에서 5% CO₂로 통기하면서 37°C에서 18~24시간 배양한 후 α 용혈성과 집락모양을 확인하고, optochin (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) 디스크 감수성 검사와 catalase 검사, 담즙용해시험 등을 통해 폐렴구균을 동정하였다.⁹⁾ 폐렴구균으로 동정된 균은 1 μg oxacillin disk를 이용하여 디스크 확산법으로 페니실린에 대한 내성여부를 검사하였다. 검사방법 및 내성균의 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS, 1998)의 기준에 따라 시행하였다.¹⁰⁾

2. 혈청형 분석

각 시험 균주의 혈청형 분석을 위한 특이 항혈청은

Denmark의 Statens Serum Institut로부터 omni-(1종), pool-(14종; A-I, PQRST) group-(21종), type-specific-(25종) factor-(64종)를 포함한 항혈청을 구입하여 사용하였으며 희석 농도의 결정 및 각 분리 균주의 혈청형 결정 방법은 이 회사의 항혈청 사용 실험법에 준하여 수행하였다. 먼저 omni serum으로 협막팽화시험을 실시하여 *S. pneumoniae* 균주 여부를 재확인한 후 14종의 pool sera를 이용하여 혈청형군별로 일차 분류한 후 각 group 및 type sera에서 응집 반응으로 각 균주의 혈청 type을 결정하였다. 또한 type 혈청형 중 type factor가 분류되어 있는 균주는 factor sera로 응집 반응 시험을 실시하여 혈청형을 결정하였다.

3. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

염색체 DNA의 양상을 확인하기 위해 PFGE를 실시하였다. PFGE 방법은 Rudolph 등(1998)의 방법을 변형하여 사용하였다.¹¹⁾ 혈청형별로 선택한 균주 27균주를 혈액한천평판배지에 접종하여 5% CO₂를 통기하면서, 37°C에서 22시간 배양한 후 균을 수확하였다. Washing buffer(10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0)로 수확한 균주를 세척한 후 0.5×TBE{Tribase, boric acid, EDTA(Ethylendiamine tetraacetic acid)} buffer에 현탁하여 균현탁액을 제조하였다. 세균 현탁액을 50°C water bath에 넣어 온도를 맞추고 미리 50°C에 넣어둔 0.5×TBE buffer에 용해시켜만든 1.2% low melting point agarose(Bio-Rad)와 균현탁액을 1:1(v/v)의 비율로 혼합한 후 약 100 μl를 plexiglas mold에 부은 후 4°C로 냉각시켜 고형화하였다. 각 plug에 proteinase K 1 mg/ml와 1% SDS(sodium dodecyl sulphate)를 함유한 TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer 5 ml를 첨가하고 50°C에서 72시간 동안 반응시켰다. TE buffer로 상온에서 48시간 세척시킨 후 40U *Sma* I(Promega)와 40U *Apa* I(Promega)로 처리하여 25°C에서 24시간동안 반응시켜 염색체 DNA를 절단하였다. PFGE는 contour-clamped homogenous electric field apparatus(CHEF-DRIII system, Bio-Rad Lab.)를 이용하여 6 V/cm로 14°C에서 22시간 전기영동하였으며, pulse time은 1초에서 25초까지였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide(1 μg/ml)로 염색하여 UV transilluminator상에서 확인하였으며, marker로는 lamda ladder(Promega)를 사용하였다.

4. Dendrogram에 의한 분석

유전적 상관성의 Dice coefficient는 PFGE 양상을 토대로 “공통된 절편의 수×2×100/절편의 전체의 수”

의 공식을 이용하여 구하였으며, 균주간의 clustering은 unweighted pair group method of average linkage (UPGMA)법에 의한 dendrogram을 구성하였다.¹²⁾

III. 결 과

1. 균주의 분리 및 동정

환자로부터 분리된 균주는 혈액으로부터 분리된 균주 39주, 뇌 척수액 8주, 객담 4주와 그리고 비교 균주로서 비침습성 균주로 판단되는 인후 분리주 5주를 포함하여 총 56주이며, 이 중 혈액으로부터 분리된 균주가 39주로 70%를 차지했다. 분리된 균주의 penicillin 내성율은 66.1%(37/56)을 보였는데 객담 검체에서 모두 내

성을 보였고 척수액, 혈액 및 인후부에서는 각각 75%(6/8), 62%(24/39), 60%(3/5)의 내성율을 보였다 (Table 1).

