

< 단 보 >

## *rpoB* 염기서열 분석을 이용한 응고효소 음성 포도알세균 분자 동정

성원진<sup>1,2</sup> · 김단일<sup>1,3,4</sup> · 김은경<sup>1,4</sup> · 고대성<sup>1,2</sup> · 노영혜<sup>1,4</sup> · 김재홍<sup>2,3</sup> · 권혁준<sup>1,3,4,\*</sup>

서울대학교 수의과대학 <sup>1</sup>산업동물의학연구소, <sup>2</sup>조류질병연구소, <sup>3</sup>수의과학연구소,  
<sup>4</sup>서울대학교 그린바이오과학기술연구원 산업동물임상교육연수원

(접수: 2017년 12월 7일, 수정: 2018년 2월 26일, 게재승인: 2018년 3월 8일)

## Molecular identification of coagulase-negative staphylococci by *rpoB* sequence typing

Won-Jin Seong<sup>1,2</sup>, Danil Kim<sup>1,3,4</sup>, Eun-Kyung Kim<sup>1,4</sup>, Dae-Sung Ko<sup>1,2</sup>, Younghye Ro<sup>1,4</sup>,  
Jae-Hong Kim<sup>2,3</sup>, Hyuk-Joon Kwon<sup>1,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Farm Animal Medicine, <sup>2</sup>Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, and  
<sup>3</sup>Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

<sup>4</sup>Farm Animal Clinical Training and Research Center, Institutes of GreenBio Science Technology, Pyeongchang 25354, Korea

(Received: December 7, 2017; Revised: February 26, 2018; Accepted: March 8, 2018)

**Abstract:** Bovine mastitis (BM) has resulted in enormous economic loss in the dairy industry and coagulase-negative staphylococci (CNS) have caused subclinical BM. Although VITEK 2 GP ID card (VITEK 2) has been used for CNS identification, the probability of identification varies. The *rpoB* sequence typing (RSTing) method has been used for molecular diagnosis and epidemiology of bacterial infections. In this study, we undertook RSTing of CNS and compared the results with those of VITEK2 and 16S rRNA gene sequencing. As compared VITEK2, the molecular-based methods were more reliable for species identification; moreover, RSTing provided more molecular epidemiological information than that from 16S rRNA gene sequencing.

**Keywords:** 16S rRNA gene sequencing, bovine mastitis, coagulase-negative staphylococci, *rpoB* sequence typing

소 유방염은 다양한 미생물 원인균에 의해 발생하며 그중 응고효소 음성 포도알 세균(coagulase-negative staphylococci, CNS)은 준임상형 유방염의 주요 원인으로 알려져 있다. CNS의 동정은 생화학적 특성을 이용한 API Staph kit, VITEK 2 GP ID card(VITEK2)를 보편적으로 사용하고 있고, 각각 98%, 93% 정확도를 나타내지만 종에 따라 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 [13]. 동정이 안 되거나 결과가 명확하지 않은 경우 분자 동정법인 16S rRNA 유전자 염기서열을 데이터베이스의 염기서열과 비교하여 최종 동정(16S rRNA 유전자 동정법)하고 있으나 일부 세균에서 16S rRNA 유전자가 수평 전파되어 세균 동정에 혼선을 초래하는 것으로 알려져 있다 [6, 14]. 병원성 미생물의 분자 동정법으로는 RNA polymerase beta subunit 유전자(*rpoB*)의 일부 또는 전체가 사용되고 있으며 전체 유전자를 사용하는 경우에는 16S rRNA 유전자와 비교해 살모넬라 혈청형 구별이 가능하

고, 황색포도알세균 분리주에 대한 *rpoB* 유형 분석(*rpoB* sequence typing, RSTing)을 통해 분자역학 연구가 가능하며 리팜핀 및 반코마이신 내성 관련 돌연변이 정보를 확보할 수 있어 유용한 것으로 알려져 있다 [11, 12]. 본 연구에서는 국내 분리 CNS의 VITEK2 동정 결과와 16S rRNA 유전자 동정법 및 RSTing 결과를 비교하였고, 우점균인 *Staphylococcus chromogenes*(*S. chromogenes*), *S. haemolyticus* 및 *S. simulans*의 *rpoB* 유형(*rpoB* sequence type, RST)을 최초로 분류하였다. 본 연구에서 사용한 CNS 분리주는 Table 1에 제시하였고, GP ID card에 배양균을 접종하여 VITEK2(bioMérieux, France) 기기에 장착한 후 제조사가 제시한 방법에 따라 수행하였다. 16S rRNA 유전자 증폭 및 동정과 CNS의 전체 *rpoB* 유전자 증폭 및 염기서열 분석은 기존의 방법과 함께 신규 *rpoB* 염기서열 분석용 프라이머 (Sta-*rpoB*-S1F, 790-810, 5'-CGTTATGAYTTAGCAAGTGTT-3',

