

Polymerase Chain Reaction을 활용한 국내 동물과 사람환자에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 분리주의 분자역학적 특성분석

우용구^{1*} · 김 신²

¹서울대학교 실험동물자원관리원, ²안동대학교 미생물학과

국내 사육 한우, 염소, 돼지, 개, 닭 및 마우스 등을 포함한 각종 동물과 사람환자에서 분리한 총 116주의 *S. aureus* 분리주에 대해서 5종의 PCR 기법을 적용하여 분자역학적 특성을 분석하였다. 먼저 종특이 유전자 (SSG: *aroA*, *coa*, *nuc* 및 *spa-gene*)의 다양성을 PCR 기법으로 조사하였고, 또한 약제내성의 MRSA 균주의 분포양상과 내독소 (Enterotoxin) 산생유전자 (SE)의 분포양상에 대해서도 조사하였다. 그리고 이 연구에서 수행한 5종의 PCR 기법들이 생산한 개별성적을 객관적으로 비교하여, 가장 신뢰도 높고 효율적인 PCR 기법을 선발하였다. 먼저 PCR 기법을 적용한 SSG의 분포양상 조사에서는 *nuc-gene* (100%), *spa-gene* (91.4%), *coa-gene* (87.9%), 및 *aroA-gene* (26.7%)의 빈도로 조사되었다. 그리고 *aroA*와 *coa-gene* PCR 증폭산물에 대한 *RsaI*과 *AluI* 효소로 소화시킨 RFLP 성적에서, *coa-gene* PCR-RFLP에서는 모두 10 type의 *coa-type*이 동정되었고, 그중 *coa-3 type* (809 bp)이 닭, 마우스, MRSA 및 사람유래 균주를 포함한 총 36주 (33.0%)로서 가장 대표적인 genotype으로 결정되었다. 반면에 *aroA-gene* PCR-RFLP에서는 단지 7 type의 genotype만이 산생되어 대조를 보였고, 17주 (73.9%)가 대표적인 그룹으로 분류되었다. 한편 *spa-gene* PCR에서는 총 11 type의 *spa-type*이 확인되었고, 그중 *spa-7 type* (9 repeats; 263 bp)이 한우, 닭, 개, 염소, 마우스 및 MRSA 균주 등을 포함한 총 39주 (34.8%)로서 가장 대표적인 genotype으로 결정되었다. 또한 총 116주에 대해 MRSA 균주의 신속한 검출을 위해서 *mecA-gene* PCR을 적용하였던 바, 단지 사람유래의 14주 (12.1%)에서만 양성인 증폭산물 (533 bp)이 검출되었고, 이들 증폭된 PCR 산물의 유전학적 검증을 위해 *HhaI*으로 소화시켰던바, 14주 모두 (100%)가 알려진 2개의 DNA band (332 & 201 bp)로 양분되어 유전자 수준에서 MRSA 양성균주로 검증되었다. 한편 내독소 산생유전자 (SE-gene)는 multiplex-PCR 기법으로 조사하였으며, *sea-gene* (63.7%)이 가장 지배적이었고, 이어서 *seb-gene* (10.0%) 및 *sec-gene* (7.2%)의 순서였다. 특히 *sea+sec*의 2종의 SE genes를 보유한 균주도 11주로서 가장 많았으며 그 외에도 *sea+seb* (2주) 및 *seb+see* (1주) genes를 보유한 균주도 함께 검출되었다. 최종적으로 5종의 PCR 기법들이 생산한 성적들을 수치 (SID)로 변환하여 객관적으로 감별능력 (DA)을 비교하였던바, *aroA-gene* PCR-RFLP는 가장 저조한 DA [SID=0.462]을 나타내었고, 반면에 *coa-gene* PCR-RFLP는 5종의 분석기법 중에서 가장 신뢰도 높은 DA [SID=0.894]를 발현하였다. 따라서 현재의 연구결과 *coa-gene* PCR-RFLP 기법이 사람을 포함한 다양한 동물종유래 *S. aureus* 균주들의 유전학적 분석목적에 가장 신뢰도 높고 감별능력이 뛰어난 분석기법으로 선발되었다.

Key words □ Animals, Molecular epidemiology, PCR-RFLP, *S. aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)는 동물과 사람에서 공히 중요한 인수공통병원균인 관계로 병원성 인자의 명료한 구명을 위한 연구들이 집중적으로 수행되어 왔으며, 그 결과 다종다양한 방법들이 제시되어 왔다(12). 그중 전통적인 표현형질상의 특성에 근거한 분석방법들은 결과성적의 확보를 위해서 장시간과 노동력이 소요되는 단점이 알려져 있다. 반면 최근 들어 관심의 대상으로 부각된 유전학적 분석방법들은 결과산출이 신속하고 적은 노력으로도 명료한 성적을 획득할 수 있는 장점으로 다양한 수준의 실험실에서 널리 활용되고 있다(7, 13, 25). 따라서 전술한 장점으로 인하여 PCR에 기초한 유전학적 분석방법들은 다양한 수준의 실험실에서 *S. aureus*를 비롯한 다종다양한 세균종의 동정은 물론 종 또는 혈청형 그 이하 수준의 분석을 위한 도구

로 활용되고 있는 실정이다(8, 12, 23).

*S. aureus*의 종특이단백질(SSP: species-specific protein)인 coagulase (*coa*)와 protein A (*spa*)를 지배하는 유전자의 염기서열상에 변이현상이 밝혀지면서 이 현상을 PCR 기법으로 검출하여 균주의 분자역학적분석(Molecular epidemiological analysis) 목적에 널리 활용되고 있다(12-14, 23, 26). Lange 등(19)에 따르면 coagulase는 *S. aureus*의 모든 균주가 산생하며, 균종감별을 위한 주요표식인자(major marker)의 하나로 활용이 가능하며, 가금유래 균주에서는 병원성 균주의 감별기준으로 활용되고 있다. 알려진 바와 같이 *coa-gene*은 염기서열상 3'-말단에서 81 bp 크기의 변이현상이 발생되어 동일한 표현형의 균주라도 유전학적 차이를 발현하게 된다는 것이다. 그리고 *coa-gene*에서 특정의 제한효소의 인식부위에 있어서도 다양성이 발생되어 이를 검출할 경우 유용한 유전학적 분석이 가능하다는 것이다. 그래서 PCR 수행 후 그 증폭산물을 제한효소로 소화처리 한 후 그 단편들의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-880-8151, Fax: 02-886-05784
E-mail: wooyk@snu.ac.kr

다양성을 분석하는 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 기법이 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다(13, 21). 그러므로 전술한 분석기법을 국내 각종 동물유래 균주에 대해서 그 감별능력을 객관적으로 평가해 볼 필요가 있을 것으로 사료되었다.

한편 protein A는 *S. aureus*의 세포벽성분 중에서도 peptidoglycan layer의 내부에 분포되어 있고, IgG 분자의 Fc 영역에 결합하는 능력을 갖고 있는 종특이 병원성인자로서 균배양시 그 성분이 배지내로 유출되며, 균의 탐식이나 opsonization을 방해하는 기능을 발현하는 것으로 알려져 있다(14, 23). 그리고 임상실험실 수준에서 protein A의 존재 여부는 평판 및 시험관 응집법으로 증명하며, 한편 protein A를 인식하고 있는 유전자(*spa-gene*)도 역시 X-region에서 24 bp 크기로 다양한 숫자의 반복서열(repeating sequences)을 포함하고 있어 *coa-gene*처럼 돌연변이 현상이 발생되며 결과적으로 현재 25종 이상의 변이주가 출현하고 있으며, 또한 X-region의 반복단위(repeat unit)의 숫자가 많은 균주가 MRSA 균주와 관련성이 있다고 보고한 연구자도 있다(14, 23). 따라서 전술한 사항들에 대해서도 국내의 다종다양한 동물유래 분리주에 대한 성적의 확보가 필요한 실정으로 보인다.

한편 *aroA-gene*는 *Aeromonas hydrophila*에서 방향성의 아미노산과 엽산의 생합성경로를 담당하는 핵심효소를 지배하는 유전자이며, PCR-RFLP 기법을 적용하여 *Aeromonas* 속균의 유전학적 분석목적으로 활용되고 있다. Marcos 등 (21)은 *S. aureus*에서도 *aroA-gene*가 존재하여 균종감별과 동시에 PCR-RFLP로서 유전자 수준에서 종이하의 역학적 분석목적까지 수행이 가능하다고 보고하였다. 따라서 이 유전자의 유용성이 현재의 공시균주들에 대해서 어떠한 성적을 발현할지에 대해서도 조사하고자 하였다.

한편 역학적으로 중요한 균종의 경우 정확한 동정은 물론 그 보균매체나 감염원을 명확히 추적해내는 것은 동물집단 내에서 또는 집단 상호간에 있어서 중요하다. 특히 그 균종이 인수공통 병원체의 경우라면 동물집단을 초월하여 심지어 사람에까지 영향을 미치게 되므로 이들 병원체에 대한 정밀한 감시체계 (monitoring system)의 확보는 필수적이라 할 수 있다(18, 28). 최근에는 MRSA 균주가 동물에서 사람으로의 전통적인 전파양상 외에도 특이하게도 역방향으로 사람에서 동물로의 역전파 (reverse zoonosis) 현상이 보고되었다(11, 25, 27). 따라서 국내의 경우 동물의 질병치료를 위해서 항생제가 거의 제약 없이 사용이 가능한 실정에서는 다양한 수준의 약제내성균들의 출현에 대한 추적연구가 대단히 중요하며 반드시 필요할 것으로 보이며, 아울러 신속하고 특이적으로 MRSA 균주의 검색을 위한 유전학적 기법의 확립이 필요한 실정으로 보인다.

*S. aureus*에 대한 유전학적 분석기법들은 어느 균종보다도 다종다양하게 개발되어 왔기 때문에, PCR을 포함한 다양한 유전학적 분석기법의 이해와 활용기술을 습득함에 있어서 더 없이 적절한 연구분야로 간주되고 있다. 그리고 필자를 비롯하여 지금까지 다양하게 개발되어 있는 PCR 기법을 활용한 다양한 성적들을 개별적으로 보고한 바 있다. 따라서 다종다양한 분석기법들이

산출해낸 성적들 역시 다양할 수밖에 없기 때문에 객관적이고 과학적인 방법에 근거하여 분석기법들이 확보한 고유한 감별능력(Discriminative ability: DA)에 대한 비교분석 연구는 그동안 없었던 실정이다. 따라서 이 연구에서는 전술한 사항에 대한 성적을 확보하고자, 사람을 포함한 다종다양한 동물숙주유래의 공시균주들을 활용하여 *S. aureus* 균주의 유전학적 분석에 활용된 5종의 PCR 기법 중에서 가장 신뢰도 높은 DA를 확보한 PCR 기법을 선별하여 알리고자 하는데 연구의 궁극적인 목적을 두고 Hunter와 Gaston (15)이 활용했던 Simpson's index of diversity (SID)를 산출하여 개별 PCR 기법의 DA를 수치로서 비교 하였던바 흥미로운 성적을 얻었기에 이를 알리고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

공시한 *S. aureus* 균주들은 우 등(4)이 보고한 1996년 이후 한국의 도계장에서 수거한 계육과 시판계육 등에서 분리한 균주로서 지역적으로 대표적인 균주를 선별하였고, 다양한 동물 종유래 분리주들은 경북 북부지역에 사육중인 한우, 흑염소, 돼지 및 닭과 실험용마우스에서 분리된 균주들이다. 이들 균주들은 임상증상이 발견되어 가족위생시험소 경북북부지소에 질병진단의 목적으로 의뢰된 환축에서 분리된 균주들이다. 반면 실험용 마우스유래 균주는 사육 및 실험과정에서 관찰된 화농병소에서 분리된 균주이며, 김 등(1)이 제공한 사람유래 20주의 MRSA 및 MSSA (methicillin sensitive *S. aureus*) 균주들은 포함하여 총 116주를 공시하였다. 그리고 각종 실험의 대조를 위해서 *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 5663 및 *S. aureus* NCTC 9393과 *S. epidermidis* ATCC 12228 등의 균주도 함께 공시하였다.

