

REP-PCR을 이용한 국내 사람과 동물유래 *Staphylococcus aureus* 분리주의 Molecular Typing

우용구^{1*} · 김 신²

¹서울대학교 실험동물자원관리원,

²안동대학교 미생물학과

국내산 한우, 흑염소, 돼지, 개, 닭 및 마우스 등을 포함한 각종 동물과 사람환자에서 분리된 MRSA 균주를 포함하여 총 116 주의 *S. aureus* 균주를 확보하여 이들 균주들의 유전학적 다양성을 분석하고자 시도하였다. 이를 위하여 쉽고, 편리하며 많이 활용되고 있는 PCR을 이용하여, 개별 분석기법에 따른 유전학적 특성을 파악하는 것은 물론 활용한 기법들 중에서 유전자 수준에서 가장 효율적이며 뛰어난 감별능력을 지닌 기법을 선발하고자 하는데 궁극적인 목적을 두었다. 이를 위해서 통계학적인 수치에 따라 객관적인 분석방법으로서 Simpson's index of diversity (SID)를 산출하여 성적상호간을 비교 및 평가하였다. 공시한 총 99 주에 대한 4M primer를 이용한 RAPD 성적에 근거하여 산출한 SID 값은 0.915의 양호한 값이 산출되었다. 같은 방법으로 총 98 주에 대한 RA primer를 이용한 RAPD 성적을 토대로 산출한 SID 값은 0.874로 확인되었다. 한편 총 107 주에 대한 ERIC-PCR을 수행한 종합분석 성적에서 공시균주들은 모두 10 종의 유전형(genotype)으로 구분되었고, EM-type에는 14 주가 포함되어 가장 대표적인 유전형으로 분류되었으며, 이 그룹에는 사람유래의 6 주가 포함되어 가장 지배적인 유전형으로 확인되었다. 또한 DNA profile에 근거한 덴드로그램을 작성하고 SID 값을 산출하였던 바, SDI 0.929의 신뢰도 높은 성적을 산출하였다. 반면에 공시한 총 108 주의 *S. aureus* 균주에 대한 종합적인 REP-PCR 성적에서 모두 20 종의 유전형으로 세분되었고 RB-type은 17 주로 가장 많은 균주가 포함되었다. 작성된 덴드로그램 성적에서 산출한 SID 값은 우리의 연구에서 수행한 PCR에 기초한 유전자 분석기법들 중에서는 가장 높은 0.930으로 확인되었다. 결론적으로 RAPD 기법 중에서는 4M primer를 활용한 RAPD가 보다 효율적임을 확인할 수 있었고, REP-PCR과 ERIC-PCR의 양자의 성적은 거의 비슷하여 적용했던 PCR 분석기법 중에서는 이들 분석기법이 가장 우수한 감별능력을 확보한 분석법으로 최종 선발할 수 있었다.

Key words □ animal, REP-PCR, *S. aureus*, SID, RAPD

서 론

우리가 알고 있는 바와 같이 polymerase chain reaction (PCR)은 DNA 증폭효소의 연속적인 반응을 이용하여 단시간에 소량의 DNA를 대량으로 증폭하고자 하는 원리에 기초한 분석기법의 하나이다. 특히 항원검출에 어려움이 많았던 바이러스성 질병의 신속진단에 혁명적인 수단으로 등장하였으며, 세균성 질병에서도 시간을 다투는 신속한 질병진단 목적에 유용하게 활용되고 있으며, 세포친화성의 균분리가 어려운 균종이나 실험실 균분리 동정 기법으로 동정이 어려운 균종에 의한 질병진단 목적에 획기적인 발전을 가져왔다(2, 4, 5).

포도상구균속은 사람을 비롯하여 동물에서도 병원성을 발현하는 대표적인 인수공통병원균으로 알려져 있다. 사람에서는 salmonellosis의 경우인 감염형의 양상과 달리 특이하게 독소(enterotoxins; SE)의 섭취의 결과로 발생하는 독소형의 식중독을

일으키는 것으로 유명하며, 동물에서는 숙주의 다양성에 따라서 다양한 질병양상을 유발하고 있다(1, 2, 12).

최근 들어 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 균주에 의해 발생하는 병원내감염증은 세계적으로 사람의 입상에 있어서 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다. 그리고 국내 성적으로 우 등(2)과 김 등(1)도 이미 PCR 기법을 이용하여 국내 각종 동물과 사람유래 균주에 대해서 MRSA 균주의 존재유무를 유전자 수준에서 monitoring을 실시한 성적을 보고한 바 있다. 그리고 Ariane 등(4)에 따르면 MRSA 균주와 같이 역학적으로 중요한 병원체의 경우에는 병원내에서 또는 병원상호간의 전파 및 확산을 효과적으로 감시하여 이들 병원체의 전파를 극소화시킬 수 있는 방안을 확보해야 할 것이며, 이를 위해서는 효율적이고 정밀한 역학분석 시스템의 확보가 요구된다고 하였다(4, 12, 15). 알려진 바와 같이 MRSA 균주 등을 포함한 역학적으로 중요한 *S. aureus* 균주들을 분석(subtyping)하기 위해서 많은 종류의 유전자 수준의 분석방법들이 보고되어 왔다. 이들 중 최근 집중적으로 보고되고 있는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 기법은 많은 병원과 실험실에서 활용되고 있으며, 정확

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-880-8151, Fax: 02-886-0578
E-mail: wooyk@snu.ac.kr

하고 신뢰도 높은 감별능력으로 많은 연구자들에 의해서 인정받고 있는 실정이다(4, 11, 16). 필자도 *Salmonella pullorum* 균에 대해서 적용하였던바, 높은 감별능력을 확인할 수 있었다. 하지만 PFGE는 필자가 직접 수행해본 경험에서도 알 수 있었듯이 많은 기술적 요소를 필요로 하며 또한 결과를 확보하기 까지 많은 시간이 소요되는 단점을 갖고 있었다. 반면에 PCR에 기초한 분석기법은 PFGE에 비해 신속성과 편리성에 있어서는 뛰어난 장점을 확보하고 있다는 점을 직접 확인할 수 있었다(3, 5, 8).