2. 혈청형 분석

혈청형을 분석한 결과 각 분리 균주의 혈청형은 19F 7주(12.5%), 23F 6주(10.7%), 14 6주(10.7%) 그리고 9V 6주(10.7%)의 순으로 분리되어 이들 4가지 혈청형에 포함되는 균주가 44.6%를 차지하였다. 또한 혈청형이 확인된 54주 중 23가 백신에 대해 면역성이 없는 균주는 혈청형 24F를 나타내는 2주, 그리고 혈청형 13과 29 각 1주 모두 4주로서 약 7%를 차지하였다 (Table 2).

성별과 나이에 따른 분리 균주의 수와 혈청형의 분포는 6세 이하의 영, 유아에서 분리된 20주(36%)와 60세 이상의 노년층에서 분리된 균주가 15주(27%)로서 약 63%에 이르고 청, 장년 층에서 21주(37.5%)의 균주가 분리되었다. 특히 7세에서 18세까지의 청소년층에서는 단 3주만이 분리되었다. 또한 남자로부터 분리된 균주가 39주(70%), 여자로부터 분리된 균주가 17주(30%)였다. 혈청형 분포를 연령별로 보면 6세 이하에서는 19F, 23F, 14 혈청형이 우세하였고, 19세부터 90세까지는 14, 9V, 61세 이상에서는 11A, 9V, 3 순으로 나타났다. 성별로 보면 23F, 11A, 10A, 6B, 24F, 19F 혈청형 순으로 남자가 우세하였다(Table 3).

Table 1. Penicillin(PCN) susceptibility of *S. pneumoniae* by disk diffusion method

Specimen ^a	No. of isolates		Total
	PCN ^b -susceptible	PCN-resistant	
BL	15	24	39
CSF	2	6	8
SP	0	4	4
Throat	2	3	5
Total	19	37	56

^aBL: Blood, CSF: Cerebrospinal fluid, SP: Sputum

^bDetermined with a 1 µg oxacillin disk

Table 2. Serotypes and specimen for isolation of *S. pneumoniae*

Order of frequency	Serotype	No. (%) of strains	Specimen			
			Blood	CSF	Sputum	Throat
1	19F	7 (12.5)	4	2		1
2	23F	6 (10.7)	4	1		1
3	14	6 (10.7)	3	1	2	
4	9V	6 (10.7)	4		2	
5	11A	4 (7.0)	3	1		
6	10A	3 (5.4)	3			
7	6B	3 (5.4)	3			
8	3	3 (5.4)	2			1
9	18C	2 (3.6)	1			1
10	19A	2 (3.6)	1	1		
11	24F	2 (3.6)	2			
12	Other ^a	10 (17.8)	7	2		1
13	ND ^b	2 (3.6)	2			
Total		56 (100.0)	39	8	4	5

^a: 1, 5, 6A, 7C, 7F, 8, 13, 15C, 20, 29.

^b: not determined

CSF: cerebrospinal fluid

Table 3. Distribution of serotypes by age and sex

Serotypes	Age		7-18		19-60		≥61		
	Sex	≤6		M	F	M	F	M	F
19F		3	2	0	0	1	0	0	1
23F		2	1	1	0	1	0	1	0
14		0	2	0	0	3	0	0	1
9V		0	1	0	0	2	1	1	1
11A		0	0	0	0	1	0	3	0
10A		1	0	0	0	1	0	1	0
6B		1	0	0	0	1	0	1	0
3		0	1	0	0	0	0	1	1
18C		0	1	0	0	0	0	1	0
19A		0	1	0	0	0	1	0	0
24F		0	0	0	0	2	0	0	0
other ^a		3	0	2	0	3	0	2	0
ND ^b		0	1	0	0	0	1	0	0
Total		10	10	3	0	15	3	11	4
		20		3		18		15	

^a: 1, 5, 6A, 7C, 7F, 8, 13, 15C, 20, 27.