균종감별

이 연구에 사용된 균주들의 표현형질상 특성에 근거한 균종감별은 표준실험실 동정법으로 실시하였다. 보관상 및 실험절차상 오류로 인하여 추가로 동정이 필요한 균주들과 PCR 시험에서 재동정이 필요한 균주들에 대해서는 MacFaddin 등(20)의 표준실험실 동정법에 근거하여 균종감별을 재차 확인한 후에 시험에 사용하였다.

Chromosomal DNA 추출 및 정제

신속한 균종감별 목적으로 *nuc-gene* PCR에서 양성으로 확인된 균주만 genomic DNA의 추출과 정제를 실시하였으며, lysozyme (Sigma, USA)과 lysostaphin (Sigma, USA)으로 소화시키고 proteinase K (GibcoBRL, USA)로 추가로 소화시킨 후, phenol을 이용한 DNA 추출법으로 순수하게 추출된 DNA를 PCR 시험에 사용하였다.

aroA-gene PCR 및 RFLP

순수 정제된 DNA를 사용하여 *aroA-gene* PCR을 수행하였고, primer 쌍은 Marcos 등(21)의 정보에 따라서 FA1과 RA2 primer

의 합성을 의뢰(Bioneer, Korea)하여 사용하였다. PCR 반응은 시험간의 편차를 줄이고 일관성 있는 성적의 산출을 위해서 상품화된 PCR premix kit (Bioneer, Korea)를 구입하여 사용하였다. PCR 장치는 Applied-Biosystem (Type 9700, USA) 장치를 사용하였고, PCR 조건은 전자 등 (21)의 방법에 따라서 수행하였으며, TAE buffer (Bioneer, Korea)를 사용하여 1.5~2% agarose gel을 사용하여 전기영동법으로 특이증폭산물을 확인하였다. 전기영동법으로 해당크기에서 증폭산물이 확인된 균주의 *aroA*-gene PCR 증폭산물에 대해서는 *RsaI* (Invitrogen, USA) 효소를 적용하여 PCR 증폭산물 12 µl에 10 U의 RE와 10X reaction buffer와 BSA를 각각 포함하도록 혼합하여 총 20 µl의 용량으로 조절한 후에 37°C에서 8시간 배양으로 소화시킨 후, 2~2.5% agarose gel을 사용하여 소화된 DNA 단편들의 다양성을 확인하고 사진촬영 하였다. 성적의 분석은 사진촬영(Polaroid, Kodak)을 하고 이를 스캐너(HP Scanjet 35000, USA)를 이용하여 그림파일(TIFF Image)로 전환하고 전문분석 프로그램인 Bio-1D2+ software (Vilber Lourmat, France)와 GelCompar II software (Applied Math, Belgium)를 사용하여 5%의 허용한계 범위에서 DNA bands의 상관성은 Dice coefficient 방법에 따라서 결정하였고, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) 방법으로 dendrogram을 작성하고 clustering(군집형성)분석을 실시하였다. 이렇게 분석된 성적에 근거하여 객관적인 수치인 SID 값으로 산출하여 해당 분석기법이 확보하고 있는 감별능력 (Discriminatory ability: DA)을 최종적으로 평가하는 절차에 따랐다.

Coagulase (*coa*) gene-PCR을 이용한 polymorphism 분석

Montesinos (23)의 정보에 따라서 *coa*-gene의 변이유전자 영역 (variable region)에서 primer를 선발하였다. PCR의 수행은 우 등 (4)이 이미 확립한 조건으로 수행하였고, PCR 연쇄반응은 전술한 방법과 동일하게 PCR premix kit를 사용하여 수행하였다. *coa*-gene PCR에서 출현하는 다양한 크기의 증폭산물들에 대해서는 전술한 바와 동일한 절차로 분석을 수행하였다.

coa-gene PCR-RFLP 분석

coa-gene PCR 증폭산물 10 µl를 10 U의 *AluI* enzyme (Sigma, USA)으로 소화시켰다. 이렇게 소화된 DNA 단편들은 분석능을 향상시키고자 2% PFGE grade agarose gel (Bio-Rad, USA)를 사용하여 전기영동을 수행하고 사진촬영을 하였으며, 나머지의 절차는 전술한 방법과 동일하게 수행하였다.

Protein A (*spa*)-gene PCR을 이용한 polymorphism 분석

spa-gene의 증폭을 위한 PCR primer는 GeneBank (X61307)의 유전자 염기서열 중에서 forward primer는 1522~1544의 위치와 reverse primer로 1784~1806의 위치에서 결정하고 합성을 의뢰하여 사용하였고, PCR-premix kit를 사용하여 수행하였다. PCR 조건은 미리 95°C에서 3분간 열변성 과정을 우선 수행하고 이어서 총 30회의 본 반응으로서 94°C에서 1분간 열변성과 60°C에서 1분간 primers의 합성과정, 72°C에서 1분간의 표적 DNA의 신장

과정을 수행하도록 구성하였고, 추가로 72°C에서 10분간의 신장 반응을 1회 수행하고 프로그램을 종결하였다. 전기영동법으로 결과산물을 확인하였고, 다양한 크기로 검출된 *spa*-gene PCR 증폭산물의 분석은 전술한 바와 동일한 절차로 수행하였다.

MRSA 균주의 신속검출을 위한 *mecA*-gene PCR 및 MRSA 균주의 유전학적 검증

PCR을 이용한 *mecA*-gene의 검출용 primers는 Vannuffel 등 (29)의 정보에 따라서 합성하여 사용하였다. PCR 증폭산물의 확인은 2% agarose gel을 사용하였고, 125 V에서 30분간 전기영동을 수행하고 자외선 조사장치로 533 bp 크기의 *mecA*-gene의 특이증폭산물을 확인하였다. 그리고 MRSA 균주의 유전자 수준에서의 신속한 검증은 York 등(30)의 방법에 따라서 *HhaI* (Sigma, USA)의 제한효소로 증폭산물을 소화시켜서 332 bp와 201 bp 크기의 2개의 DNA band로 양분되는 균주를 MRSA 양성균주로 결정하였다.

Multiplex-PCR (M-PCR)을 이용한 내독소 (enterotoxin) 유전자 (SE)의 검출

국내 사람과 각종 동물에서 분리한 *S. aureus* 균주들이 산생하는 내독소(SE)의 분포양상의 조사는 Mehrotra(22)의 방법에 따라서 SEA (120 bp), SEB (478 bp), SEC (257 bp), SED (317 bp), SEE (170 bp), TSST (350 bp) 등의 6종의 SE 유전자를 동시에 증폭하기 위한 M-PCR 기법을 사용하였다. M-PCR용의 6쌍의 primer도 전자(22)의 정보에 따라 합성을 의뢰하여 사용하였고, 역시 PCR premix kit를 사용하였다. 그리고 PCR 반응이 완료된 후 증폭산물은 전자(22)의 성적과 대조균주 SE의 증폭산물의 크기와 비교하면서 SE의 분포양상을 분석하였다.

Simpson's index of diversity (SID)에 근거한 PCR 기법 상호간의 감별능력(Discriminatory ability: DA)의 비교평가

Hunter와 Gaston(15)의 방법에 따라서 우리의 연구에서 적용한 5종의 PCR 기법들이 생산한 결과성적을 기초로 하여 개별 분석 기법들이 확보하고 있는 DA를 알기 쉽고 보기 쉽도록 객관적인 수치로 변환하여 비교하고자, Simpson's index of diversity (SID)를 산출하여 평가하는 방법을 사용하였다. SID의 계산은 전자의 공식에 따라서 계산하여 산출하고, 또한 평가기준에 따라서 최종 SID 값이 0.900 이상을 확보한 분석기법은 신뢰도를 인정할 수 있는 DA를 확보한 기법으로 평가되지만, SID 값이 0.900 이하인 분석기법은 그렇지 못한 기법으로 평가하였다.

결 과

aroA-gene PCR

다종다양한 동물과 사람유래의 총 116주의 *S. aureus* 균주들이 보유하고 있는 *aroA*-gene의 신속한 검출을 위한 PCR에서 양성 균주는 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 약 1,153 bp 크기에서 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다. PCR 성적에서는 공식균주

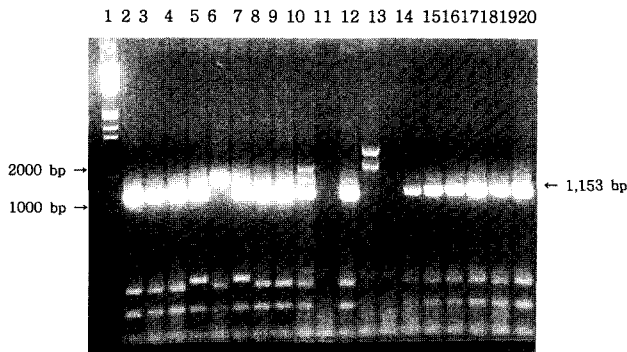


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of fragments produced by *RsaI* digestion of *aroA*-gene PCR products (1,153 bp) and PCR-RFLP from *S. aureus* strains. Lane 1; 1 kb DNA molecular marker (2% agarose gel, Bio-Rad, USA), lanes 2-5; *S. aureus* strains from Korean cattle (aro-type I), lanes 6-9; *S. aureus* strains from humans (aro-type I & II), lanes 10-20; *S. aureus* MRSA strains from human (aro-type I), lanes 11 and 14; *aroA*-gene PCR negative strains.

중 단지 99주(73.9%)만이 약 1,153 bp 크기에서 양성인 단일한 증폭산물이 확인되었다. 이는 우리의 연구에서 수행한 PCR 기법 중 가장 저조한 양성을 성적으로 조사되었다. 한편 동물 숙주별 성적에서는 돼지(2주), 염소(3주), 개(1주) 및 한우(8주)유래의 모든 균주 (100%)는 *aroA*-gene 양성인 PCR 증폭산물이 확인되었지만, 젓소 유방염유래 32주 중에서 31주 만이 양성반응(96.9%)을 보였고, 닭 유래의 24주중 5주(20.8%)만이 양성반응을 보여 가장 낮은 양성을 성적을 나타내었다. 그리고 MRSA 균주를 포함한 사람유래 총 45주중 32주(71.7%)에서만 양성인 PCR 증폭산물이 확인되었다.

***aroA*-gene PCR-RFLP**

S. aureus 분리주들이 산생한 *aroA*-gene PCR 증폭산물을 *RsaI* 제한효소로 소화시켜 산생된 다양한 크기의 DNA 단편들의 그림은 Fig. 1에서와 같았다. 먼저 젓소 유방염유래 균주와 한우에서

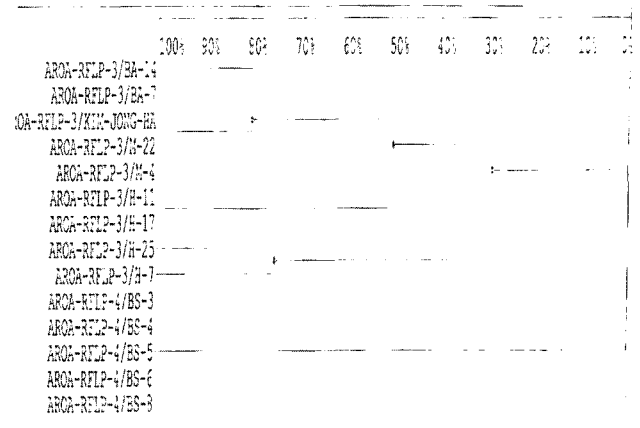


Fig. 2. Dendrogram pattern based on DNA profiles obtained by *aroA*-gene PCR-RFLP of representative *S. aureus* strains from diverse animal species and humans. (BA & BS; strains from cattle, H; from humans, M; from mouse).