한편 다양한 수준의 임상실험실에서 누구나 쉽게 적용할 수 있고 장비도 저렴하여 확보가 쉬운 편이기에 우 등(2)은 지금까지 알려진 종특이 유전자 중에서 많은 연구자들이 활용한 바 있는 coagulase 및 protein A gene을 이용한 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 수행하여 그 성적을 보고 하였을 뿐만 아니라, *aroA*-gene에 대해서도 동일한 분석성적을 보고하였다. 그리고 보다 객관적인 분석방법으로서 Simpson's index of diversity (SID)를 산출하여 보기 쉽고, 알기 쉽게 수치로 변환하여 보여줌으로서 적용했던 PCR 기법 상호간의 감별능력을 쉽게 평가할 수 있었다.

전술된 보고자료에서는 5 종의 PCR 기법들 중에서 *coa*-gene PCR-RFLP 기법이 가장 뛰어난 감별능력(SID 0.893)을 확보하고 있음을 확인하였지만, SID의 기준치인 0.900에 못 미치는 저조한 성적으로, 보다 감별능력이 우수한 뛰어난 분석기법이 필요함을 제시한 바 있다(2).

Ariane 등(4)도 coagulase(*coa*) 및 protein A gene (*spa*)을 이용한 PCR-RFLP의 경우 감별능력이 있어서 한계가 있으며, 분석기법들 중에서 특히 arbitrarily primed (AP)-PCR 분석법의 경우에는 실험실 성적 상호간에 재현성에 있어서 문제점이 있음을 지적하였다. 또한 *S. aureus*의 염색체에 존재하는 다복재요소(multicopy elements)를 검색하는 원리에 기초한 repetitive-element (REP)-PCR 기법은 단일 실험실내 연구에서는 훌륭한 재현성과 감별능력을 보여주었다고 하였다.

한편 Jersek 등(11)도 repetitive extragenic palindromic sequence based PCR (REP-PCR)과 enterobacterial repetitive infrequent consensus sequence based PCR (ERIC-PCR)은 원핵세포 집단 내에서도 다양하게 분포하고 있는 짧은 길이의 반복성의 염기서열에 대해서 PCR을 적용하여 유전자 수준의 다양성에 근거하여 균주 상호간의 감별이 가능하며 이들 기법의 감별능력은 기존의 PCR 기법보다도 우수하였다고 보고하였다. 따라서 세균의 염색체 DNA에 존재하는 REP 및 ERIC과 같은 반복성의 염기서열의 다양성에 근거하여 이들 유전자에 대한 primer를 작성하여 PCR을 수행한 후 나타난 증폭산물의 다양성에 근거하여 균주간의 유전학적 다양성 분석이 가능하다는 이론이다. 보고된 바와 같이 REP 염기서열은 반복성을 특징으로 하며 크기는 35~40 bp에 해당하고, ERIC 염기서열은 크기가 124~127 bp로 REP 염기서열 보다는 커다란 반복성의 유전자이며 균주간에 공유성이 높은 것이 특징으로 알려져 있다. 결국 REP와 ERIC 염기서열을 PCR로서 증폭할 경우 균종간 및 균주간의 감별까지도 가능하다고 알려져 있다(11, 16).

이상과 같은 배경에 근거하여 우리의 연구에서는 전술한 논문(2)에서 보고하지 못하였던 나머지의 성적으로서 4M과 RA primer의 2 종의 primer를 적용한 PCR 분석기법 중 RAPD 및 REP-PCR와 ERIC-PCR 기법을 수행했던 성적에 대해서 보고하고자 하며, 최종적으로 이미 보고한 논문의 성적에 추가하여 일반 실험실 여건에서 수행하였던 총 8 종의 PCR 기법들이 확보한 고유한 감별능력(DA)을 비교 및 평가하여, 국내 각종 동물과 사람에서 분리된 *S. aureus* 분리주의 유전자 수준의 분석에 가장 신뢰도 높고 감별능력이 뛰어난 분석기법을 선별하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

이 연구에 공시된 *S. aureus* 균주들은 우 등(2)이 1996년 이후로 전국의 도계장에서 수거한 계육에서 분리한 균주를 포함시켰고, 다양한 동물로부터 분리된 균주들은 주로 경북 북부지역에서 분리된 균주로 한우, 염소, 돼지, 실험용 마우스 및 닭 등의 동물에서 분리한 균주들이며, 이들 중 대부분은 임상증상 등이 발견되어 병성감정 의뢰된 동물에서 분리되었다. 특히 실험용마우스의 경우에는 사육과정에서 관찰된 화농소에서 분리된 균주이며, 사람유래 20 주의 MRSA 및 MSSA (methicillin sensitive *S. aureus*) 균주는 김 등(1)과 우 등(2)이 이미 보고한 바 있는 균주들이며, 이들을 포함하여 모두 116 주를 공시하였다. 그리고 *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 5663 및 *S. aureus* NCTC 9393과 *S. epidermidis* ATCC 12228 등은 각종 시험의 대조균주로 사용되었다.