^b: not determined

unit : number

M: Male, F: Female

Table 4. Serogroup/serotype of Penicillin resistant *S. pneumoniae* isolated from clinical specimens by disk agar diffusion method

Total no.(%) of resistant isolates	No.(%) of resistant strains of indicated serotype											
	19F	23F	14	9V	6B	19A	24F	11A	7C	29	6A	1
37(100)	7 (18.9)	6 (16.2)	6 (16.2)	6 (16.2)	3 (8.1)	2 (5.4)	2 (5.4)	1 (2.7)	1 (2.7)	1 (2.7)	1 (2.7)	1 (2.7)

페니실린 내성균주들의 혈청형은 19F가 7주로 가장 많았으며 23F, 14 및 9V가 6주로 다음 순이었다 (Table 4).

3. 각 혈청형별 유전적 형별 분석

각 분리균주의 유전적 상관성을 분석하기 위하여 PFGE 양상을 비교하였다. 분리된 27주에 각각 제한 효소 *Sma* I과 *Apa* I으로 처리 한 후 이들 유전자의 양상을 비교해 보았다(Figs. 1, 2). *Sma* I으로 처리한 경우 25종의 밴드 양상을 확인할 수 있었으며, 전반적으로 혈청형에 따른 PFGE 밴드 양상이 차이가 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 실험에서 가장 많이 분리된 혈청형 19F를 나타내는 균주 7주에 대한 밴드 양상을 보면 3주는 같은 양상이고 나머지 4주는 서로 다른 양상이 나타나므로 혈청형에 따라 PFGE 밴드 양상의 차이가 있으며 한 혈청형 내에서도 서로 다른 양상이 존재함을 알 수 있었다. 또한 분리주들의 PFGE 양상을 가지고 dendrogram으로 형상화하여 밴드 간의 유사성

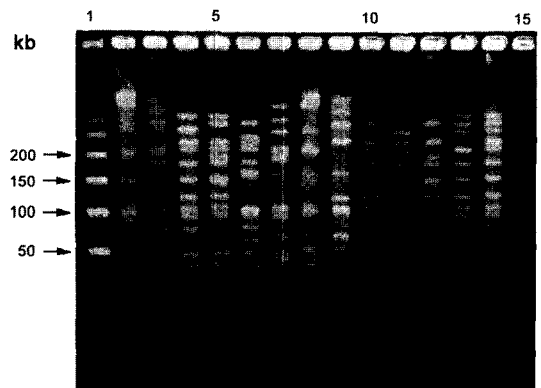


Fig. 1. PFGE separation of *Sma* I restriction fragments of the isolates (serotypes) of *S. pneumoniae* isolates. lane1: PFGE marker λ -ladder(Boehringer Mannheim), lane2: 1(19A), lane3: 2(18C), lane4: 3(19A), lane5: 4(19F), lane6: 5(20), lane7: 6(23F), lane8: 7(24F), lane9: 8(29), lane10: 9(19F), lane11: 10(19F), lane12: 11(19F), lane13: 12(19F), lane14: 13(19F), lane15: 14(19F).