분리된 균주에 대한 PCR-RFLP pattern에서는 약 900 bp에서부터 총 7개의 DNA 단편으로 소화되었으며, 시야로는 균주간의 거의 유사한 양상을 보여 균주간의 명확한 감별은 곤란하였다. 한편 사람유래 균주의 경우 2~7개의 DNA 단편들로 소화되었지만, 대부분 균주의 유전자 양상이 비슷하여 균주간의 뚜렷한 감별은 분명하지 않았다. 그리고 마우스에서 분리된 균주들은 3~4개의 DNA band로 소화되었지만, 역시 균주간에 비슷한 양상을 보였다. *aroA*-gene PCR-RFLP 기법이 확보하고 있는 DA를 객관적으로 분석 및 평가하기 위한 성적은 Fig. 2에 나타낸 바와 같았고, 분석프로그램으로 작성된 dendrogram에 근거하여 SID 값을 산출하였을 때 0.462의 성적으로 기준치에 훨씬 못 미치는 성적으로 비교대상 PCR 기법 중에서는 가장 신뢰도가 떨어지는 성적으로 조사되었다.

***coa*-gene PCR에 근거한 genotyping**

음성대조균주로 공시하였던 *S. epidermidis* ATCC 12228 균주는 *coa*-gene PCR에서 어떠한 증폭산물도 인정되지 않았다. 반면에 *S. aureus* ATCC 13515 (743 bp), *S. aureus* NCTC 5663 (1,164 bp), *S. aureus* NCTC 9393 (853 bp) 및 *S. aureus* ATCC 13565 (728 bp) 등의 균주들은 각각 다양한 크기의 *coa*-gene이 검출되었다. 따라서 *coa*-gene PCR 기법의 특이성을 확인할 수 있었으며, 공시한 총 116주에 적용하였을 때, 총 109주(94.0%)에서 다양한 크기의 양성인 *coa*-gene이 검출되었다. Fig. 3에서 나타낸바와 같이 *coa*-gene은 약 650 bp~2.0 kb 크기로 분포하였고, 그중 810~900 bp 크기의 PCR 증폭산물이 43주(39.4%)에서 확인되어 가장 대표적인 *coa*-type으로 결정되었으며, 이어서 710~800 bp 크기의 증폭산물이 29주 (26.6%)로 2번째로 많았다.

Goh 등(12)의 분석방법에 근거하여 *coa*-gene의 유전학적 다양성을 조사한 결과(Table 1), 공시균주들은 모두 10 type (coa 1~10 type)의 *coa*-type으로 세분되었으며, *S. aureus* ATCC 13565 균주

Table 1. Polymorphic patterns of *coa*-gene PCR products of 109 of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

No. of sequence repeat (81 bp) of <i>coa</i> -gene	Designated <i>coa</i> type	Average size of <i>coa</i> -gene PCR product (bp)	No. of total positive strain (%)
-1	coa 1	< 647	5 (4.6)
0*	coa 2	728	18 (16.5)
1	coa 3	809	36 (33.0)
2	coa 4	890	26 (23.9)
3	coa 5	971	12 (11.0)
4	coa 6	1,052	2 (1.8)
5	coa 7	1,133	2 (1.8)
6	coa 8	1,214	1 (0.9)
7	coa 9	1,295	1 (0.9)
8	coa 10	> 1,376	6 (5.5)
Total	10	647-1,376	109 (100)

**S. aureus* ATCC 13565 strain was used as *coa*-gene (728 bp)

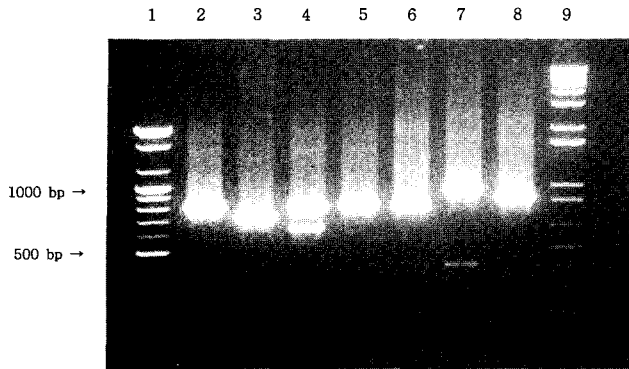


Fig. 3. The polymorphism of *coa*-gene PCR products of *S. aureus* strains from animals and humans. Lanes 1; 1 kb DNA marker (2% agarose gel, Bio-Rad, USA), lane 9; 1 kb Plus DNA marker, lanes 2, 5 & 6; (*coa*-3; 817 bp, 1-repeat) *S. aureus* strains from cattle, goat, human, lane 3; (*coa*-2; 740 bp, 0-repeat), This strain was the same pattern with *S. aureus* ATCC 13565, which was the *coa*-gene reference strain (*coa*-2; 728 bp size, 0 repeat), lane 4; This strain produced two bands of *coa*-gene product [*coa*-3 & 1; 834 bp (I), and 662 bp (II), 1 & (-1)-repeat], lane 7; [*coa*-6 & *coa*-1; 1,022 bp and 459 bp, 4 & (-1)-repeat], lane 8; (*coa*-4; 892 bp, 2-repeats).

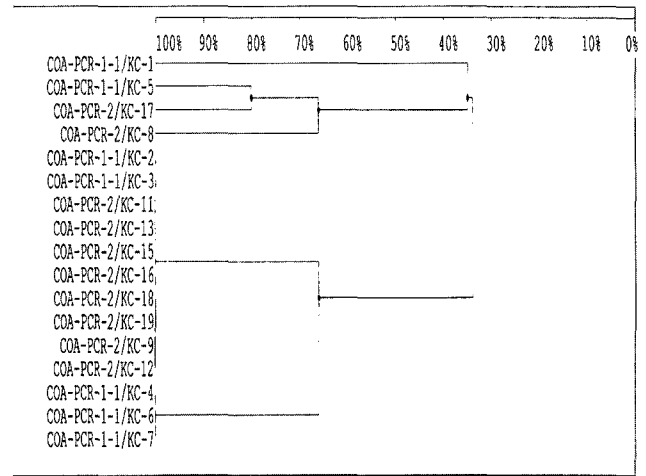


Fig. 4. Dendrogram pattern based on DNA fingerprints obtained by *coa*-gene PCR of representative seventeen *S. aureus* strains from Korean cattle (KC).

와 동일한 PCR 증폭산물(678~758 bp)을 나타낸 균주(*coa*-2 type)들은 모두 18주(16.5%)로 3번째로 많은 빈도를 차지하였다. 반면에 *coa*-3 type은 *S. aureus* ATCC 13565 균주 보다는 81 bp repeat의 유전자가 하나 더 추가된 1 repeat 균주로서 36주(33.0%)로서 가장 지배적인 유전형이었다. 한편 2 repeats (840~920 bp; *coa*-4 type)의 균주는 26주(23.9%)였고, 3 repeats (921~1,001 bp; *coa*-5 type)의 균주도 12주(11.0%)나 발견되었다. 그 외에도 8 repeats의 변이주도 6주(5.5%), ATCC 13565 균주보다 2 repeats나 모자라는 변이주도 5주(4.6%)나 발견되었다. 반면에 *S. aureus* NCTC 5663 균주는 1,164 bp 크기의 증폭산물을 산생하여 *S. aureus* ATCC 13565 균주에 대해 6 repeats의 변이주로 판단되며 *S. aureus* NCTC 9393 균주는 2 repeats의 변이주였고, *S. aureus* ATCC 13515 균주는 743 bp 크기의 증폭산물로서 *S. aureus* ATCC 13565 균주와 일치하는 유전형으로 분류할 수 있었다(Table 1).

Table 2에서는 다양한 동물종과 사람유래 분리주에 대해서 *coa*-gene의 분포양상의 성적을 토대로 분자역학적 다양성을 종합적으로 정리한 성적이다. 먼저 한우유래 균주의 경우 *coa*-5 type (3 repeats)이 9주(47.4%)로 가장 대표적인 유전형으로 확인되었고, 닭유래 균주에서는 *coa*-3 type (1 repeat)이 8주(33.3%)로 가장 지배적이었다. 반면 오리에서 분리된 2주는 공히 8 repeats 이상(2,381 및 1,920 bp)의 변이를 나타낸 균주로 확인되었다. 그리고 염소유래 3주는 *coa*-4 type (2 repeats)이 2주 (66.7%)였으며, 나머지 1주는 *coa*-5 type (3 repeats)으로 결정되었다. 그리고 마우스에서 분리된 균주들은 *coa*-4 type (2 repeats)와 *coa*-3 type (1 repeat)의 균주가 9주 (40.9%)와 10주 (45.5%)로 거의 비슷한 양상으로 확인되었다. 한편 경북북부지역의 사람유래 균주 중에서 MRSA 균주의 경우 *coa*-3 type (1 repeat)이 5주 (45.5%)로 가장 많았고, *coa*-4 type (2 repeats)도 4주 (36.4%)나 발견되었다. 반면에 사람유래 전체 균주의 경우에는 *coa*-3 type (1 repeat)이 11주 (45.8%)로 가장 많았고, *coa*-4 type (2 repeats)도 7주 (29.2%)나 분포하였다.

Table 2. Distribution pattern of *coa*-gene profiles of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Origin of strains	<i>Coa</i> -gene genetic patterns							
	Korean Cattle	Chicken	Dog	Korean Goat	Mouse	Pig	MRSA	Human
<i>coa</i> -genotype ※	<i>coa</i> 5(9)	<i>coa</i> 4(4)	<i>coa</i> 4(5)	<i>coa</i> 4(2)	<i>coa</i> 4(9)	<i>coa</i> 4(1)	<i>coa</i> 4(4)	<i>coa</i> 4(7)
	<i>coa</i> 4(2)	<i>coa</i> 3(8)		<i>coa</i> 5(1)	<i>coa</i> 3(10)		<i>coa</i> 3(5)	<i>coa</i> 3(11)
	<i>coa</i> 7(3)	<i>coa</i> 2(7)					<i>coa</i> 2(1)	<i>coa</i> 2(3)
No. of sequence repeat (%)	3(47.4)	2(16.7)	2(100)	2(66.7)	2(40.9)	2(50.0%)	2(36.4)	2(29.2)
	2(10.5)	1(33.3)		3(33.3)	1(45.5)		1(45.5)	1(45.8)
	5(15.8)	0(29.2)					0(9.1)	0(12.5)
No. of total strains tested	19(100)	24(100)	5(100)	3(100)	22(100)	2(100)	11(100)	24(100)
							-1(9.1)	-1(12.5)

※ ; No. of total positive strains.