균주의 동정

이 연구에 사용된 균주들은 김 등(1)과 우 등(2)이 이미 보고한 바 있는 균주로서 균종감별은 표준실험실 진단법으로 기 확인된 균주들을 사용하였고, 추가로 동정이 필요한 균주들과 PCR 시험에서 재동정이 필요한 균주들에 대해서는 Bennett 등(6)과 MacFaddin(13)의 표준실험실 진단법에 따라서 균종감별을 확인한 후에 시험에 사용하였다.

Chromosomal DNA 추출 및 정제

균종감별이 확인된 균주에 대해서만 genomic DNA의 추출과 정제는 Jersek(11)과 Zee 등(16)의 방법에 준하여 실시하였고, lysozyme (Sigma, USA)과 lysostaphin (Sigma, USA)으로 처리하고 추가로 proteinase K (GibcoBRL, USA)로 소화시킨 후, phenol을 사용하는 DNA 추출법으로 순수하게 추출된 DNA를 PCR 시험에 사용하였다.

RAPD, REP-PCR 및 ERIC-PCR

RAPD, REP 및 ERIC-PCR을 위한 primer 등에 대한 정보는 역시 Jersek(11)과 Zee 등(16)의 방법에 따라서 합성을 의뢰하여 사용하였다. PCR premix kit를 사용하였고, Applied-Biosystem

PCR 장치를 사용하였다. 먼저 95°C에서 7 분간 열변성 후에 42°C에서 1 분간 합성하였고, 65°C에서 8 분간 신장반응을 실시하였다. 그리고 추가로 94°C에서 1 분간 열변성, 42°C에서 1 분간 합성, 65°C에서 8 분간 신장반응을 33 회 반복 수행한 후, 최종적으로 65°C에서 8 분간 신장반응을 추가하고 종결하도록 프로그램 설정하였다. 증폭산물의 확인은 2% agarose gel을 사용하여 4 V/cm의 전압으로 2 시간동안 전기영동하고 증폭산물의 다양성은 UV 조사장치를 사용하여 확인하고 사진 촬영하였다. 분자량의 확인 및 대조를 위한 molecular marker로서는 1 kb Plus DNA ladder (GibcoBRL, USA)와 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea)를 동시에 사용하였다. RAPD, REP-PCR 및 ERIC-PCR 등의 개별 성적들은 Bio-ID2+ software를 사용하여 분석하였고 이들 성적에 기초하여 SID 값을 산출하고 감별능력을 평가하는 절차에 따랐다.

SID에 근거한 분석기법 상호간의 감별능력(discriminative ability: DA)의 비교

Hunter와 Gaston(9, 10)의 방법에 따라서 현재의 연구에서 활용한 8 종의 유전자 분석기법 상호간의 결과성적을 토대로 하여 개별 분석기법들의 감별능력을 객관적인 수치로서 비교하고자 SID 방법을 적용하여 객관적인 수치로 결과를 산출하여 평가하는 방법을 적용하였다. 그리고 최종적인 SID 값이 0.900 이상을 확보한 분석기법은 적용한 균주들 상호간에 대해서 충분한 감별능력을 확보한 신뢰성 높은 분석기법으로 평가하였고, SID 값이 0.900 이하인 분석기법은 감별능력이 미흡한 기법으로 평가하였다.

결 과

RAPD

국내 각종 동물과 사람유래 *S. aureus* 균주에 대하여 2 종의 primer (4M 및 RA)를 각각 합성하여 RAPD를 수행하고 유전자 수준의 다양성을 분석하여 그 대표적인 성적을 Fig. 5과 Fig. 6에 각각 나타내었다. 먼저 4M primer를 적용한 RAPD profile에서는 1~20개의 DNA band가 120 bp~3.0 kb의 크기로 다양한 분포양상을 보였다. 먼저 한우유래 19 주에 대한 RAPD 성적 (Fig. 5)에 근거하여 덴드로그램을 작성하고 산출한 SID 값은 0.708로서 균주간을 효과적으로 감별하였다고 보기에는 미흡하였다.

같은 방법으로 마우스유래 20 주에 대한 RAPD 성적을 기초로 산출한 SID값은 0.853로, 소유래 균주의 성적보다는 비교적 우수한 감별능력을 보였다. 중국산 계육유래 균주(11 주)에 대해서도 동일한 방법으로 SID 값을 산출하였던 바, SID 0.782로 감별능력이 다소 미흡하였으며, 국내산 계육과 오리육에서 분리된 균주(11 주)에 대한 SID 값은 0.909로서 가장 높은 감별능력을 보여주었다. 그리고 중국산 및 국내산 계육유래 22 주에 대한 종합성적의 SID 값은 0.896으로 다소 낮아진 양상으로 조사되었다. 이는 균주가 많아짐에 따라서 분석기법의 감별능력도 함께 감소하는 비례적인 경향으로 분석되었다. 동물유래 균주와 달리

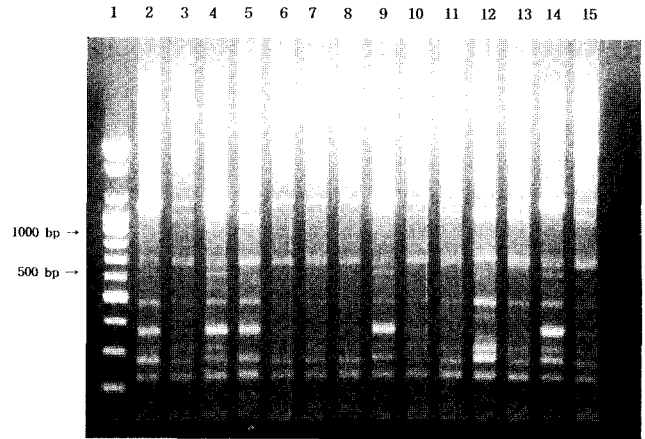


Fig. 1. The representative ERIC-PCR fingerprint of *S. aureus* strains from diverse animal species and humans. Lane 1; 1 kb DNA plus marker (1.5% agarose gel), lanes 2 to 14; *S. aureus* strains from Korean cattle, Korean goat, dog, mouse, chicken, pig, human and MRSA strains from human.