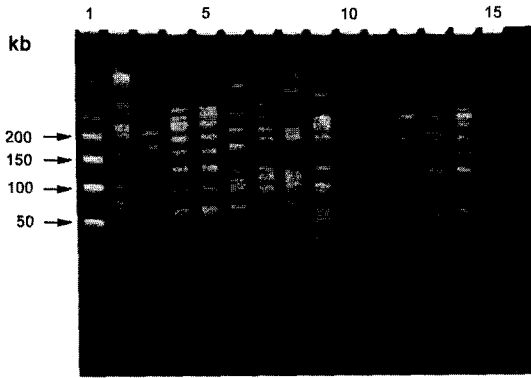


Fig. 2. PFGE separation of *Apa* I restriction fragments of the isolates (serotypes) of *S. pneumoniae*. lane1: PFGE marker λ -ladder(Boehringer Mannheim), lane2: 1(15C), lane3: 2(18C), lane4: 3(19A), lane5: 4(19F), lane6: 5(20), lane7: 6(23F), lane8: 7(24F), lane9: 8(29), lane10: 9(19F), lane11: 10(19F), lane12: 11(19F), lane13: 12(19F), lane14: 13(19F), lane15: 14(19F).

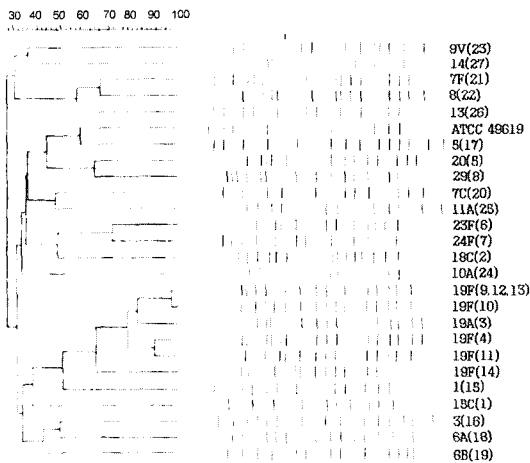


Fig. 3. Dendrogram of similarities among the serotypes (isolates) of *S. pneumoniae* by PFGE types (*Sma* I).

을 조사한 결과 혈청형 19F를 나타내는 분리주 7주는 5가지 형태의 양상을 보였으나 이들간의 유사성은 약 80% 이상으로 높게 나타났다. 특히 같은 혈청형 그룹인 19A와 19F도 매우 유사한 양상을 보였으나 6A와 6B는 상이한 결과를 보였다. 또한 실험에 사용한 모든 임상 분리주들은 표준 균주인 *S. pneumoniae* ATCC 49619와는 다른 유전적 양상을 보였다(Figs. 1, 3). 동일 분리 균주를 제한 효소 *Apa* I으로 처리한 후의 PFGE 양상은 Fig. 2와 같다. 제한 효소 *Apa* I으로 처리한 경우는 *Sma* I으로 처리하여 확인된 25종의 밴드

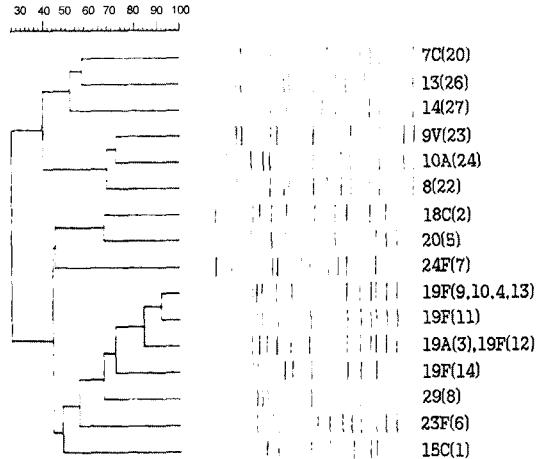


Fig. 4. Dendrogram of similarities among the serotypes (isolates) of *S. pneumoniae* by PFGE types (*Apa* I).

양상에 비하여 총 16가지 양상을 확인할 수 있었고 혈청형에 따라 각기 다른 PFGE 양상을 관찰할 수 있었다. 또한 Fig. 4의 dendrogram을 통해서 볼 때 *Sma* I과는 달리 혈청형 19F에 속하는 7주는 4가지 형태의 양상을 보였으며 이들의 상관성은 *Sma* I에 비하여 높게 나타났다. 특히 같은 혈청형 그룹인 19A와 19F는 같은 형태의 유전적 양상을 보였다.