\*Corresponding author

Tel: +82-2-880-1226, Fax: +82-2-885-6614  
E-mail: kwonhj01@snu.ac.kr

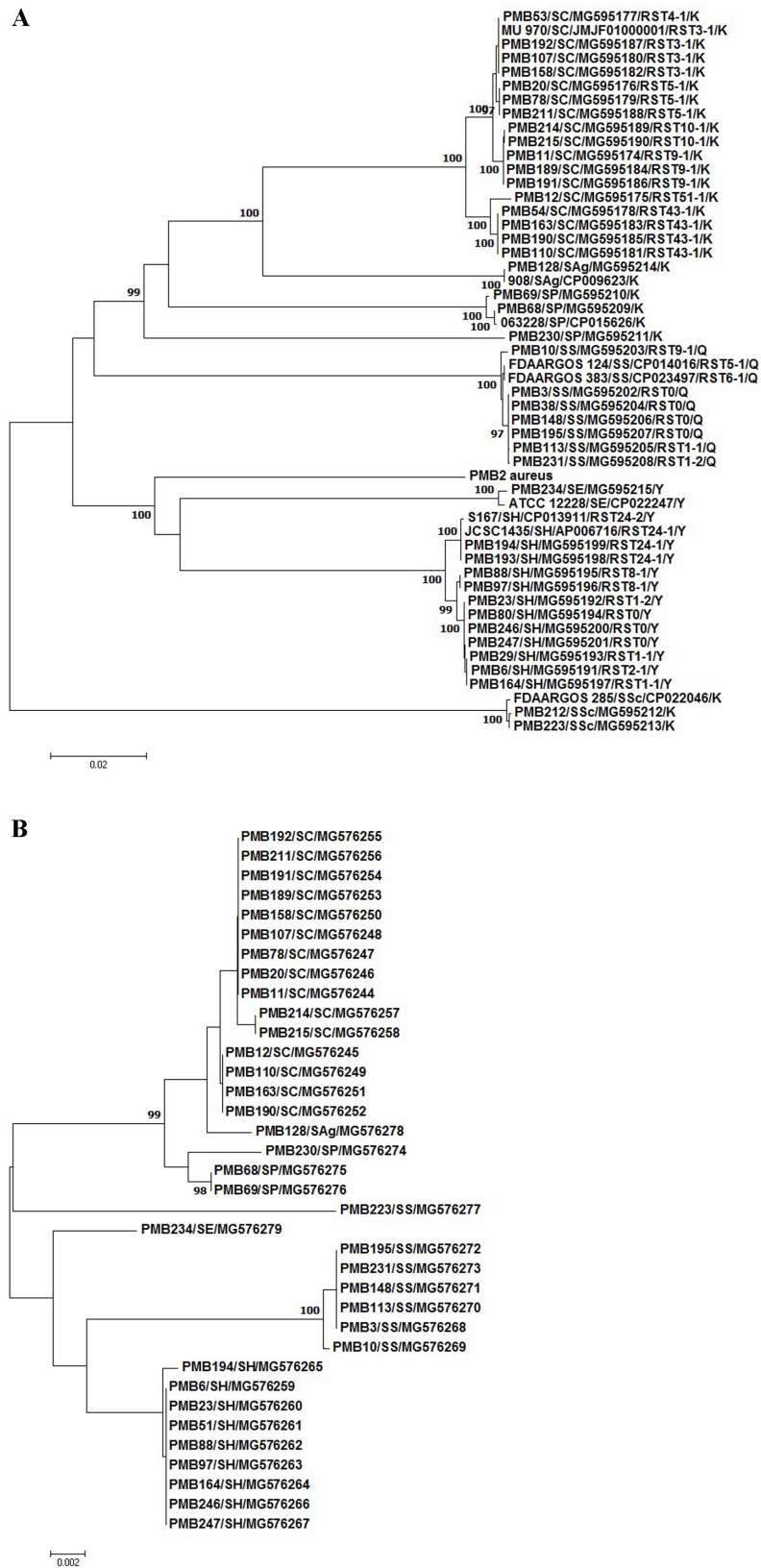
**Table 1.** Identifications of coagulase-negative staphylococci by VITEK 2 GP ID card (VITEK2), 16S rRNA gene and *rpoB* sequencing type