사람유래 MRSA 균주를 포함한 총 26 주에 대한 SID 값은 0.812로 확인되었다. 마지막으로 공시균주 전체 99 주에 대해서 4M primer를 이용한 RAPD profile에 근거하여 종합적으로 덴드로그램을 작성하여 균주 상호간에 대해서 유전자 수준의 감별능력을 평가하고자 SID 값을 산출하였던 바, 0.915의 양호한 SID 값을 산출하였다.

반면에 RA primer를 이용한 RAPD 성적에서는 200 bp~2.5 kb의 범위에서 2~10 개의 다양한 크기의 DNA band가 확인되었다(Fig. 7). 먼저 한우유래 17 주에 대한 SID 값을 계산하였던 바, 0.794로 확인되었고, 중국산 계육유래 균주의 경우에는 0.756으로 감별능력이 다소 미흡한 것으로 분석되었다. 또한 마우스유

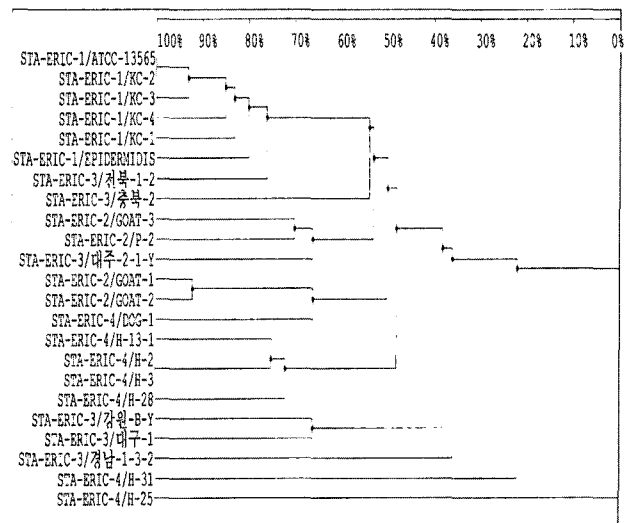


Fig. 2. Dendrogram pattern based on ERIC-PCR profiles of representative *S. aureus* strains from diverse animal species and humans (Bio-ID2+software).

래 균주의 성적은 SID 0.744로서 가장 낮은 성적이었다. 반면에 닭유래 12 주에 대한 분석성적의 SID 값은 0.909로 가장 높은 SID 값을 나타내어, 결과적으로 RA primer를 사용한 RAPD의 경우 닭유래 균주에 대해서 가장 효율적인 분석방법으로 평가되었다. 그리고 MRSA 균주를 포함한 사람유래 *S. aureus* 균주에 대한 성적은 SID 0.758로서 역시 저조한 성적이었다. 마지막으로 모든 숙주유래의 총 98 주에 대한 RA primer를 이용한 RAPD 성적을 토대로 작성한 덴드로그램을 기초로 하여 산출한 SID 값은 0.874로 확인되었다. 결국 4M primer와 RA primer의 양자의 primer를 이용한 RAPD 기법 상호간의 비교에서는 4M primer를 적용한 성적(SID 0.915)이 RA primer를 적용한 성적(SID 0.874)보다도 훨씬 더 우수한 감별능력을 확보하고 있는 것으로 조사되었다(Table 1).

REP-PCR 및 ERIC-PCR 기법을 이용한 molecular typing

국내 각종 동물 및 사람유래 *S. aureus* 균주에 대하여 먼저 ERIC-PCR을 수행하여 유전자 수준의 다양성을 조사하였으며 그 결과성적은 Fig. 1과 2에 나타난 바와 같았다. 먼저 총 107 주에 대한 ERIC-PCR을 수행한 종합분석 성적에서 공시균주들은 모두 10 가지의 유전형으로 구분되었고, EM-type에는 14주(13.1%)가 포함되어 가장 대표적인 유전형으로 분류되었으며, 이 그룹에는 사람유래의 6 주(42.9%)나 포함되어 가장 지배적인 것으로 확인되었다. 또한 총 107 주가 산출한 DNA profile을 기초로 덴드로그램을 작성하여 SID 값을 산출하였던 바, SID 0.929의 비교적 신뢰도 높은 값을 산출하였다. 이 값은 우리의 연구에서 수행한 PCR에 기초한 molecular typing 기법들 중에서는 가장 높은 SID 값으로 확인되었다(Table 1). 한편, 축종별 성적에서 한우유래 균주에 대한 ERIC-PCR 성적의 SID 값은 0.823으로 확인되었고, 닭과 오리유래 24 주에서는 총 7가지(CMA~CMG) 유전형으로 구분되었으며 CME-type에 총 8 주(33.3%)가 포함되어 가장 대표적인 유전형으로 확인되었다. 그리고 닭유래 균주에 대한 SID 값은 0.815로 확인되어 한우유래 균주들과 유사한 성적을 보였다. 그리고 마우스 유래 23 주에 대해서도 마찬가지로의 방법으로 분석을 하였던 바, 닭유래 균주와 동일하게 7 가지 (MA~MG) 유전형으로 분류되었고, MA-type에 7 주(30.4%)가 포함되어 가장 지배적인 유전형으로 분류되었으며, SID 값은 0.870으로 비교적 높은 수치를 보였다.