IV. 고 찰

*Streptococcus pneumoniae*에 의한 폐렴구균성 질환은 세계적으로 그 발병율과 사망율이 가장 높은 질환중의 하나로 최근 항생제 내성 균주의 급증으로 치료에 많은 어려움을 겪고 있다. *S. pneumoniae*는 특히 항혈청에 의해 93개의 혈청형으로 구분되며, 발병 연령, 발병 지역 그리고 발생 연대에 따라서 우세 혈청형에 차이가 있음이 보고된바 있다. 본연구에서는 침습성 균주 56주를 대상으로 각 혈청형과 penicillin 내성 빈도를 분석한 결과 우세 혈청형은 19F(12.5%), 23F(10.7%), 14(10.7%) 그리고 9V(10.7%) 등의 순으로 분리되어 이들 4 혈청형에 포함되는 균주가 45%를 차지하였다. 1991년부터 1993년까지 국내 분리 균주 131주의 혈청형을 확인, 보고한 Lee 등¹³⁾의 결과를 보면 19F 26%, 23F 24%, 6A와 6B 9%, 14 7%로 이들 5개의 혈청형이 전체의 67%를 차지하는 것으로 확인되어 본 실험의 결과와 크게 상이하지는 않았다.

이들 혈청형이 확인된 균주(54주)를 성별과 나이에 따라 분리해 보면 6세 이하의 영, 유아와 60세 이상의

노년층에서 분리된 균주가 각각 20주(36%), 15주(27%)로서 약 63%에 이르렀음에 반해 청, 장년층에서 21주의 균주가 분리되었다. 특히 7세에서 18세까지의 청소년층에서는 단 3주만이 분리되었는데 이는 폐렴구균에 의한 질환이 영, 유아 및 노인층에서 빈번히 발생한다는 보고들과 유사한 결과이다. 그러나 본 실험에서 분리된 균주들의 연령에 따른 우세 혈청형 분포를 보면 6세 이하 영, 유아의 경우 19F, 23F, 14의 순이었고 노인층은 11A, 9V의 순으로 나타나 이전 다른 국내의 보고^{14,15)}에 의한 소아에서는 19F, 23F, 14, 6B, 6A 성인에서는 23F, 19F, 6A, 6B 순과는 다른 양상을 보였다. 이는 앞에서도 언급하였듯이 본 실험에 이용한 균주의 수가 적고 특정 균주만을 선별, 수집하였기 때문인 것으로 생각된다. 그러나, 영, 유아에서 침습성 질환 중 균혈증과 뇌수막염 환자에서 주로 발생하는 것으로 보고되어 있는 혈청형 19F와 23F가 우세하게 분리되었으며 노인층에서는 특히 복막염을 일으키는 것으로 보고된 혈청형 11A가 우세하게 분리되어 연령에 따른 질환의 차이를 나타내 주고 있다.

성별로 보면 남자로부터 분리된 균주가 70%로 여자에 비해 높은 감염율을 보였으나, 특정 질환에 대한 성별 차이를 판별하기에는 본 실험에 사용된 검체 수가 적어 이를 판정할 수는 없다고 본다.

*S. pneumoniae*의 항생제 내성 빈도는 최근 세계적으로 급증하고 있으며 이들 문제는 사회적, 보건학적으로 중요한 문제로 대두되고 있다.¹⁶⁾ 특히 폐렴구균성 질환의 치료에 이용되어 온 penicillin에 대한 내성 빈도가 세계적으로 급증하고 있어 약 15~50%에 이르고 있으며, 또한 1978년 Jacob¹⁷⁾ 등 다제내성균을 보고한 이래 최근에는 3종류 이상의 항생제에 복합적으로 내성을 보이는 다제 내성 균주 또한 확산되고 있는 실정이다.¹⁸⁾ 국내에서는 1986년 분리주 172주 중 penicillin 내성 균주가 1.7%로 보고된 이래,¹⁹⁾ 1996년에는 78%와 67.8%로 각각 보고되었고 특히 다제 내성균주도 35%에 이르는 것으로 보고되었다.²⁰⁾

이와 같이 국내의 *S. pneumoniae* 균주의 penicillin 내성과 다제 내성 균주의 임상 분리율은 세계적으로 가장 높은 것으로 보고되고 있으며 이는 국내 항생제 오, 남용과 정확한 진단이 없이 경험적으로 항생제 치료를 하는데서 온 결과라고 본다.