Farm	Isolate	Identification based on		
		VITEK2 (%*)	16S rRNA gene	<i>rpoB</i>
1	PMB11	<i>S. auricularis</i> (93)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
2	PMB12	<i>S. chromogenes</i> (97)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
3	PMB20	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
4	PMB53	<i>S. chromogenes</i> (98)	NT	<i>S. chromogenes</i>
	PMB54	<i>S. chromogenes</i> (98)	NT	<i>S. chromogenes</i>
5	PMB78	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
6	PMB107	<i>S. hyicus</i> (95)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
	PMB110	<i>S. chromogenes</i> (96)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
7	PMB158	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
8	PMB163	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
9	PMB189	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
	PMB190	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
	PMB191	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
10	PMB192	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
11	PMB211	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
12	PMB214	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
	PMB215	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i>
	PMB6	<i>S. haemolyticus</i> (97)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
14	PMB23	<i>S. auricularis</i> (93)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
15	PMB29	<i>S. similans</i> (97)	NT	<i>S. haemolyticus</i>
16	PMB80	<i>S. haemolyticus</i> (97)	NT	<i>S. haemolyticus</i>
17	PMB88	<i>S. warneri</i> (94)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
	PMB97	<i>S. warneri</i> (94)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
18	PMB193	<i>S. haemolyticus</i> (98)	NT	<i>S. haemolyticus</i>
19	PMB194	<i>S. haemolyticus</i> (99)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
20	PMB246	<i>S. haemolyticus</i> (99)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
	PMB247	<i>S. haemolyticus</i> (99)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
24	PMB3	<i>S. similans</i> (90)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
25	PMB10	<i>S. similans</i> (98)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
26	PMB38	<i>S. lugdunensis</i> (93)	NT	<i>S. similans</i>
27	PMB113	<i>S. chromogenes</i> (98)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
28	PMB148	<i>S. lugdunensis</i> (93)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
29	PMB195	<i>S. similans</i> (90)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
30	PMB231	<i>S. similans</i> (95)	<i>S. similans</i>	<i>S. similans</i>
31	PMB230	<i>S. auricularis</i> (93)	<i>S. pseudintermedius</i>	Unknown
32	PMB212	<i>S. chromogenes</i> (98)	NT	<i>S. sciuri</i>
33	PMB223	<i>S. hominis</i> (93)	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>
34	PMB128	<i>S. hyicus</i> (97)	<i>S. agnetis</i>	<i>S. agnetis</i>
35	PMB234	<i>S. epidermidis</i> (98)	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>

NT, not tested. \*Identification probability.

Sta-rpoB-S3F, 1523–1544, 5'-CTCACTATGGYCGTATGTGTCC-3'; Sta-rpoB-S3-2F, 2284–2303, 5'-TTCATGACTTGGACGGTTA-3'; Sta-rpoB-S4r, 2589–2611, 5'-CTTCACGTGCTTTTTTACCRAAG-3')를 추가하여 수행하였다 [11, 14].

CNS RST는 황색포도알균의 RST 명명법과 동일한 방법으로 결정하였다. 즉, 각 CNS 종의 분리주와 GenBank 등록주의 염기서열로부터 consensus 염기서열을 결정한 후 consensus 염기서열과 각 분리주의 염기서열을 비교하여 서



**Fig. 1.** Phylogenetic analysis of the complete *rpoB* gene (A) and partial 16S RNA gene (B) sequences of the coagulase-negative staphylococci isolates. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method (Tamura-Nei distance and 1,000 bootstrapping replicates) in the MEGA software. The GenBank accession No. and *rpoB* sequence type of each isolate are represented in parentheses.

로 다른 염기서열의 개수를 맨 앞에 표시하고, 개수가 같지만 염기서열이 다른 경우 일련번호를 붙여 구분하였다 [11].