특히 사람유래 33 주의 *S. aureus*와 MRSA에 대하여 ERIC-PCR을 실시하고, 동일한 접근방법으로 분석했을 때 총 10가지

Table 1. Comparison of Simpson's index of diversity (SID) among the individual genotyping methods for *S. aureus* strains

Typing methods	RAPD		REP-PCR	ERIC-PCR
	RA-primer	4M-primer		
SID value	0.874	0.915	0.930	0.929
No. of total genotypes	9	14	20	10
Size of the largest genotype (%)	19 (19.4)	15 (14.7)	17 (15.7)	14 (13.1)

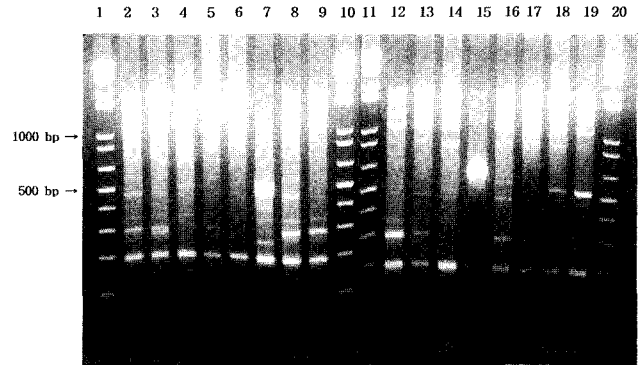


Fig. 3. The representative REP-PCR fingerprint of *S. aureus* strains from human. Lanes 1, 10, 11 and 20; 1 kb Plus DNA marker (1.5% agarose gel), lanes 2 to 9 and 12 to 19; *S. aureus* and MRSA strains from human.

(HA~HJ)의 유전형으로 분류되었으며, HB-type에는 8 주(24.4%)가 포함되어 가장 지배적인 유전형으로 분류되었고, SID 값은 0.890로서 숙주별 균주에 대한 SID 값 중에서는 가장 높은 성적을 보였다.

한편 동일한 균주에 대해서 REP-PCR을 수행한 성적은 Fig. 3과 4에서 나타난 바와 같았다. 먼저 소유래 균주들에 대하여 REP-PCR 성적에서 전체적으로 총 10 가지의 유전형으로 세분되었으며, RE-4 type에는 가장 많은 4 주가 포함되었고, 소유래 균주의 SID 값은 0.838로 확인되었다. 한편 마우스 유래 20 주의 성적은 약 >20%의 상동성 성적으로 총 16 가지의 유전형으로 분류되었지만, SID 값은 0.737로서 저조한 성적이었다. 그리고 닭유래 23 주에 대한 SID 값은 0.838으로 다소 높았다. 사람유래 24 주는 모두 5가지의 유전형으로 구분되었으며, 덴드로그램 분석성적에 근거한 SID 값은 0.812로 확인되었다.

마지막으로 현재의 연구에서 공시한 총 108 주의 *S. aureus*

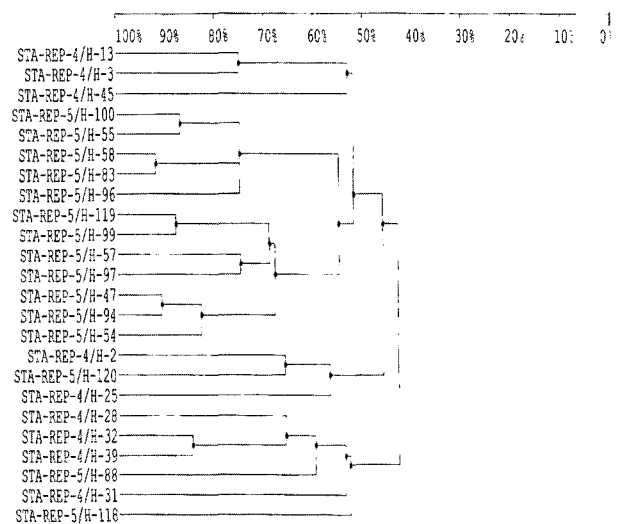


Fig. 4. Dendrogram pattern based on REP-PCR profiles of *S. aureus* strains from human including the MRSA strains (Bio-1D2+software).

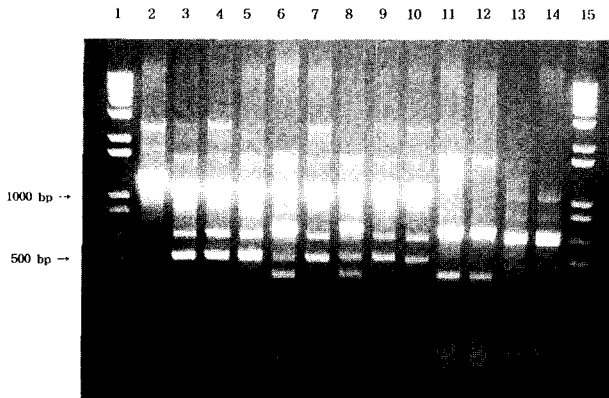


Fig. 5. RAPD fingerprint produced by 4M-primer of MRSA strains from human and MSSA strains from animal species. Lanes 1 and 15; 1 kb Plus DNA molecular markers (1.5% agarose gel), lanes 2 to 14; *S. aureus* strains from diverse animal species and human, lane 12; *S. aureus* reference strain ATCC 13565.