Table 3. Polymorphic patterns of protein A (*spa*) gene PCR products of 112 of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

No. of sequence repeat (24 bp) of <i>spa</i> gene	Designated <i>spa</i> type	Average size of <i>spa</i> gene PCR product (bp)	No. of total positive strain (%)
2	spa 1	< 95	2 (17.9)
4	spa 2	143	1 (0.9)
5	spa 3	167	1 (0.9)
6	spa 4	191	2 (17.9)
7	spa 5	215	12 (10.7)
8	spa 6	239	17 (15.2)
9	spa 7	263	39 (34.8)
10	spa 8	287	17 (15.2)
11	spa 9	311	16 (14.3)
12	spa 10	335	4 (35.8)
15	spa 11	407	1 (0.9)
Total	11	95-407	112 (100)

이상과 같이 *coa*-gene PCR 성적을 토대로 국내 동물 및 사람 유래 *S. aureus* 균주에 대해서 분자역학적 다양성 분석을 수행하였지만, 이 연구에서 공시한 균주들에 대해서 전술한 방법이 얼마나 신뢰도 높고 효율적으로 감별하였는지에 대한 의문을 해결하고자, SID 값을 산출하여 비교하였다. 먼저 시야로 분석한 성적에 근거하여 SID 값을 산출하였을 경우 SID=0.796으로 저조하였지만, 컴퓨터프로그램으로 덴드로그램을 작성하여 보다 과학적으로 분석한 성적에 근거한 SID 값은 0.883으로 보다 향상된 성적이 산출되었다(Table 9). 따라서 유전자 수준의 성적의 분석을 위해서는 전문 분석프로그램을 적용하는 것이 결과성적의 올바른 분석을 위해 필요함을 알 수 있었다.

***coa*-gene의 PCR-RFLP**

공시한 *S. aureus* 균주들을 유전자 수준에서 추가적인 분석을 위해서 *coa*-gene PCR 증폭산물을 *AluI* enzyme으로 소화시켜 산생된 DNA 단편들의 분포양상에 근거하여 균주 상호간의 다양성을 분석한 성적을 Fig. 5에 나타내었다. 그림성적에서와 같이 전

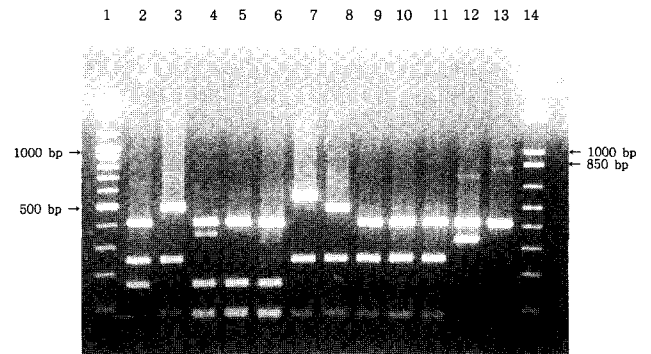


Fig. 5. The representative restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of *coa*-gene PCR products after restriction enzyme digestion using the *AluI* of *S. aureus* strains from diverse animal hosts and MRSA strains from human. Lane 1; 1 kb DNA molecular marker (2.5% agarose gel, Bio-Rad, USA), lane 15; 1 kb Plus DNA molecular marker, lanes 2-14; *S. aureus* strains from cattle, pig, goat, chicken, and MRSA strains from human (*coa*-type 1-8).

체적으로 약 700 bp에서부터 2-7개의 DNA 단편들로 구성되어 있으며, 대조균주인 *S. aureus* ATCC 13565와 상동성을 비교하였을 때, 20주가 유전자 수준에서 50%의 상동율성적(similarity)으로 유전학적인 관련성을 보였고, 또한 *S. aureus* NCTC 5663 균주와도 50%범위에서 유전학적 상동성을 나타내었지만, 나머지 균주들과는 유전자 수준에서 어떠한 관련성도 보이지 않았다. 이상의 성적을 토대로 하여 전문분석 프로그램을 사용하여 DNA 단편들의 분자량을 측정하고 덴드로그램을 작성하여 SID 값을 산출하였을 때, 총 113주에 대한 *coa*-PCR-RFLP 성적의 SID 값은 0.894로 현재까지 가장 높은 SID 값을 산출하였다(Table 9). 따라서 이 PCR 기법이 우리의 연구에서 적용했던 기법 중에서는 가장 신뢰도가 높고 감별능력이 뛰어난 것으로 평가되었다.

***spa*-gene의 PCR에 근거한 genotyping**

공시된 총 116주의 *S. aureus*에 대해서 *spa*-gene의 X-region에 존재하는 VNTR에 대하여 PCR을 실시하였을 때, 총 11 type (*spa* 1~11)의 genotype으로 세분되었다(Table 6). 이 연구에서는

Table 4. Distribution patterns of *spa*-gene profiles of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Genotype/Origins of strains	<i>Spa</i> -gene genetic patterns							
	Korean Cattle	Chicken	Dog	Korean Goat	Mouse	Pig	MRSA	Human
spa-genotype (No. of strain positive)	spa 6(3)	spa 6(4)	spa 5(1)	spa 7(1)	spa 4(1)	spa 8(1)	spa 5(2)	spa 5(6)
	spa 7(10)	spa 7(9)	spa 7(1)	spa 8(1)	spa 5(3)		spa 6(1)	spa 6(3)
	spa 8(3)	spa 8(1)		spa11(1)	spa 6(6)		spa 7(3)	spa 7(5)
	spa 9(2)	spa 9(4)			spa 7(12)		spa 8(1)	spa 8(3)
	spa 10(1)	spa10(1)			spa 8(1)		spa 9(3)	spa 9(3)
No. of sequence repeat (%)	8(15.8)	8(16.7)	7(20.0)	9(33.3)	6(4.5)	10(50.0)	7(18.2)	7(25.0)
	9(52.6)	9(37.5)	9(20.0)	10(33.3)	7(13.6)		8(9.1)	8(12.5)
	10(15.8)	10(4.2)		12(33.3)	8(27.3)		9(27.3)	9(20.8)
	11(10.5)	11(16.7)			9(54.5)		10(9.1)	10(12.5)
	12(5.3)	12(4.2)			10(4.5)		11(27.3)	11(12.5)
No. of total strains tested	19(100)	24(100)	5(100)	3(100)	22(100)	2(100)	11(100)	24(100)

Table 5. Distribution patterns of enterotoxin coding genes (*se*) of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Gene/Strain	Enterotoxin coding genes						Total
	<i>sea</i>	<i>sea+seb</i>	<i>sea+sec</i>	<i>seb</i>	<i>seb+see</i>	<i>sec</i>	
No. of strain	44	2	11	7	1	5	70
(%)	63.7	2.8	15.9	10.0	1.4	7.2	100

증폭산물의 크기의 정밀한 분석을 위해서 전문분석 프로그램을 적용하여 정밀하게 측정하여 그 성적이 근거하여 유전형을 분석하였다. 그 결과 공시균주 중에서 9 repeats (*spa*-7 type)의 변이주 (263 bp)가 전체 112주 중에서 39주 (34.8%)로 가장 대표적인 유전형인 것으로 발견되었다. Table 4와 Fig. 8의 양자의 성적에서 나타낸 바와 같이 한우, 닭, 개, 염소, 마우스 등의 다양한 숙주들과 심지어 MRSA 균주에서도 마찬가지로의 양상으로서 *spa*-7 type이 각각 가장 지배적인 genotype으로 조사되었다. 따라서 돼지와 사람유래 균주를 제외한 기타의 출처에서 분리된 균주들 모두에서 가장 지배적인 genotype은 *spa*-7 type의 변이주로 조사되었다. 이어서 8 repeats (*spa*-6; 239 bp)와 10 repeats (*spa*-8; 287 bp)의 균주가 각각 17주 (15.2%)로서 두 번째로 많은 빈도를 보였다. 그리고 *spa*-6 type에는 소와 닭유래 균주가 각각 4주로 가장 많았고, *spa*-8 type도 역시 소와 사람유래의 3주에서 각각 확인되었다. 그리고 11-repeats (*spa*-9; 311 bp)의 균주도 16주 (14.3%)나 되었으며, 7 repeats (*spa*-5; 215 bp)의 균주도 12주 (10.7%)나 발견되었고, 기타의 genotype들도 확인되었지만 이들이 차지하는 비중은 낮은 것으로 분석되었다. 그리고 특히 *spa*-type과 MRSA 균주와의 관련성에 있어서는 다만 *spa*-7 type이 MRSA 균주 중에서 가장 많았다는 사실이 이 연구에서 확인되었다.

Enterotoxin (SE) 유전자의 검출과 분포양상

각종 동물과 사람유래 *S. aureus* 균주가 산생하는 내독소의 분포양상을 조사하고자, M-PCR 기법을 수행한 성적은 Table 5, 6 및 7에 나타내었다. 먼저 SEA 독소산생을 지배하는 *sea*-gene (120 bp)이 검출된 균주는 대조균주로 공시하였던 *S. aureus* ATCC 13515, *S. aureus* NCTC 5663 및 *S. aureus* NCTC 9393를 비롯하여 총 44주(63.7%)에서 검출되어 가장 대표적인 유전형으로 확인되었다. 이어서 *seb*-gene(478 bp)가 검출된 균주가 총 7주(10.0%)였고, *sec*-gene가 검출된 균주도 5주(7.2%)나 발견

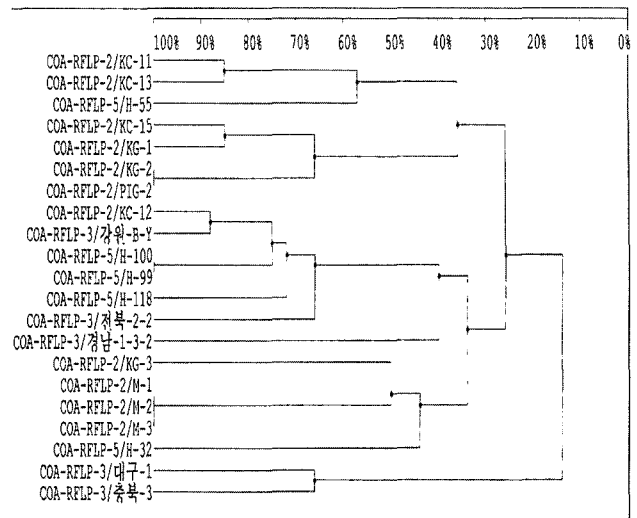


Fig. 6. Dendrogram pattern based on DNA fingerprints obtained by *coa*-gene PCR-RFLP of representative *S. aureus* strains from Korean cattle (KC), Korean goat (KG), mouse (M), poultry (C) and MRSA strains from human (H).

되었다. 또한 하나 이상의 내독소 산생 유전자가 동시에 검출되었는 바, 먼저 *sea+seb*-gene의 2종의 유전자가 동시에 검출된 균주가 2주(2.8%)나 확인되었고, *sea+sec*-gene가 동시에 검출된 균주는 11주(15.9%)로서 2종이상의 유전자가 동시에 검출된 균주 중에서는 가장 많아 특이적인 성적으로 확인되었다. 아울러 *seb+see*-gene가 동시에 검출된 균주도 1주 발견되었다. 한편 내독소산생 유전자의 분포양상을 동물 숙주별로 조사하였던 바 (Table 7), 한우에서는 *sea*-gene이 검출된 균주가 7주(36.8%)로 가장 지배적인 양상이었으며, *seb*-gene이 4주(21.1%), *seb+see*-gene이 동시에 검출된 균주도 1주(5.3%)가 분포하는 것으로 분석되었다. 흑염소의 경우 *sea+sec*-gene의 2종의 유전자가 동시에 검출된 균주가 3주중에서 2주(66.6%)나 발견되었고, 나머지 1주는 *sec*-gene로 분석되었다. 돼지유래 2주중 1주에서만 *sec*-gene가 검출되었다. 개에서 분리된 4주중 2주에서 *sea*-gene가 검출되었고, 마우스유래 균주에서는 *sea*-gene가 16주(72.7%)에서 검출되어 가장 지배적인 양상으로 조사되었고, 닭유래 균주에서는 *sea*-gene이 10주(41.7%)로 가장 많았다. 한편, 사람유래 균주 중에서는 *sea+sec*의 2개의 유전자가 동시에 검출된 균주가 8주

Table 6. Distribution patterns of species specific genes (SSG; *coa* & *spa*) and enterotoxins (SE) of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Host/Genetic types	Predominant genetic type and enterotoxins (%)								
	Cattle	Chicken	Swine	Goat	Dog	Mouse	Human		Total
							MRSA	Total [§]	
<i>coa</i> -type	5(47.4)	3(33.3)	4(50.0)	4(66.7)	4(100)	3(45.5)	3(45.5)	3(45.8)	109(100)
<i>spa</i> -type	7(52.6)	7(37.5)	8(50.0)	7,8,11(33.3)	5(20.0) 7(20.0)	7(54.5)	7(27.3)	5(25.0)	112(100)
Enterotoxin	A	A	C	A & C	A	A	A & C	A & C	79(69.3)

[§]The total means MRSA and MSSA strains were included.