본 연구자들은 2014년부터 2016년까지 국내 유방염 소의 원유로부터 분리된 유방염 원인균의 항생제 감수성과 동정 결과를 보고하였다 [5]. 이 중 35개 농장에서 분리된 CNS 39주의 16S rRNA 유전자와 *rpoB* 전체 염기서열을 결정하여 동정 결과를 비교하였다(Table 1). VITEK2 동정 결과와 34개의 16S rRNA 유전자 동정 결과를 비교한 결과 71%(24/34)의 일치율을 보였다(Table 1). 과거 동정률이 낮았던 *S. chromogenes*의 경우 93%(13/14) 동정되었으며 *S. auricularis*(3주), *S. hyicus*(2주), *S. warneri*(2주), *S. lugdunensis* (1주), *S. hominis*(1주), *S. similans*(1주), *S. chromogenes*(1주)에서 차이를 보였다 [9]. CNS 분리주 39개의 *rpoB* 염기서열을 결정하여 VITEK2 및 16S rRNA 유전자 동정 결과와 비교한 결과 각각 69.2%(27/39)와 97.1%(33/34) 일치하였다. VITEK2 동정 결과와 분자 동정법 결과의 낮은 일치율은 CNS의 종에 따른 정확도 차이를 고려해도 낮은 것으로 CNS 동정에 VITEK2가 적당하지 않다는 것을 시사하였다. 각 분리주의 *rpoB* 염기서열을 BLAST(National Center for Biotechnology Information, USA)로 검색한 결과 대부분의 분리주는 모두 GenBank에 등록된 종과 99% 이상의 염기서열 동일성을 보였다. 그러나 PMB230의 경우 16S rRNA 유전자 염기서열로는 PMB68 및 PMB69와 함께 *S. pseudintermedius*로 분류되었으나 *rpoB* 서열로는 87% 동일성을 보여 전혀 달랐고, GenBank에 동일한 서열이 검색되지 않아 *rpoB* 염기서열로는 종을 동정할 수 없었다. 최근 16S rRNA 유전자가 일부 세균에서 수평 전파가 일어나 서로 다른 종의 세균이 유사한 염기서열을 보유할 수 있다는 사실이 검증되어 PMB230도 유사한 사례인지를 확인하기 위한 추가연구가 필요하다고 생각한다 [10]. 본 연구에서 새롭게 결정한 16S rRNA 및 *rpoB* 염기서열은 GenBank에 등록하였다(Fig. 1). 또한 *rpoB* 염기서열 비교에 사용한 GenBank 기등록 CNS 표준주의 이름과 등록번호도 Figure 1A에 제시하였다.

*S. chromogenes*, *S. haemolyticus* 및 *S. simulans*의 RSTing을 실시한 결과 *S. chromogenes*는 8개(RST 3-1, 4-1, 5-1, 9-1, 10-1, 43-1, 44-1, 55-1), *S. haemolyticus*는 7개(RST 0, 1-1, 1-2, 2-1, 8-1, 24-1, 24-2), *S. simulans*는 6개(RST 0, 1-1, 1-2, 5-1, 6-1, 9-1)의 RST로 분류되었으며 각 분리주의 RST는 Figure 1A에 표시하였다. *S. chromogenes*은 RST 3-1과 RST 5-1이 서로 다른 3개 농장에서 분리되어 다른 RST에 비해 빈도가 높았고, 같은 농장에서 개체별 RST가 같은 경우(농장 9, PMB89=PMB91=RST9-1; 농장 12, PMB214=PMB215=RST10-1; 농장 17, PMB88=PMB97=RST8-1; 농장 20, PMB246=PMB247=RST0)도 있었으나 다른 경우(농장 4, PMB53=RST4-1, PMB54=RST43-1; 농장 6, PMB107=RST3-1, PMB110=RST44-1)도 있어서 분리주에 대한 충분한 RSTing을 수행하는 경우 CNS 분자역학을 이해하는데 유용할 것으로 생각하였다.

CNS 분리주의 종별, 분리주별 근연 관계를 알아보기 위해 *rpoB* 및 16S rRNA 유전자의 염기서열과 MEGA7의 neighbor-joining method(Tamura-Nei distance, 1,000 bootstrapping replicates)를 사용하여 계통분석을 수행하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1) [7]. 그 결과 *rpoB* 계통수의 경우 *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*가 하나의 클러스터를 형성(100%)하였고, *S. chromogenes*, *S. agnetis*, *S. pseudintermedius*가 또 다른 클러스터를 형성(98%)하였다. 각각의 CNS 분리주는 같은 종끼리 클러스터를 형성하였으나 *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* 및 *S. simulans*의 경우 분리주간의 염기서열 차이로 서로 다른 클러스터를 형성하였고, 같은 RST끼리 동일한 클러스터를 형성하였다. 그러나 16S rRNA 유전자 염기서열로 계통분석 하여 작성한 계통수의 경우 *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* 및 *S. simulans*의 분리주가 보다 단순한 클러스터 양상을 보였으며 이는 같은 종 내 분리주간의 염기서열의 차이가 크지 않아 다양성이 작다는 것을 의미한다. 따라서, CNS 감염에 의한 소 유방염 분자역학 연구를 위해서는 16S rRNA 유전자 분석법보다는 RSTing 방법이 더욱 유용할 것으로 생각한다 [11].