균주에 대한 종합적인 REP-PCR 성적에서 모두 20 가지 유전형으로 세분되었고 RB-type에 모두 17 주(15.7%)로 가장 많은 균주가 이 그룹에 포함되었다. 결과적으로 이들 균주들의 개별성적에 근거하여 작성된 덴드로그램 성적에 근거한 SID 값은 0.930으로 확인되었으며, 전체 균주에 대한 REP-PCR 성적이 가장 높은 SID 값을 확보한 것으로 조사되었다(Table 1).

유전자 분석기법 상호간에 대한 감별능력의 비교: 우리의 연구에서는 현재까지 *S. aureus* 균주에 대하여 일반 실험실 수준에서 가장 많이 그리고 널리 활용되고 있는 총 8 종의 PCR에 기초한 유전자 분석기법들을 선별하여 국내의 다양한 동물종과 MRSA를 포함한 사람유래 균주들에 대해서 각각 적용하였고, 그 결과 성적을 Table 2에 종합하였다. 먼저 ERIC-PCR 기법은 공시균주들을 총 10 가지의 유전형으로 구분하였고, 14 주(13.1%)가 대표적인 그룹에 포함되었으며, 결과적으로 이 분석법의 SID 값은 0.929로 확인되었다. 그리고 현재의 연구에서 공시한 총 108 주 의 *S. aureus* 균주에 대하여 적용하였던 REP-PCR 기법은 모두 20 가지 유전형으로 구분하였고, 대표적인 RB-type에는 모두 17 주(15.7%)가 포함되었으며 SID값은 0.930으로 확인되었다. 결국 0.930의 SID값은 ERIC-PCR 성적과는 비록 거의 차이가 없지만, 이제까지의 연구 성적에서는 가장 높은 SID값으로 확인되었다.

한편 지금까지 가장 많은 연구자들이 활용해왔던 것으로 알려진 *coa*-gene PCR-RFLP 기법은 공시균주들을 모두 11 가지의 유전형으로 분류하였고, 그중 대표적인 그룹에는 19 주(16.8%)가

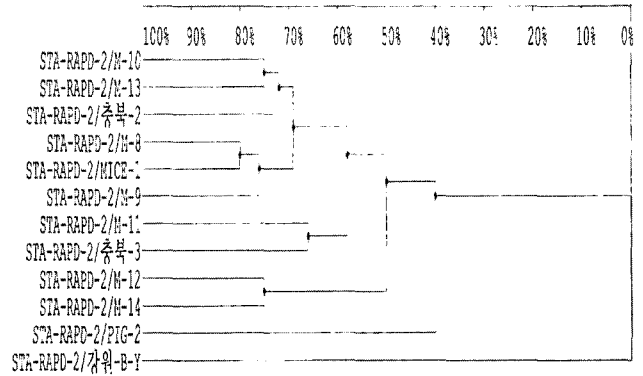


Fig. 6. Dendrogram based on RAPD patterns with 4M-primer. Percentages of similarity between patterns were calculated by Dice coefficients (Bio-1D2+software). The representative *S. aureus* strains were originated from pig, mouse, and poultry.

포함되었지만 SID 값은 0.894로 다소 저조하였다. 그리고 *coa*-gene PCR에서는 모두 10 가지의 유전형으로 분류되었고 그중 36 주(33.0%)가 가장 대표적인 유전형에 포함되어 SID값은 0.883으로 조사되었다. 반면에 *spa*-gene PCR은 공시균주들을 모두 11 가지의 유전형으로 분류하였고 가장 대표적인 그룹에는 39 주(34.8%)가 포함되는 것으로 분류하여 양자간에는 거의 유사한 성적을 보였지만, SID 값은 0.806으로 *coa*-gene PCR 보다도 저조하였다.

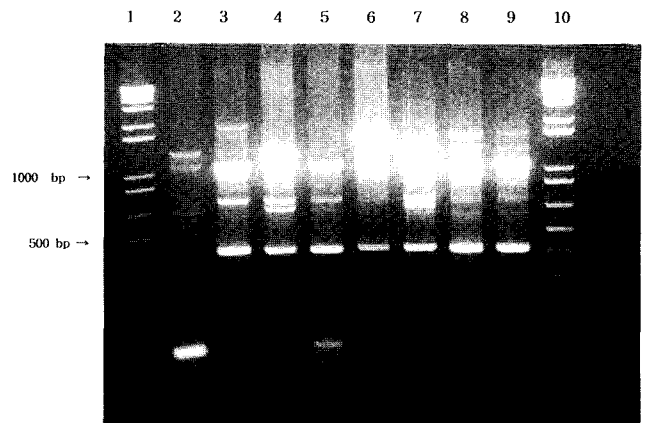


Fig. 7. RAPD fingerprint of *S. aureus* produced by RA-primer. Lanes 1 and 10; 1 kb DNA plus molecular markers (1.5% agarose gel), lanes 2 to 9; *S. aureus* strains from diverse animal species and human.