(33.3%)로 가장 지배적인 양상이었고, 특히 사람유래 MRSA 균주 12주에 대해서 별도로 구분하여 조사하였을 경우, 역시 *sea*+*sec*-gene가 동시에 검출된 균주가 5주(41.7%)로 가장 많았던 것이 특이적인 성적이었다.

PCR 기법을 이용한 MRSA 균주의 신속검출과 유전학적 검증

각종 동물유래 균주는 물론 특히 경북 북부지역의 한 종합병원의 사람유래 균주를 포함하여 총 116주의 *S. aureus*에 대하여 사람과 동물에서 공통적으로 약제내성균으로 치료에서 어려움을 겪고 있는 문제의 병원체인 MRSA 균주를 보다 신속하고 효율적으로 검색하고자 PCR로서 *mecA*-gene을 검출하는 방법을 적용하였다. Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 공시균주 중에서 *mecA*-gene PCR의 증폭산물(533 bp)은 116주의 공시균주 중에서 단지 14주(12.1%)에서만 확인되었다(Table 8). 대조균주인 *S. aureus* ATCC 25923 균주와 경북 북부지역의 한 종합병원의 사람유래 균주에서만 *mecA*-gene이 확인되었을 뿐, 다행히 나머지 동물인 한우나 염소, 개, 돼지, 닭, 오리 및 마우스 유래의 어떠한 균주에서도 *mecA*-gene은 검출되지 않았다. Fig. 7 (Panel A)의 성적에서는 *mecA*-PCR에서 증폭된 DNA band가 *mecA*-gene에 해당하는 것인지를 유전자 수준에서의 검증을 하였던 바, 현재의 연구에서 14주의 *mecA*-PCR 양성균주 모두(100%)는 전술한 바와 같은 2개의 DNA band로 양분되어, 이들 균주들은 유전자 수준에서 전형적인 MRSA 균주로 결정되었다(Fig. 7; Panel B).

유전학적 분석기법들 상호간의 감별능력의 평가 및 비교

S. aureus 균주에 대하여 적용하였던 총 5종의 PCR에 기초한 분석기법들이 산출한 개별 분석성적에 근거하여 SID 값을 산출하고 이를 토대로 객관적으로 평가하였으며 그 성적을 Table 8 와 9에 나타내었다. 먼저 *aroA*-gene PCR-RFLP 기법은 공시된 균주들을 모두 7 type의 유전형으로 분류하였고, 그중 17주(73.9%)가 대표적인 그룹으로 감별하였지만, SID 값은 0.462로서 현재의 연구에서 활용한 PCR 기법 중에서는 가장 낮은 수치였다. 한편 지금까지 가장 많은 연구자들이 활용해왔던 분석기법의 하나인 *coa*-gene PCR-RFLP 기법은 공시균주들을 모두 11 type의 genotype으로 분류하였고, 그중 대표적인 그룹에는 19주

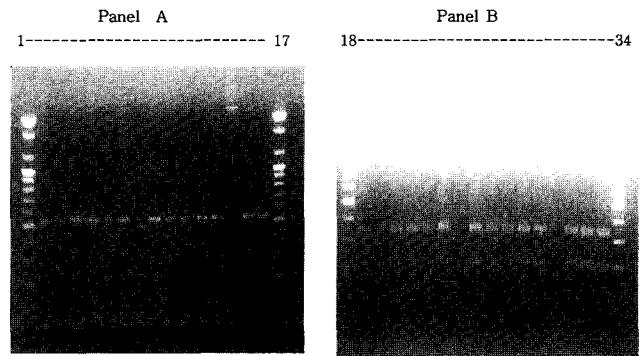


Fig. 7. (Panel A) Gel electrophoresis of DNA fragments generated by *mecA*-gene PCR amplification of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains. Lanes 1, 17, 18 and 34; 1 kb Plus DNA marker (2% agarose gel, Bio-Rad, USA), respectively, lanes 2-12, & 15; *mecA*-gene PCR positive *S. aureus* (MRSA) strains from human, lane 13; *mecA*-gene PCR negative *S. epidermidis* ATCC 12228, lane 14; *mecA*-gene PCR positive *S. aureus* ATCC 25923 reference strain. **(Panel B)** The *mecA*-gene PCR products (533 bp) of all positive strains in the present study were divided into two fragments both 331 and 202 bp, respectively, using the *HhaI* restriction enzyme digestion.

Table 8. General comparison among the results of six kind of individual PCR methods applied for investigation of genetic level properties of species specific genes (SSG) and enterotoxins (SE) of *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Method/ Result	PCR methods for detection of SSG and SE genes					
	<i>aroA</i>	<i>coa</i>	<i>mecA</i>	<i>nuc</i>	<i>spa</i>	<i>sea~see</i>
No. of positive strain	31	102	14	116	106	70
(%)	26.7	87.9	12.1	100	91.4	60.3

(16.8%)가 포함되었고, SID 값도 0.894로 가장 높은 수치를 발현하였다. 그리고 *coa*-gene PCR은 모두 10 type의 genotype으로 분류하였고, 그중 36주(33.0%)가 대표적인 그룹에 포함되었고, SID 값은 0.883으로 확인되었다. 반면에 *spa*-gene PCR은 공시균주들을 모두 11 type의 genotype으로 분류하였고 39주(34.8%)가 대표형의 그룹에 포함되었으며, SID 값은 0.806으로 *coa*-gene PCR 보다는 저조한 성적을 보였다. 따라서 현재의 연구에서 적

Table 7. Distribution patterns of enterotoxin (SE) genes from *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Host/ SE genes	No. of SE gene positive strain (Percentage)								
	Cattle	Goat	Pig	Dog	Mouse	Chicken	Human	MRSA	Total
<i>sea</i>	7(36.8)	-	-	2(5.0)	16(72.7)	10(41.7)	7(29.2)	2(4.5)	44(38.6)
<i>sea+seb</i>	-	-	-	-	-	1(4.2)	1(4.2)	-	2(1.8)
<i>sea+sec</i>	-	2(66.6)	-	-	-	1(4.2)	8(33.3)	5(41.7)	16(14.0)
<i>seb</i>	4(21.1)	-	-	-	1(4.5)	2(8.3)	-	-	7(7.0)
<i>seb+see</i>	1(5.3)	-	-	-	-	-	-	-	1(0.8)
<i>sec</i>	-	1(33.3)	1(50.0)	1(25.0)	-	-	2(8.3)	1(8.3)	6(5.3)
SE negative	6(31.6)	0	1(50.0)	0	5(22.7)	9(37.5)	6(25.0)	4(33.3)	31(27.2)
SE positive	13(68.4)	3(100)	1(50.0)	4(100)	17(77.2)	15(62.5)	18(75.0)	8(66.7)	79(69.3)
Total	19(100)	3(100)	2(100)	4(100)	22(100)	24(100)	24(100)	12(100)	114(100)

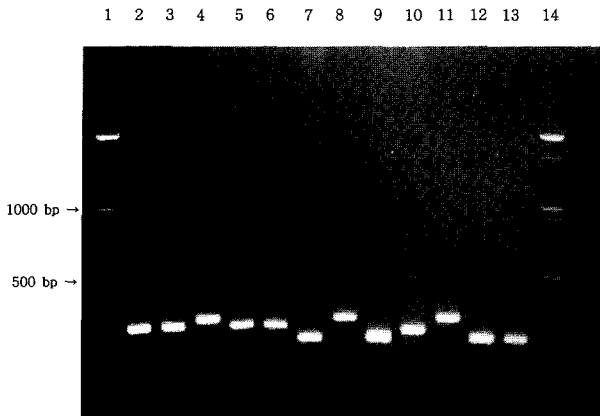


Fig. 8. The representative *spa*-gene PCR polymorphism profile of *S. aureus* strains from domestic animals and humans. Lanes 1 and 14; 1 kb Plus DNA molecular marker (2% agarose gel, Rio-Rad, USA), lanes 2 & 3; [207 & 226 bp; *spa*-5 type (7 repeats), respectively], lanes 4, 6, 9 & 12; [271, 271, 253, & 278 bp; *spa*-7 type (9 repeats), respectively], lane 7; [236 bp; *spa*-6 type (8 repeats)], lane 8 & 11; [316 & 300 bp; *spa*-9 type (11 repeats), respectively], lanes 10 & 13; [289 & 281 bp; *spa*-8 type (10 repeats), respectively].

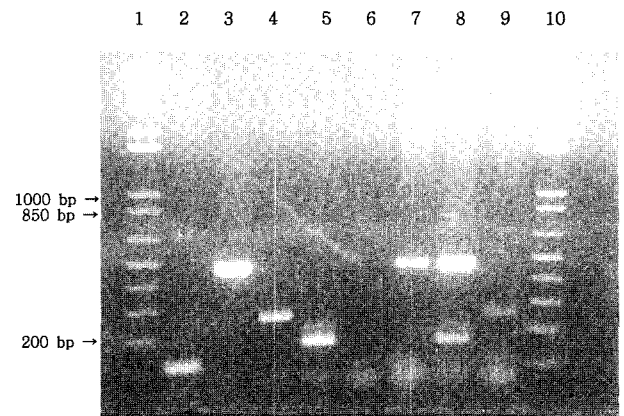


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis pattern showing the typical amplification fragments of PCR for the staphylococcal enterotoxin (SE) genes. Lanes 1 & 10; 1 kb plus DNA marker (2% agarose gel, Bio-Rad, USA), lane 2; SEA (102 bp), 3; SEB (478 bp), 4; SEC (257 bp), 5; SEE (170 bp), 6; SE non-producing field strain, 7; *S. aureus* from human (H-83, SEB), 8; *S. aureus* from Korean cattle (KC-17, SEB+SEE), 9; *S. aureus* from Korean goat (KG-3, SEC).

용한 분석기법 중에서는 *coa*-gene PCR-RFLP 기법이 다종다양한 출처유래의 *S. aureus* 균주들 상호간을 유전자 수준에서 가장 효율적이며 신뢰도 높은 분석기법으로 선발되었다.

고 찰

*S. aureus*와 MRSA 균주를 비롯한 다양한 균종을 유전자 수준에서 subtyping 하려고 할 경우 그 분석기법이 감별능력이 뛰어나고, 각종 역학정보와 상호관련성이 높은 분석기법이라면 임상 미생물을 취급하는 연구자에게는 가장 바람직한 분석기법이라 할 것이다. 그러나 염색체 DNA에 대한 전체 염기서열 분석법을 제외하면 아직도 전술한 요구사항을 충족시켜줄 방법은 추가적인 개발이 필요한 실정이다. 한편 최근 들어 chromosomal DNA의 분석이 가능한 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) 기법을 활용한 macro-restriction 기법이 현재까지 적용한 방법들 중에서는 “Gold standard”로 인정되고 있는 실정이다(7, 8, 23).

