

# Infrequent-Restriction-Site 중합효소 연쇄 반응(ISR-PCR)을 사용한 지역사회 발생 Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) 생성 대장균(*Escherichia coli*)의 분자역학적 분석 및 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)와의 비교

변지현<sup>1</sup> · 유진홍<sup>2\*</sup> · 박철민<sup>3</sup> · 이동건<sup>2</sup> · 박선희<sup>2</sup> · 최수미<sup>2</sup> · 최정현<sup>2</sup> · 김시현<sup>2</sup> · 권재철<sup>2</sup>

가톨릭대학교 의과대학 일반대학원 생명과학과<sup>1</sup>, 내과학교실<sup>2</sup>, 가톨릭대학교 의과대학 연구원<sup>3</sup>

## Molecular Epidemiologic Analysis of Community-Onset Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* Using Infrequent-Restriction-Site Polymerase Chain Reaction (IRS-PCR) with Comparison by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

**Background:** We evaluated the ability of infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR) to perform molecular epidemiologic analysis of Community-Onset Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*, and also assessed the use of PFGE as an alternative method.

**Materials and Methods:** IRS-PCR assay was performed using combinations of adaptors for *Xba*I and *Hha*I restriction sites on clinical isolates of *E. coli* (n=51). We compared the discriminatory power, quality and efficiency of IRS-PCR to PFGE.

**Results:** In *E. coli*, PFGE discriminated 39 (76.4%) and IRS-PCR discerned 41 (80.3%) of the total 51 strains. It took much less time to complete IRS-PCR (one day) than PFGE (at least 4 days).

**Conclusions:** IRS-PCR is a more sensitive and rapid alternative to PFGE for molecular epidemiologic analysis of *E. coli*.

**Key Words:** ESBL-producing *E. coli*, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR), Genotyping

## 서론

최근 전세계적으로 *Escherichia coli*에서 ESBL을 생산하는 균주가 매년 증가하며, 특징적으로 CTX-M type ESBL을 생성하는 *E. coli*가 지역사회에서 매우 증가된다고 보고되었다[1-4]. 또한, ESBL생성 *E. coli* 균혈증 중 약 19%는 지역사회에서 획득된 것으로 보고된 바 있으며, *E. coli*에서 대부분 CTX-M type ESBL을 가지고 있고 다제 내

Ji-Hyun Byun<sup>1</sup>, Jin-Hong Yoo<sup>2\*</sup>, Chulmin Park<sup>3</sup>, Dong-Gun Lee<sup>2</sup>, Sun-Hee Park<sup>2</sup>, Su-Mi Choi<sup>2</sup>, Jung-Hyun Choi<sup>2</sup>, Si-Hyun Kim<sup>2</sup>, and Jae-Cheol Kwon<sup>2</sup>

Department of Biomedical Science, The Catholic University of Korea, Graduate School<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, College of Medicine, and Catholic Research Institutes of Medical Science<sup>3</sup>, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Copyright © 2012 by The Korean Society of Infectious Diseases | Korean Society for Chemotherapy

Submitted: July 7, 2011

Revised: December 14, 2011

Accepted: January 11, 2012

Correspondence to Jin-Hong Yoo

Division of Infectious Disease, Department of Internal Medicine, Bucheon St. Mary's Hospital, 2 Sosa-dong, Wonmi-gu, Bucheon 420-717, Korea

Tel: +82-1577-0675, Fax: +82-32-340-2669

E-mail: jhyoo@catholic.ac.kr

[www.icjournal.org](http://www.icjournal.org)

성을 나타낸다. CTX-M ESBL 유전자는 mobile genetic element와 연관되어 지역사회에서 ESBL이 쉽게 전파할 수 있다[5, 6].

병원균의 역학적 분석을 하기 위한 방법으로는 항생제 감수성양상, phage형별 등의 표현형별 방법과 DNA 혹은 RNA 수준에서 분석하는 분자역학적 형별(genotyping) 방법을 사용하는데, 정확도나 재현성, 변별력 등의 면에서 후자가 더 널리 사용되고 있다. 이들 중 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)법은 분자 역학 분석법에서 표준법으로 사용되고 있다. 그러나 PFGE는 재현성과, 정확도면에서 장점을 갖고 있지만 시간적 및 경제적 부담이 많아 실제적으로 사용이 어려운 실정이다[7]. 이와 비교하여, 시간과 노력이 덜 소요되면서도 분자역학적 형별을 할 수 있도록 DNA 나 RNA 를 증폭하는 중합효소 연쇄반응을 이용한 방법들이 많이 개발되어 왔다. 이러한 기법들 중에서 Infrequent-Restriction-Site Polymerase Chain Reaction (IRS-PCR)법은 Mazurek[8]에 의하여 개발된 유전자 typing방법 중 하나로, 재현성과 변별력이 높아서 새로운 대안의 가능성을 시사하고 있다. 기존의 PCR typing과 다른 점으로는 infrequent 및 frequent cutter 두 가지의 제한 효소를 함께 사용하며, 각 효소에 해당하는 adaptor와 linker를 primer와 함께 사용하여 필요한 부위만을 선택적으로 증폭하는 것이다[9].