Table 2. Comparison of Simpson's index of diversity (SID) of eight-type of PCR based genotyping methods for molecular typing of *S. aureus* strains

Typing methods	<i>aroA</i> -gene		<i>coa</i> -gene		<i>spa</i> -gene PCR	RAPD		REP-PCR	ERIC-PCR
	PCR-RFLP	PCR	PCR-RFLP	PCR		RA	4M		
SID value	0.462	0.883	0.894	0.806	0.874	0.915	0.930	0.929	
No. of total genotypes	7	10	11	11	9	14	20	10	
Size of the largest genotype (%)	17 (73.9)	36 (33.0)	19 (16.8)	39 (34.8)	19 (19.4)	15 (14.7)	17 (15.7)	14 (13.1)	

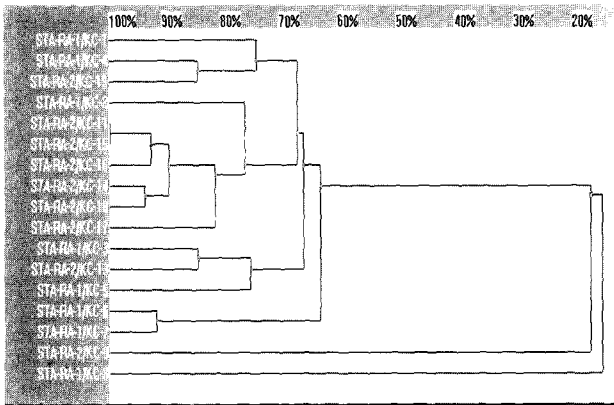


Fig. 8. Dendrogram based on RAPD patterns using the RA-primer. Percentages of similarity between patterns were calculated by Dice coefficients (Bio-1D2+software). The representative *S. aureus* strains from Korean cattle (KC) were compared.

한편 RAPD 기법에 대해서도 전술된 방법과 동일한 방법으로 SID 값을 산출하고 감별능력을 비교하였을 때, 4M primer를 사용한 RAPD 기법의 경우 공시균주들을 모두 14 종의 유전형으로 구분하였으며, 그중 15 주(14.7%)가 가장 대표적인 유전형으로 구분되었다. 반면에 RA primer를 적용한 경우에는 모두 8 종의 유전형으로 세분되었고, 그중 19 주(19.4%)가 가장 대표적인 유전형에 포함되었다. 따라서 이와 같은 성적에 기초하여 4M primer를 적용한 RAPD의 SID 값은 0.915로 확인되었고, RA primer를 선택한 RAPD의 SID 값은 0.874로 확인되었다. 결과적으로 우리의 연구에서 공시한 균주들의 경우에는 RA primer를 선택하기보다는 4M primer를 적용한 RAPD 기법이 보다 뛰어난 감별능력을 발현했던 것으로 확인되었다.

고 찰

Hunter와 Gaston(9, 10)에 따르면 많은 인자에 따라서 개별 분석기법의 감별능력이 영향을 받는다고 지적하였고, 또한 분석기법이 신뢰성을 확보하려면 0.900 이상의 SID 값은 확보하여야 신뢰도가 인정되는 바람직한 분석기법으로 평가할 수 있다고 하였다. 이들의 기준에 근거하면 우리의 연구에서 수행했던 분석기법들 중에서 단지 REP-PCR (SID 0.930), ERIC-PCR (SID 0.929) 및 RAPD (4M primer: SID 0.915) 기법만이 공시한 다양한 출처유래의 *S. aureus* 균주들의 유전자 수준의 분석기법으로서 그 신뢰도를 인정할 수 있는 충분한 감별능력을 확보한 분석기법으로 평가할 수 있었다. 따라서 기 보고된 논문에서 보고된 PCR 기법들의 성적들(5 종 기법 모두가 SID 값이 0.900 이하 수준이었음)과 비교할 경우 현재의 연구에서 수행한 PCR 기법들은 기 보고한 5 종의 PCR 기법들보다는 DA가 더 우수함을 알 수 있었다.

Fig. 1과 3에서 보는 바와 같이 REP-PCR은 ERIC-PCR의 성적들은 RAPD 성적보다도 오히려 더욱 복잡한 DNA band들로

구성되어 있기 때문에 시야로 이들 성적들을 분별력 있게 분석하기는 어려운 것으로 간주되었다. 특히 REP-PCR 성적은 ERIC-PCR의 경우 더 많은 밴드로 구성되어 있어 시야로 분석하기에는 더욱 어려운 실정이었다. 따라서 전술한 3 종의 PCR 기법의 성적은 시야로 분석하기에는 어려워 우리의 성적에서는 Bio1D2+와 GelCompar II와 같은 전문분석용 프로그램을 적용하여 결과 성적을 분석하였고, 이들 프로그램이 산생한 수지도(dendrogram) 성적에 근거하여 Hunter와 Gaston(9, 10)의 SID를 산출하여 더 객관적이고 과학적인 분석을 실시하였다. 따라서 DNA 단편들이 많은 경우, 특히 사용하는 균주의 숫자가 많은 경우에는 전문분석 프로그램의 활용이 필수적인 것으로 보였다(5, 14, 15).

비록 PCR에 기초한 분석기법들은 실험실 성적 상호간의 재현성에 있어서 PFGE 기법보다는 떨어진다는 사실은 이미 많은 연구자들에 의해 보고된 바 있어 익히 잘 알려진 사실이다. 그러나 광범위한 실험실에서 그리고 다양한 수준의 실험실 여건 하에서 누구나 쉽고 편리하게 접근할 수 있으며, 또한 신속하고 특이적으로 짧은 시간에 결과성적을 확보할 수 있다는 측면에서는 PCR 기법은 뛰어난 장점을 확보하고 있어 PCR에 기초한 각종 분석기법들은 여전히 다양한 수준의 많은 실험실에서 널리 활용되고 있는 실정이다. 그 좋은 예로 PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) 자료를 보면 2003년 현재까지 국제학술지에 게재된 PCR을 이용한 논문만 하더라도 172,232 건이 보고될 정도라는 사실로도 충분히 짐작이 가능한 상황이다(4, 5, 7, 15).