리팜핀 내성과 특정 *rpoB* 돌연변이가 관련이 있다는 사실이 보고되었으며 반코마이신 내성 황색포도알균의 치료를 위해 리팜핀을 반코마이신과 병용하는 경우도 있고, 담토타마이신 내성과 반코마이신 중간 내성을 보이는 황색포도알균에서 특이적인 *rpoB* 돌연변이가 보고된 바 있다 [1-4, 8, 15]. 따라서, 이러한 돌연변이 유무를 CNS 분리주에서 확인한 결과 737번 타이로신(Y)이 페닐알라닌(F)으로 변하는 돌연변이(Y737F)와 동일한 변화는 관찰되지 않았으나 타이로신이 리신(Y737K)으로 변하거나 글루타민(Y737Q)으로 변하는 돌연변이가 관찰되어 Figure 1A의 국내 분리주 이름에 Y, K 또는 Q로 표시하였다. 따라서 향후 이들 돌연변이의 기능에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 국내 소 유방염 유래 CNS 분리주에서 VITEK2를 이용한 동정법과 분자 동정법인 16S rRNA 유전자 동정법을 비교하였고, *rpoB* 전체 염기서열을 결정하여 RSTing 방법을 확립한 후 그 결과를 비교하였다. 그 결과 분자 동정법의 동정 정확도가 높았으며, 16S rRNA 유전자 동정법보다 동일한 CNS 종의 분리주를 세분할 수 있어서 세균 동정뿐 아니라 분자역학 연구에 유용할 것으로 생각한다.

## 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ010855)의 지원으로 이루어졌습니다.

## References

1. Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1998,

- 42, 2590-2594.
2. **Chambers HF.** Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988, **1**, 173-186.
  3. **Cui L, Isii T, Fukuda M, Ochiai T, Neoh H, Camargo ILBC, Watanabe Y, Shoji M, Hishinuma T, Hiramatsu K.** An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**, 5222-5233.
  4. **Faville RJ Jr, Zaske DE, Kaplan EL, Crossley K, Sabath LD, Quie PG.** *Staphylococcus aureus* endocarditis. Combined therapy with vancomycin and rifampin. *JAMA* 1978, **240**, 1963-1965.
  5. **Kim DI, Kim EK, Seong WJ, Ro Y, Ko DS, Kim NH, Kim JH, Kwon HJ.** [Identification of microbiome with 16S rRNA gene pyrosequencing and antimicrobial effect of egg white in bovine mastitis]. *Korean J Vet Res* 2017, **57**, 117-126. Korean.
  6. **Kitahara K, Miyazaki K.** Revisiting bacterial phylogeny: natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mob Genet Elements* 2013, **3**, e24210.
  7. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016, **33**, 1870-1874.
  8. **Matsuo M, Hishinuma T, Katayama Y, Cui L, Kapi M, Hiramatsu K.** Mutation of RNA polymerase  $\beta$  subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**, 4188-4195.
  9. **Matthews KR, Oliver SP, King SH.** Comparison of Vitek Gram-positive identification system with API Staph-Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin. *J Clin Microbiol* 1990, **28**, 1649-1651.
  10. **Schouls LM, Schot CS, Jacobs JA.** Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J Bacteriol* 2003, **185**, 7241-7246.
  11. **Seong WJ, Kim JH, Kwon HJ.** Comparison of complete *rpoB* gene sequence typing and multi-locus sequence typing for phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Appl Microbiol* 2013, **59**, 335-343.
  12. **Seong WJ, Kwon HJ, Kim TE, Lee DY, Park MS, Kim JH.** Molecular serotyping of *Salmonella enterica* by complete *rpoB* gene sequencing. *J Microbiol* 2012, **50**, 962-969.
  13. **Tan TY, Ng SY, He J.** Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* 2008, **46**, 2393-2395.
  14. **Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD.** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 1999, **46**, 327-338.
  15. **Watanabe Y, Cui L, Katayama Y, Kozue K, Hiramatsu K.** Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2011, **49**, 2680-2684.