하지만 PFGE 기법을 적용한 성적의 발표는 최근 몇 년부터 집중되어 왔던 관계로 아직까지는 국제적으로 발표된 각종 문헌들의 경우 *S. aureus*의 유전학적 분석을 위해 가장 많이 활용되

고 있는 분석기법은 PCR에 기초한 분석기법으로 분석되었다. 따라서 우리의 연구에서는 단일한 축종에 국한되지 않고 가능하면 다종다양한 동물 숙주에서 선발된 균주와 특히 사람환자에서 분리된 균주까지 확보하여 지금까지 *S. aureus* 균종의 유전학적 분석을 위해서 적용된 다양한 PCR 기법들을 선발하여 국내 분리주의 유전학적 특성을 구명하고, 또한 이들 분석기법 중에서 국내 분리주에 대해서 가장 감별능력이 뛰어난 신뢰도 높은 분석기법을 선발해 보고자 하였다.

이 연구에서는 표현형질 보다는 보다 안정적인 유전자 수준에서 *S. aureus*의 분자역학적 특성구명을 위해서 PCR 기법을 적용하여 검출된 SSG의 다양성을 분석하였고, 추가적으로 RFLP (*coa* & *aroA*) 까지 적용하여 분석을 시도하였다. 그 결과 RFLP의 적용이 안되는 SSG (*spa* & *nuc*) 보다는 RFLP의 적용이 가능한 SSG의 경우가 보다 신뢰도 높은 분석성적을 확보할 수 있었다(Table 9 참조). 결국 총 113주의 *S. aureus* 균주에 적용되었던 *coa*-PCR-RFLP 기법이 발현한 SID 값은 0.894로서 이 연구에서 적용한 PCR 기법 중에서는 가장 신뢰도 높은 성적으로 평가되었다. 일반적으로 *coa*-gene PCR 성적은 단조로운 하나 이상의 81 bp repeat에 해당하는 유전자의 변이현상과 *AluI* enzyme의 인식부위의 차이에 따른 다양성에 근거한 분석방법이기 때문에 다종다양한 출처유래의 많은 균주들을 효과적으로 감별하기에는 다소 감별능력이 미흡한 측면이 있다. 따라서 보다 감별능력이 뛰어난 REP-PCR 및 PFGE 등과 같은 유전학적 분석기법의 도입이 필요할 것으로 사료되었다.

한편 *coa*-PCR-RFLP는 이미 많은 연구자들에 의해서 보고된 바 있고(1, 7, 12, 13, 25), 필자 등(4)도 1988년도에 가끔유래 균주에 대해서 동일한 방법을 적용한 성적을 보고한 바 있지만, 이 당시에는 DNA pattern을 시야로 분석한 성적이므로 현재의 성적과는 차이가 인정되었다. 그리고 필자와 김 등(1)이 경북 북

Table 9. General comparison among the Simpson's index of diversity (SID) of individual genotyping methods based on PCR for *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans

Typing methods	<i>aroA</i> -gene		<i>coa</i> -gene	
	PCR-RFLP	PCR	PCR-RFLP	PCR
SID value	0.462	0.883	0.894	0.806
No. of total genotypes	7	10	11	11
Size of the largest genotype (%)	17 (73.9)	36 (33.0)	19 (16.8)	39 (34.8)

부지역의 한 종합병원에서 분리된 *S. aureus* 균주 114주에 대해서 *coa*-gene PCR-RFLP를 적용하여 총 5 type의 유전형을 보고한 바도 있다. 비교를 위해서 외국의 성적을 살펴보면 먼저 Hookey 등(13)은 영국의 분리주의 경우 *coa*-PCR 증폭산물은 하나였지만, 크기는 875, 660 및 547 bp 등으로 다양했다고 보고하여 우리의 성적과 비교하면 각각 *coa*-1과 *coa*-4 type (2 및 -1 repeat)으로 간주되었다. 또한 16주의 MRSA 균주 모두는 547 bp (이 성적의 -1 repeat에 해당)의 증폭산물만이 확인되었다고 보고하여, 우리의 성적 (1~2 repeat가 지배적임)과는 차이를 보였다. Lange 등(19)과, Annemuller 등(7)도 사람과 동물유래 균주에서 단지 하나의 증폭산물만 검출하였다. 반면에 Goh 등(12)과 Schwarzkopf와 Karch(26)은 희귀한 경우였지만 2개의 증폭산물이 동시에 증폭된 균주를 보고하였다. 한편 우리의 성적에서도 Fig. 3에서와 같이 특이하게도 2개의 *coa*-PCR 증폭산물이 확인된 균주가 4주나 발견되었고, 이들의 출처는 한우(2주)와 마우스(2주)로 확인되어, 우리의 성적은 후자들의 성적과 일치하는 양상이었다. 이와 같이 하나 이상의 증폭산물이 발견되는 이유로는 *coa*-gene에서 하나 이상의 유전적인 변이현상이 발견되었기 때문이라고 하였다(12, 26).

우리의 연구에서는 대조균주인 *S. aureus* ATCC 13565 균주의 *coa*-gene PCR 증폭산물의 크기가 728 bp이기에 이를 *coa*-gene (0 repeat; *coa*-2 type) 대조군으로 설정하고, *coa*-gene의 경우 3'-end에서 81 bp repeat 만큼의 변이현상에 따라서 다양한 변이주가 발생되므로 이를 분류기준으로 설정하여, 국내 각종 동물과 사람유래 균주들 사이에 분포하는 변이주의 분포양상을 조사하였다(12, 13, 21). Hookey 등(13)은 제한효소로 *AluI*과 *CfoI*을 사용했다는 점에서 우리의 성적과 차이를 보였고, 또한 85주의 MRSA와 10주의 MSSA 균주에 대해서 PCR-RFLP를 실시하여 모두 10 type의 RFLP pattern이 존재함을 보고하였다. 하지만 우리의 성적에서는 다양한 출처유래의 균주를 사용하였기 때문에 전자 (13)들의 성적과는 많은 차이를 보인 것으로 사료되었다. Montesinos 등(23)도 스페인에서 124주의 MRSA 균주에 대해서 *AluI*과 *HaeIII*를 사용하여 4 type의 RFLP pattern을 확인하였지만, 2주는 *coa*-gene PCR 증폭산물을 산생하지 않았다고 하였다. 그리고 89%(114주)에 해당하는 균주들이 *coa*-1 type으로서 가장 대표적인 genotype이었고, 이 성적은 PFGE 성적과도 높은 상관성을 보였다고 하였다. Schwarzkopf와 Karch(26)는 *coa*-gene내에 존재하는 C-말단을 지배하는 유전자 좌에서의 유전학적 변이현상을 밝히기 위해 *coa*-gene의 다양성을 분석하였지만, *coa*-gene typing 기법의 감별능력은 *S. aureus*를 subtyping하기 위한 유일한 방법으로 보기에는 충분하지 못하며 추가적인 분석기법이 필요함을 제시 하였는바, 이는 우리의 연구결과에서 밝힌 바와 일치하는 성적으로 사료되었다.

한편 오스트레일리아의 소 농장의 유방염유래 151주에 대해서 *coa*-typing을 실시했던 바, 6 type의 유전형을 보고하였고, 73%(110주)가 type I에 15.2%(23주가 type II였고, 우리의 연구와 동일한 방법으로 Hunter와 Gaston(15)의 방법에 따라서 SID 값을 산출하여 감별능력을 비교하였을 때, *coa*-typing의 SID 값은

0.800이었고, PFGE의 SID 값은 0.810으로서 PCR을 이용한 *coa*-typing 기법은 소유래 *S. aureus* 균주의 분석기법으로서 뛰어난 감별능력을 확보하였다고 보고하였다(22). 하지만 우리의 성적에서 *coa*-typing의 SID 값은 0.883이었고, *coa*-PCR-RFLP의 SID 값은 0.884로 전자의 성적보다는 높은 SID 값이 발현되었음이 확인되었다(Table 9 참조). 하지만 Hunter와 Gaston(15)이 제시한 기준치(SID=0.900)에는 미치지 못하는 다소 미흡한 성적이었다. Annemuller 등(7)은 서독에서 소유방염 유래 25주는 6 type의 *coa*-type으로 구분되었고, *spa*-type의 경우 20주가 620 bp의 증폭산물을 산생하였고, 4주는 280 bp의 증폭산물을 산생하였다고 보고하였다.

이 연구에서는 Brakstad 등(9)의 성적과 같이 내열성의 효소인 *nuclease*를 지배하는 유전자인 *nuc*-gene(270 bp)과 *coa*-gene을 동시에 확인하고자 duplex-PCR을 실시하였던 바, 시험에 공시한 모든 균주(100%)에서 270 bp 크기의 *nuc*-gene의 증폭산물이 확인되었지만, *coa*-gene PCR 증폭산물은 전술된 성적과 같이 다양한 크기에서 확인되었고 음성균주는 쉽게 구분이 되어 duplex-PCR 기법의 실용성을 확인할 수 있었다.

우리의 연구에서 공시한 *S. aureus* ATCC 13515와 NCTC 5663 균주는 공히 288 bp의 증폭산물을 산생하여 *spa*-8 type (10 repeats)으로 결정되었고, *S. aureus* NCTC 9393 균주도 296 bp의 증폭산물이 확인되어 동일한 *spa*-8 type으로 분류되었다(Table 3 & 4 참조). 반면에 *S. aureus* ATCC 13565 균주는 322 bp의 증폭산물을 산생하여 *spa*-9 type(11 repeats)으로 확인되었는데, 이는 추후로 동일한 실험을 하고자 할 때 실험실간 성적을 비교할 경우에 유용한 정보로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

*S. aureus*의 SSG (*coa* 및 *spa*)로 알려져 있는 *coa*-gene (87.9%)이나 *spa*-gene (91.4%)의 PCR 성적들과 비교할 때, *aroA*-gene PCR은 26.7%라는 상대적으로 저조한 양성률 성적을 보였다(Table 9 참조). 그리고 *aroA*-gene PCR의 민감도와 특이성을 비교했을 경우, 민감도는 47.6%였고, 특이성도 29.2%로 저조한 성적을 보여 *S. aureus*의 종특이 유전자(SSG)의 검출을 위한 진단기법으로는 감별능력이 미흡한 것으로 보였다. 한편 Marcos 등(21)도 전술한 방법을 신뢰도 높은 분석기법으로 판정하지는 않았는데, 이는 결국 우리의 연구에서도 *aroA*-gene PCR 기법이 가장 낮은 SID 값을 산생한 성적으로도 충분히 짐작할 수 있었다. 특히 이 연구에서는 Marcos 등(21)의 성적보다도 더욱 다양한 동물유래의 보다 많은 수의 균주를 적용하였기 때문에 양성 성적도 73.9%로 더욱 저조한 성적을 보인 것으로 생각되며 제한 효소도 *RsaI*을 선택하여 최종적인 성적에서도 차이가 발생했을 것으로 사료되었다(Fig. 1. 참조).

Hoefnagels-Schuermans 등 (14)에 따르면 *spa*-gene은 고도로 다양성을 갖는 X-region이 다양한 수의 반복단위(24 bp크기)로 구성되어 이를 PCR로 증폭이 가능하고, PCR 증폭산물의 경우 9 repeats의 변이주의 경우 263 bp의 증폭산물을 산생하지만, 기타 변이주들은 반복단위의 수에 따라서 다양성을 보였다고 하였다. 따라서 우리의 성적에서도 이들의 분류기준을 적용하여 분석하였다.