*S. aureus*는 물론이며 다양한 병원성 미생물에 대해서 유전자 수준의 감별분석을 위해 이상적인 분석기법이라면 쉽고, 신속하며, 감별능과 재현성이 뛰어난 분석기법이라야 할 것으로 알고 있다. 아울러 광범위한 분야에서 다양한 실험실에서 적용이 가능하다면 더욱 좋을 것이며, 또한 실험실 상호간이나 국가 상호간에 확보된 성적에 대해서도 쉽게 비교할 수 있다면 지극히 바람직한 분석기법이라 사료된다. 그러나 아직까지 이와 같은 요구조건을 모두 충족시켜 줄 수 있는 이상적인 분석기법이 없는 것이 아쉬울 뿐이다. 그리고 다종다양하게 개발되어 있는 PCR 기법을 기초로 한 각종 분석기법들이 생산한 성적 상호간에는 결코 완전히 일치하지 않는다는 사실을 인식하는 것도 중요하다. 따라서 단일 방법에 의존하지 않고, 하나 이상의 다양한 분석기법을 적용하며, 그 성적들 상호간을 종합적으로 통계학적인 분석방법으로 보다 객관적이고, 과학적으로 비교, 분석할 경우에는 보다 신뢰성 있고 공유할 수 있는 가치 높은 해석을 이끌어낼 수 있다는 사실을 우리의 연구 성적을 통하여 확인할 수 있었다(4, 5, 9).

앞으로 동일한 균주에 대해서 PFGE 성적까지도 수행한 후 우리가 수행했던 총 8 종의 PCR 성적들이 확보한 DA보다도 PFGE가 과연 보다 우수한 DA를 발현할 수 있는지를 확인하는 것이 필요하다하겠다(4, 8, 14).

참고문헌

1. 김신, 김상운, 우용구, 등. 1997. 경북 안동의 한 종합병

- 원에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 항균제 내성양상과 PCR-RFLP를 이용한 MRSA의 Molecular typing. *감염*, 33, 404-413.
2. 우용구, 이수화, 김신, 김봉환. 2004. Polymerase chain reaction을 활용한 국내 동물과 사람환자에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 분리주의 분자유전학적 특성의 분석. *한국미생물학회지*. 33, 404-413.
 3. 우용구, 이수화, 이철현, 이오수, 김봉환. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis를 이용한 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* bioserovar *Pullorum*의 분자유전학적 다양성에 관한연구. *대한수의학회지*. 43, 77-86.
 4. Ariane, D., S. Annette, V.E. Johan et. al.. 2000. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3527-3533.
 5. Belkum A, J Kluytmans, W Leeuwen, et al. 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1537-1547.
 6. Bennett RW and GA Lancette. 1995. Food and Drug administration, Bacteriological analytical manual, Chapter 12. *Staphylococcus aureus*, 8th ed. AOAC International, 481 North Frederick Avenue, Suite 500, Gaithersburg, USA.
 7. Hermans K, F Haesebrouck, M Vaneechoutte et al. 2000. Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 72, 311-319.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Hunter PR. 2000. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1903-1905.
 11. Jersek B, P Gilot, M Gubina, et al. 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 103-109.
 12. Lambe DW, Jr Wesley, E Kloos, et al. 1994. *Staphylococcal* food poisoning. Handbook of Zoonoses: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic, CRC Press, p. 369-376.
 13. MacFaddin JF. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA.
 14. Olmos A, JJ Camarena, JM Nogueira, et al. 1998. Application of an optimized and Highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1128-1134.
 15. Tambic A, Power EGM, H Talsania, et al. 1997. Analysis of an outbreak of non-phage typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3092-3097.
 16. 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 November 16, 2004/Accepted March 4, 2005)

ABSTRACT : Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Strains from Domestic Animals and Humans by REP-PCR Analysis

Yong-Ku Woo and Shin Kim (¹Institute of Laboratory Animal Resources, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea, ²College of National Science, An-dong National University, An-dong, 760-800 Korea)

To select the rapid and efficient molecular subtyping method for epidemiologic monitoring of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains at clinical laboratory levels, a total 116 of *S. aureus* and MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) strains from diverse animal species [Korean cattle, goat, pig, dog, chicken, mouse] and also humans were analyzed. To evaluate the discriminatory ability (DA) of individual PCR methods, random amplified polymorphic of DNA [RAPD; 4M & RA primer], repetitive extragenic palindromic sequences PCR (REP-PCR), and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences PCR (ERIC-PCR) methods were conducted and then compared on their Simpson's index of diversity (SID) values based on the dendrogram patterns, which was produced by software program (Bio1D2+ & GelCompar II). In first, RAPD using the 4M primer (SID 0.915) was expressed more higher SID value than that of RA primer (SID 0.874). 4M primer was expressed more powerful DA than RA. Both REP-PCR (SID 0.930) and ERIC-PCR (SID 0.929) methods showed much more higher DA than that of RAPD. According to the present results, both REP-PCR and ERIC-PCR among the tested analysis methods were found as the most reliable and discriminative molecular subtyping method, because they expressed the highest DA for the present *S. aureus* and MRSA strains.