본 실험에서도 penicillin 내성을 확인한 결과 penicillin에 내성인 균주는 37주로 66.1%에 이르러 높게 나타났다.

항생제 내성과 혈청형과의 관련성을 보면 근래 스페인의 혈청형 23F 내성균주가 전세계적으로 확산되고 있

는 추세인데,²¹⁾ 국내에서도 박 등,¹⁴⁾ Lee²²⁾ 등에 의하면 23F, 19F, 14, 6 등의 혈청형이 페니실린 내성과 관련이 있음이 연구 발표되었다. 미국에서도 6B, 19F, 23F 혈청형이 페니실린 내성율이 높는데 이는 이들 혈청형이 미국이나 한국에서 소아 연령에서 가장 흔한 분포를 보이는 혈청형이며 본 실험에서도 우세 혈청으로 확인된 이들 균주들은 페니실린 내성율이 높은 것으로 나타나 이들 혈청형이 항생제 치료에 노출됨으로써 내성 획득에 더욱 큰 영향을 줄 것으로 사료된다.

본 연구에서는 이를 분석하기 위하여 각 혈청형별 유전적 상관성을 PFGE 양상으로 비교하였다. 사용균주의 GC 함량에 적합한 제한 효소인 *Sma* I로 처리하였을 때 25가지 형태의 양상을 확인할 수 있었으며 일반적으로 혈청형과 PFGE 양상과는 관련성을 보여 혈청형에 따라 각기 다른 PFGE 양상을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 가장 많이 분리된 혈청형 19F 균주 7주 중 3주는 같은 양상을 보였으나, 나머지 4주는 서로 다른 양상을 보이므로 모두 57가지 형태의 양상을 보였으나 이들간의 유사성은 약 80% 이상으로 높게 나타났다.

동일 분리 균주를 제한 효소 *Apa* I로 처리한 후에도 *Sma* I과 유사한 결과를 얻었으나 *Sma* I에 비하여 PFGE 양상 관찰이 용이하지 않아 각 혈청형별 균주를 모두 관찰할 수는 없었으므로 *S. pneumoniae*의 PFGE 양상 비교를 위해서는 제한 효소 *Sma* I을 이용하는 것이 밴드 관찰에 용이함을 확인하였다. 그러나 *Apa* I의 처리로 분리된 PFGE 양상도 *Sma* I과 유사한 양상을 보였다.

V. 결 론

*Streptococcus pneumoniae*는 감염성 질환 중 발병율과 치사율이 가장 높은 폐렴의 주 원인균이다. 본 연구에서는 폐렴구균성 질환에 대한 조기 진단 및 예방을 위한 기초 연구로 국내 병원성 폐렴구균 균주에서 침습성 균주를 일차 선별하여 이들의 혈청형 및 penicillin 내성 빈도, PFGE를 통한 염색체 DNA의 양상 등을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 병원성 *S. pneumoniae* 균주를 혈액으로부터 39주, 뇌척수액으로부터 8주 그리고 그 외 가검물로부터 9주를 포함한 총 56주의 균주를 분리하여 혈청형 및 penicillin 내성을 확인하였다.

2. penicillin에 내성인 균주는 66.1%로 나타났다.

3. 이들 침습성 균주 중 우세 혈청형은 19F(12.5%), 23F(10.7%), 14(10.7%), 9V(10.7%) 등의 순으로 분리되었다.