Shopsin과 Kreiswirth(27)는 multilocus sequence typing (MLST) 기법은 균주간의 다양성을 분석함에 있어서 2,500 bp 이상에 해당하는 염기서열을 비교해야 하는 관계로 너무 많은 노동력, 시간과 비용이 소요된다는 단점이 있음을 보고하였고, 만일 균주간의 감별이 가능한 짧은 길이의 유전자(single locus target)만 존재한다면 저렴한 비용으로 신속하게 감별진단이 가능하다고 하였다. 물론 그 유전자는 염기서열이 밝혀져서 균주간의 해석이 가능할 정도로 충분히 다양성을 제공해 줄 수 있어야 한다고 하였는데, *S. aureus*의 경우에는 SSR (short sequence repeat) 유전자로 *spa-gene*와 *coa-gene*가 대표적이다. *spa*-typing의 경우 염기서열의 반복 숫자에 따라서 최근까지 37종의 독특한 SSR type이 존재하며, 하나의 유전형의 차이는 결국 하나의 코돈에 해당하는 길이 차이라는 사실이 밝혀졌으며 결국 총 186 type의 *spa*-type이 자연계에 존재할 수 있는 것으로 알려져 있다.

CDC의 자료에서도 22 type의 SSR region과 13 type의 서로 다른 *spa*-type을 보고한 바 있으나, Belkum 등(8)은 *spa-gene*의 경우 반복서열의 변이가 너무 심해서 과연 분자역학적 연구목적으로 바람직한 표적이 될 수 있는지에 대해서 의문을 제기한 바도 있다. 또한 Montesinos 등(23)도 스페인에서 분리된 총 124주의 MRSA 균주에서 4 type의 *spa*-type을 확인하였고, 스페인에서는 11 repeats의 변이주가 92주(72%)로 가장 대표적인 유전형으로 보고하였다. 따라서 이들의 성적과 비교하면 9 repeats가 가장 많았던 우리의 성적과는 차이가 있는데(Table 3 & 4 및 Fig. 8), 아마도 전자(23)등은 MRSA 균주만을 단독으로 사용하였기 때문일 것으로 생각되었다. 결과적으로 Table 10의 분석기법 상호간의 감별능력의 비교에서 *coa-gene* typing은 유전자 수준의 신뢰성 있는 분석기법으로 평가할 수 있었지만, *spa-gene* typing은 전자에 비하여 신뢰성이 다소 떨어지는 것으로 평가되어, Belkum 등(8)의 주장과 일치하는 성적으로 간주되었다.

현재의 연구에서는 내독소의 분포양상을 보다 신속하고 특이적으로 검색하고자 M-PCR로 조사하였는데, 동일한 방법을 적용한 임(3)은 젖소 유방염유래의 166주에 대해서 SE 유전자의 분포양상 조사에서 33주(19.8%)가 SE를 산생하였고, *sea-gene*가 검출된 균주가 29주 (17.5%)로 가장 많았고 *seb-gene*는 3주 그리고 *sec-gene*는 1주였다고 보고하였다. 결국 우리의 성적은 임(3)의 성적과 일치하는 성적으로 보였다. 반면에 정(5)은 도계육 120주에 대해서 조사한 결과 SE 산생균주는 4주(4.8%)였지만, 병계에서 분리한 106주중에서 74주(69.8%)가 SE를 산생하였고, SE의 유형도 SED 단일형이라고 하였다. 그러나 우리의 성적에서 오리를 포함한 계육에서 선별된 24주에서는 SEA가 10주(41.7%)로 가장 많았고 SED가 검출된 균주는 전혀 확인되지 않아 현저한 차이를 보였다. 다만 정(5)은 독소의 검출방법으로 MGDT (microslide gel double diffusion test)와 RPLA (rapid plate latex agglutination test) kit를 사용하였다는 점에서 차이가 있었는데, 분석방법의 차이로 인해서 동일한 동물숙주유래 균주에서 성적에 현저한 차이가 발생할 수 있는지에 대해서는 추가적인 검토가 필요할 것으로 보인다(Fig. 9 및 Table 5 & 6 참조).

Lambe 등 (18)은 *coagulase* 양성과 내열성의 *nuclease* 양성

S. aureus 균주가 SE를 산생하는 균주들이지만, *S. aureus* 이외의 균종도 SE를 산생하였다고 하였다. 한편 우리의 성적에서도 특이한 성적으로서 *S. epidermidis* ATCC 12228 균주에서 *sea*와 *sed-gene*이 동시에 검출되어 전자의 성적과 일치하는 흥미로운 사실을 발견할 수 있었다. 또한 전자 등(18)은 *S. aureus* 균주 중 약 1/3의 균주만이 다양한 외독소와 pyrogenic protein toxin들을 산생하였고, SE의 종류는 7종의 혈청형으로 구분되며 SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED 및 SEE 등이지만, 기타의 SED 소량이나 존재하는 것으로 보고하였다. 그리고 SE가 음식물 내에서 적절한 조건으로 보존될 경우에는 수년 동안 독소의 활성이 남아 있고, 또한 superantigen으로 *in vivo* 및 *in vitro* 시험에서 강력한 비특이 T-임파구 증강인자로 작용한다고 알려져 있다. 그리고 전자 등 (18)은 소유래 균주에서 SE 산생균주는 0~1개 정도로 낮은 빈도였고, 양과 염소유래 균주들은 70~80%로 상당히 높은 빈도였고, 소, 양 및 염소에서는 SEC 산생균주들이 가장 많았다고 하였다. 그리고 스페인의 성적에서도 양과 염소유래 균주들은 역시 SEC 산생균주가 가장 많았다고 하였는데, 우리의 성적에서 염소유래 3주중 SEA와 SEC 2종의 독소를 동시에 산생하는 균주가 2주고, 나머지 1주는 SEC 산생균주로서 전자의 성적과 일치하는 성적으로 분석되었고, 또한 우리나라 소유래 균주들은 SEA 산생균주가 7주(36.8%)로 가장 많아 전자(18)들의 성적과 일치하는 경향이 있었다. 한편 전자 등(18)은 가금에서도 *S. aureus*는 관절염과 농양형성에 관련되며, 피부와 비강에 흔히 보균되어 있다가 질병에 관련되는 것으로 지적하고, 계육에서 분리된 60%의 균주가 SE를 산생하였고, 그 대부분은 SEA를 산생하는 균주라고 하였다. 한편 우리의 성적에서는 SEA 산생균주가 24주중에서 10주(41.7%)로 가장 많았고 다음으로 SEB 산생균주가 2주(8.3%)로 조사되어, Lambe 등(18)의 성적과 거의 일치하는 성적으로 간주되었다.

사람에서 *S. aureus*의 주요 보균장소는 비강점막이며 보균율은 20~60%이고 어른보다는 어린이에서 더욱 높은 보균율을 보이며 건강한 사람에서 분리된 균주의 절반(50%)이 SE를 산생하였고, 특히 SEA가 가장 지배적이라고 하였다. 식중독 발생의 경우 SEA가 가장 빈번하게 증명되고 있으며 식중독과 관련된 주요 보균매체는 주로 오염된 육류와 낙농제품들이 대부분의 경우에 관련된 것으로 보고되어 있다. 우리의 성적에서는 사람유래 균주에서 SEA와 SEC의 2종의 독소를 동시에 산생한 균주가 8주(33.3%)였고, SEA 산생균주가 7주로 지배적인 양상이었기 때문에, 결국 우리의 성적은 Lambe 등 (18)의 성적과 일치하는 성적으로 분석되었다(Table 5 & 6).

Adesiyun 등(6)은 인도에서 소 유방염유래 균주에 대한 조사 성적으로 250주중에서 134주(53.6%)가 SE를 산생하였고, SEA가 32주(23.9%), SEB가 77주(57.5%), SEC가 67주(50.0%), SED가 21주(15.7%)로 단독 또는 중복으로 독소를 생산하였다. 그리고 SEB와 SEC의 2종 동시 산생균주가 SEA+SED의 동시 산생균주 보다는 훨씬 더 많았다고 하였다. 결국 우리의 성적에서 소유래 균주의 68.4%(13/19)의 균주가 SE 독소를 산생하여 인도의 성적과 거의 유사한 성적으로 분석되었다. 한편 Kato 등(17)은

도쿄 중심가에 위치한 14개 빌딩의 레스토랑에서 포획된 910두의 쥐 (rat)에서 SEA, SEB, SEC 및 SED에 해당하는 독소를 35주에서 확인하였고, 그중 SEA와 SEB가 각각 13주로 가장 많았다고 하였다. 한편 우리의 성적에서도 마우스유래 22주중에서 SEA 산생균주가 16주(72.7%)로 가장 많아 일본의 성적과 일치하는 양상이었다(Table 6).

Gilligan 등(11)은 SEB 독소의 경우 사람에서 50% 치사량(LD₅₀)은 체중 kg당 피코그램(picogram)의 수준이며, 지금까지 SE는 SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH 및 SEI를 포함하여 8종이라고 하여 Lambe 등(18)의 견해와 차이를 보였고, SEB, SEC, SEG, SEH 및 SEI 독소를 지배하는 유전자는 염색체 DNA에 존재하며, SEA와 SEE 산생유전자 상호간에는 49~85%수준의 염기서열상의 동질성이 확인되며, 내독소를 동시에 하나이상 산생하는 균주도 흔히 발견된다고 하였는바, 이 성적은 Fig. 9에서 나타난 바와 같이 우리의 성적에서도 확인할 수 있었다.

Omoe(24)는 일본에서 식중독발생과 관련된 사람과 건강한 사람, 유방염에 이환된 소, 소의 생유(raw milk)로부터 총 146주의 *S. aureus*를 확보하여 M-PCR로 SE의 분포양상을 조사하였더니, 식중독과 관련된 사람의 경우 34주(47.9%)에서 *sea* 유전자가 검출되었고, 건강한 사람에서 분리된 18주중 13주(72.2%)에서 SE 유전자가 검출되었다고 하였다. 이는 사람유래 균주의 75%(18/24)에서 SE 유전자가 검출된 우리의 성적에서 오히려 다소 높은 성적이 확인되었다. Johnson (16)은 8쌍의 primer를 사용한 M-PCR 기법으로 내독소를 검출하였으며 특히 *S. aureus* ATCC 13565 균주는 *sea*와 *sed*의 2개의 유전자가 동시에 검출되었다고 하였는바, 우리의 성적에서는 단지 *sea* 유전자 하나만이 검출되어 균주의 계대보관 중에 변이가 발생했는지 등에 대해서는 정밀한 분석이 필요한 부분으로 보였다.

Shopsin과 Kreiswirth (27)는 *mecA*-gene은 PBP2a를 인지하는 유전자로서 MRSA 및 MRSE (methicillin resistant *S. epidermidis*)에 있어서 높은 수준의 동질성을 보이지만, 반면에 기타의 포도상구균 종이나 MSSA 균주에서는 *mecA*-gene이 존재하지 않는다고 하였다. 따라서 현재까지 *mecA*-gene은 유전자 수준에서 MRSA 균주를 검색하기 위한 유용한 표식인자라고 하였다(10, 14, 22, 28). MRSA 균주의 경우 현재까지는 동물이 주요 보균숙주가 아닌 것으로 밝혀져 있어, 동물에서 MRSA가 분리되는 예는 우연한 사고에 의해 사람에서 전파된 것으로 밝혀졌다. 하지만 Ubukata 등 (28)에 따르면 일본에서는 MRSA 균주가 경주용 말(馬)과 집합우유(milk)에서도 분리되었지만, 정확한 출처는 밝히지 못하였고, MRCNS(methicillin resistant coagulase negative *S. aureus*) 균주가 280수의 닭 중에서 72수(25.7%)에서 분리한 보고도 있다. 이상과 같은 배경에 근거하여 우리는 국내 동물유래 균주에서 MRCPS (methicillin resistant coagulase positive *S. aureus*)와 MRCNS의 존재유무를 조사하였지만 현재까지의 성적으로는 다행히 확인된 균주가 없었다.