4. 각 혈청형별 유전적 상관성을 PFGE 양상으로 비교하였을 때 혈청형에 따라 각기 다른 PFGE 양상을 관찰할 수 있었으며 같은 그룹의 혈청형을 가진 균주들도 각 factor별 혈청형에 따라 다른 양상을 보였다. 이상의 실험결과는 국내 폐렴구균의 발생동향 연구 및 향후 진단 및 치료의 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구수행에 많은 도움을 주신 국립보건연구원 호흡기 세균과 직원들께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Noel, R. R., de Macario, E. C., Folds, J. D., Lane, H. C. and Nakamura, R. M. : Manual of clinical laboratory immunology. 5th edition. ASM. Washington. 1997.
- Centers for Disease Control, and Prevention. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **46**, 1-24, 1997.
- Kim, S. N., Kim, S. W., Choi, I. H., Pyo, S. N. and Rhee, D. K. : High incidence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Microbial Drug Resistance*, **24**, 401-406, 1996.
- Song, J. H., Lee, N. Y., Ichiyama, S., Yoshida, R., Hirakata, Y. and Fu, W. *et al.* : Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries : Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Clin. Infect. Dis.*, **28**, 1206-1211, 1999.
- Bruyn, G. A. W., Zegers, B. J. M. and van Furth, R. : Mechanism of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.*, **14**, 251-262, 1992.
- Henrichsen, J. : Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2759-2762, 1995.
- Nielsen, S. V. and Henrichsen, J. : Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 794-798, 1992.
- Takala, A. K., Vuopio-Varkila, J., Tarkka, E., Leinonen, M. and Musser, J. M. : Subtyping of common pediatric pneumococcal serotypes from invasive disease and pharyngeal carriage in Finland. *J. Infect. Dis.*, **173**, 128-135, 1996.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. : *Streptococcus*. In Tenover, K. L., R. A. Whiteley, and D. Beighton (ed.). Manual of clinical microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1999.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. M100-S8. 18(1):6-38. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1998.
- Rudolph, K. M., Parkinson, A. J. and Roberts, M. A. : Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B isolates from selected areas within the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2703-2707, 1998.
- Li Wen-Hsiung : Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 1085-1089, 1981.
- Lee, H. J., Park, J. Y., Jang, S. H., Kim, J. H., Kim, E. C. and Choi, K. W. : High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea. *Clin. Infect. Dis.*, **20**, 826-835, 1995.
- 박진영, 김미란, 장성희, 이환중, 최강원, 김의중, 김제학 : 임상검체에서 분리된 폐구균의 혈청형 분포 및 항균제 감수성. *감염*, **26**, 9-19, 1994.
- Tarasi, A., Chong, Y., Lee, K. W. and Tomasz, A. : Spread of the serotype 23F multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* clone to South Korea. *Microbial Drug Resistance*, **3**, 105-109, 1997.
- Linares, J., Pallares, R., Alonso, T., Perez, J. L., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, P. F. and Martin, R. : Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 99-105, 1992.
- Jacobs, M. R., Koornhof, H. J., Robins-Browne, R. M., Stevenson, C. M., Vermaak, Z. A. and Freiman, I. *et al.* : Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 735-740, 1978.
- Schutze, G. E., Kaplan, S. L. and Jacobs, R. F. : Resistant pneumococcus: a worldwide problem. *Infection*, **22-4**, 233-237, 1994.
- 이삼열, 정운섭 : Pncicillin G 내성 *Streptococcus pneumoniae*의 분리 현황과 β -용혈성 연쇄구균 및 장구균의 항균제 감수성. *대한화학요법학회지*, **4**, 44-51, 1986.
- Song, J. H., Yang, J. W., Peck, K. R., Kim, S., Lee, N. Y., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C. and Pai, C. H. : Spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Clin. Infect. Dis.*, **25**, 747-749, 1997.
- Munoz, R., Coffey, T. J., Daniel, M., Dowson, C. G., Laible, G. and Casal, J. *et al.* : Intercontinental spread of a multi-resistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*, **164**, 302-206, 1991.
- Lee, H. J., Choi, E. H., Park, J. Y., Kim, E. C., Kang, J. A. and Kim, J. H. : Antibiotic resistant pneumococcal infections in Korean children. Prevalence of resistance and response to treatment. The 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New Orleans. Sep 15-18. Abstract No. C50. 1996.