York 등(30)은 *mecA*-gene PCR이나 DNA probe 기법만으로 MRSA 균주를 검색하고자 할 경우 위양성 반응이 초래되는바,

그 이유로 *mecA*-gene을 갖고 있는 MRSA 균주의 모두가 반드시 PCR로 증폭가능한 *mecA*-gene을 발현하지 않을 수도 있기 때문이라고 하였다. 한편 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)에서는 MR (methicillin resistant) 특성을 검색할 경우에 broth dilution, agar dilution, salt agar screen방법 그리고 oxacillin disk diffusion test 등의 방법을 권장하고 있는 바(25), 우리의 연구에서도 PCR로 확인된 MRSA 균주들은 김 등 (1)에 의해서 methicillin을 이용한 MIC 시험에서 모두 32 µg/ul 이상의 내성을 획득한 전형적인 MRSA 균주로 확인된 바 있다. Zee 등(31)은 유럽제국에서 MRSA의 출현빈도는 국가별로 다양하여 네덜란드와 스웨덴, 덴마크의 경우 1% 수준이었고, 스페인, 프랑스 및 이탈리아와 같은 국가는 30%에 도달할 정도인데, 출현빈도가 낮은 국가에서 MRSA가 출현하는 것은 발생빈도가 높은 국가로부터 환자의 유입 및 이동에 의해 촉진되며, *S. aureus*는 흔히 무증상으로 보균될 수도 있어 항상 질병을 야기하지 않기 때문에 MRSA 균주의 정확한 monitoring 자체가 불완전하고 어려워 질병예방 차원에서는 중요한 문제점으로 지적되고 있다.

김 등(2)도 국내에서 MRSA 균주의 검출을 위해서 *mecA*-gene을 증폭하는 PCR 기법을 적용하여 528 bp의 증폭산물을 확인하였고, *Nde*I의 제한효소 처리로 404 bp와 124 bp의 2개의 DNA 단편으로 소화처리 된 균주를 양성으로 검증하는 방법을 채택하였지만, 우리의 성적과는 증폭산물의 크기에 있어서 차이와 제한효소에 있어서 차이가 있을 뿐 동일한 방법과 절차를 활용한 것으로 보인다. 마찬가지로 Vannuffel 등(29)도 *mecA*와 *femA*의 양자의 유전자를 동시에 검색하기 위한 M-PCR 기법으로 MRSA 균주를 신속하고 특이적으로 검출한 바도 있다.

Hunter와 Gaston(15)은 다양한 관련인자에 따라서 분석기법 개개의 감별능력이 영향을 받는다고 지적하고, 분석기법이 신뢰성을 확보하려면 0.900 이상의 SID 값을 확보하여야 바람직한 분석기법으로 평가할 수 있다고 하였다. 이들의 기준에 근거할 때 *coa*-PCR-RFLP 기법SID(0.894)은 비록 충분하지는 못했지만 우리가 수행한 분석기법 중에서는 가장 신뢰도가 높은 것으로 평가되었다(Table 9).

비록 PCR에 기초한 분석기법들은 실험실 성적 상호간의 재현성에 있어서는 보다 거대한 크기의 genomic DNA를 분석대상으로 하는 PFGE 기법보다는 미흡하다는 사실에 대해서는 익히 잘 알려진 사실이다. 하지만 다양한 조건의 실험실 여건을 고려하고 적은 비용과 간편한 장비만으로도 신속하게 특이적인 성적을 확보할 수 있다는 측면에서는 PFGE 기법 이상으로 뛰어난 장점을 확보하고 있기 때문에 PCR에 기초한 각종 분석기법들은 여전히 많은 실험실에서 널리 활용되고 있다 (12, 15, 26).

결과적으로 단일한 분석방법에 의존하지 않고 다양한 분석기법을 적용하고 그 성적들을 통계학적 분석방법으로 보다 객관적 및 과학적으로 분석할 경우에는 보다 공유하기 쉬운 해석을 이끌어낼 수 있다는 사실을 이 연구를 통하여 확인할 수 있었다. 우리의 연구에서는 국내 동물과 사람에서 분리된 *S. aureus* 균주를 유전자 수준에서 그 다양성을 분석하고자 PCR 기법에 기초

하여 유전자 수준에서 특성분석을 수행하였다. 그리고 이 연구에서 수행한 5종의 PCR 기법들이 산생한 개별 성적들을 객관적으로 분석하여 가장 감별능력이 뛰어나고 신뢰도 높은 PCR 기법을 선별할 수 있었기에 이 연구의 궁극적인 목적을 획득하였다. 비록 이 연구와 동시에 수행되었지만 지면관계상 함께 보고하지 못했던 RAPD, REP-PCR 및 ERIC-PCR 등의 총 8종의 PCR의 종합성적은 별도의 지면을 통하여 추가로 보고할 계획임을 밝혀 두고자 한다.

참고문헌

- 김신, 김상윤, 우용구, 등. 2001. 경북 안동의 한 종합병원에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 항균제 내성양상과 PCR-RFLP를 이용한 MRSA의 Molecular typing. *감염학회지*, 33, 404-413.
- 김성민, 이혁, 백경란, 등. 1997. 국내 3개 병원에서 분리된 메티실린 내성 황색포도상구균 균주간의 유전학적 연관성. *감염학회지*, 29, 453-462.
- 임숙경. 2000. 젖소 유방염 유래 *Staphylococcus aureus*의 유전적 특성과 약제내성에 관한 연구. *전남대학교 수의학박사 학위논문*.
- 우용구, 김기석, 김봉환. 1998. Coagulase genes의 polymorphisms에 따른 국내 계육 유래 *Staphylococcus aureus*의 molecular typing. *수의과학논문집*, 40, 36-42.
- 정갑수. *Staphylococcus aureus*의 증식과 Enterotoxin 산생에 미치는 pH, 온도 및 식품첨가물의 영향. *경북대학교 수의학박사 학위논문*, 1992.
- Adesiyun AA. 1994. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk: Bacteriophage and antimicrobial agent susceptibility, and enterotoxigenicity. *J Vet Med B*, 42, 129-139.
- Annemuller C, Lammler Ch and Zschock M. 1999. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 69, 217-224.
- Belkum A, Kluytmans J, Leeuwen W, et al. 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 33, 1537-1547.
- Brakstad OK, Aabakk K and Maeland JA. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol*, 30, 1654-1660.
- Devriese LA. 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*, 19, 23-27.
- Gilligan K, M. Shipley, B. Stiles, et al. 2000. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol and Cell Prob*, 14:71-78.
- Goh SH, SK Byrne, JL Zhang, et al. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 30, 1642-1645.
- Hookey JV, JF Richardson and BD Cookson. 1998. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol*, 36, 1083-1089.
- Hoefnagels-Schuermans A, WE Peetermans, MJ Struelens, et al. 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 35, 2514-2520.
- Hunter PR and M. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26, 2465-2466.
- Johnson WM, SD Tyler, EP Ewan, et al. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 29, 426-430.
- Kato Y, SI Maisunaga, Y Misuna, et al. 1995. Distribution and Characterization of *Staphylococcus aureus* in rats trapped at restaurants in buildings in downtown Tokyo. *J Vet Med Sci*, 57, 499-502.
- Lambe DW, Jr Wesley, E Kloos, et al. 1994. *Staphylococcal* food poisoning. Handbook of Zoonosis: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic, p. 369-376. CRC Press. USA.
- Lange C, M Cardoso, D Senczek, et al. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*, 67, 127-141.
- MacFaddin JF. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Marcos JY, AC Soriano, MS Salazar, et al. 1999. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *J Clin Microbiol*, 37, 570-574.
- Mehrotra M, G Wang and WM. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*, 38, 1032-1035.
- Montesinos I, E Salido, T Delgado, et al. 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 40, 2119-2125.
- Omoe, et al. 1995. Characterization of *Staphylococcus aureus* in rats trapping at restaurants in buildings in downtown Tokyo. *J Vet Med Sci*, 57, 499-502.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, et al. 1999. *Staphylococcus* species. *Clin Vet Microbiol*, Mosby: 118-126.
- Schwarzkopf A and H. Karch. 1994. Genetic Variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as epidemiological marker. *J Clin Microbiol*, 32, 2407-2412.
- Shopsin B and BN. Kreiswirth. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Inf Dis*, 7, 323-326.
- Ubukata K, S Nakagami, A Nitta, et al. 1992. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococci* by Enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 30, 1728-1733.
- Vannuffel P, J Gigi, H Ezzedine, et al. 1995. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 2864-2867.
- York MK, L Gibbs, F Chehab, et al. 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol*, 34, 249-253.
- Zee A, H Verbakel, JC Zon, et al. 1999. 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*, 37, 342-349.

(Received October 15, 2004/Accepted March 1, 2005)

ABSTRACT : Analysis of Molecular Epidemiological Properties of *Staphylococcus aureus* Isolates from Domestic Animals and Human Patients by PCR

Yong-Ku Woo^{1*} and Shin Kim² (^{1*}Laboratory Animal Center, Seoul National University, Seoul, Korea, 151-742, ²College of National Science, Andong National University, Andong, Korea, 760-8002)

This study was conducted to analyze the molecular epidemiological properties and to select the most efficient and reliable PCR method on 116 of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolates from Korean cattle, black goat, pig, dog, chicken, mouse and also human clinical cases from hospital. The distribution patterns of SSG [species specific genes; coagulase (*coa*), protein A (*spa*), nuclease (*nuc*) and *aroA* (*RsaI*) gene] were analyzed by PCR method. Among the SSGs, the *nuc*-gene was found in all strains (100%) tested and followed by *coa*-gene (87.9%), *spa*-gene (91.4%) and *aroA*-gene (26.7%), in order. The genetic subtyping by RFLP method was performed on the *coa* [*AluI*] and *aroA*-gene [*RsaI*] PCR products. The *mecA*-gene PCR and PCR-RFLP techniques were chosen to detect and verify of MRSA strains. Only the human strains (12.1%) were detected the positive *mecA*-gene products (533 bp), which were divided into two specific bands [201 & 332 bp] by *HhaI* enzyme digestion. On *coa*-gene and *spa*-gene typing, *coa*-gene was typed with ten kinds of genotype and *coa*-3 type were determined as the most predominant genotype, while *spa*-gene was divided into eleven kinds of genotype and also *spa*-7 type were selected the most prevalent genotype based on their genetic variations. On the *aroA* and *coa*-gene subtyping by PCR-RFLP, *aroA*-gene products were discriminated with only seven types of genotype, while *coa*-gene products were further divided into an eleven genotype, respectively. In comparison of SID values of five PCR based typing methods, the *coa*-PCR-RFLP (SID0.894) was evaluated the most efficient and reliable tools and followed by *coa*-PCR (SID0.883) and *aroA*-PCR-RFLP (SID0.462), in order. In conclusion, we could determined that the *coa*-PCR-RFLP method was the most suitable genetic analysis tool for *S. aureus* and MRSA strains from domestic animals and humans.