현재 IRS-PCR분석은 *Vibrio vulnificus*, *Candida tropicalis*, *Legionella pneumophila* 등의 일부 역학적 연구에 시도된 바 있으며 [10-13], 국내에서는 주로 우리 연구진에서 연구해 왔다[14, 15].

이에 본 연구자는 ESBL의 유전자형 분석을 포함한 분자역학적 연구를 시행하였으며, 병원균 형별에 PFGE와 IRS-PCR 방법의 적용을 최적화 하였다. 또한 기존 IRS-PCR방법대로 시행한 경우 보다 더 높은 재현성과 검출률을 얻기 위하여 adaptor, primer 등을 갱신하였고 성적면에서 개선을 할 수 있음을 병원감염에 중요한 *E. coli*를 대상으로 하여 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상 균주

2009년 3월부터 6개월간 대전성모병원에서 *E. coli*에 의한 혈류감염 환자들을 대상으로 분리 동정된 ESBL생성 *E. coli*를 전향적으로 수집하였고, 2008년 9월부터 2009년 2월까지 동일 병원에서 분리 수집된 ESBL생성 *E. coli* 균주를 포함하여 연구하였다.

### 2. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

균주를 LB에 접종하여 37°C로 24시간 배양하였고. OD값을 (absorbance; 610/0.3) 측정하였다. microcentrifuge tube에 1 mL씩 취하여, 14,000 rpm에서 5분 원심분리를 하였다. 그 뒤 TE buffer (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH8.0])로 2번 정도 washing을 한 후, CSB (Cell Suspension Buffer; 100 mM Tris, 100 mM EDTA [pH8.0]) 50  $\mu$ L를 취하고, proteinase 5  $\mu$ L와 pipetting을 한 뒤, 37°C에 10분간 두었다. 세균 부유액 50  $\mu$ L와 50°C에 보존한 1% agarose를 4°C에서 10

분간 굳혔다. Agarose plug를 CLB (Cell Lysis Buffer; 50 mM Tris, 50 mM EDTA [pH8.0]) 500  $\mu$ L에 넣고 54°C에서 24시간에서 반응시켰다. DNA Plug은 *Xba*I (Biolad; Ro145S) 으로 37°C에서 2-4시간 처리하였고, CHEF-DR III system (BioRad Lab., Hercules, CA, USA)을 이용하여 swithching time을 시작 1초, 끝 3초로 하고 6 V/cm의 조건으로 24시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide로 30분간 염색한 뒤 20분간 탈색하고 자외선 조영하에서 Gel Doc로 촬영하였다. 분석은 Fingerprinting II informatix 3.0 software (BioRad Lab, Hercules, CA, USA)를 이용하여 UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) 법으로 군집 분석하여 유전적 연관성을 결정하였다.

### 3. IRS-PCR (Infrequent-Restriction-Site) PCR

DNA 분리는 QIAamp DNA Kit (QIAGEN, USA)를 사용하였다. adaptor는 *Hha*I adaptor (AH1 & AH2 또는 AH1 & AH2\_new)와 *Xba*I adaptor인 (AX1 & AX2 또는 AX1 & AX2\_new)를 사용하였다 (Table 1). adaptor는 각 oligonucleotide조합을 균등하여 AH와 AX각각을 10  $\mu$ L씩 같은 molar 농도로 혼합하여 80°C에서 4°C로 냉각시켜 만든 후, -20°C로 보관하였다.

기존 논문에 사용된 adaptor의 Tm값과 이번 연구에 새로 변형한 adaptor의 Tm값을 Fast PCR을 이용하여 비교하였다. 이번 연구에서는 새로 변형한 adaptor의 안정성을 높이고, PCR과정의 선택성을 높이기 위하여 oligonucleotide는 GC %가 50-60% 이상으로 하여 Tm값이 상향 조정된 oligonucleotide를 새로 설계 하였고, Fast PCR을 이용하여 PCR quality를 높였다.

추출된 DNA 5  $\mu$ L를 *Hha*I (Boehringer Mannheim, Germany) 10 unites 및 *Xba*I (Boehringer Mannheim, Germany) 12 units의 용량으로 37°C에서 16시간 동안 처리하였다. 그 후 잘라진 DNA 5  $\mu$ L, *Hha*I adaptor (AH1 & AH2 또는 AH1 & AH2\_new) 20 pmol, *Xba*I adaptor (AX1 & AX2 또는 AX1 & AX2\_new) 20 pmol, DNA 희석 buffer (5X) 2  $\mu$ L를 혼합하여 ligation Kit (Rapid DNA ligation Kit, Boehringer Mannheim)를 사용하여 ligation하였다. 이렇게 준비된 혼합물을 중합효소연쇄반응으로 증폭하였다.

혼합물은 template DNA 2  $\mu$ L, 10X PCR buffer 10  $\mu$ L, dNTP mixture (2.5 mM each) 2  $\mu$ L, PX primer 50 pmol, AH1 primer 50 pmol,

**Table 1.** Adaptors and Primers used in the Infrequent-Restriction-Site Polymerase Chain Reaction

Designation	Sequence
AH1 ..... 5'-AGA ACT GAC CTC GAC TCG CAC G-3'	Handley SA, et al., 2002
AH2 ..... 5'-TGC GAG T-3'	Handley SA, et al., 2002
AH2_new <sup>a</sup> ..... 5'-CTG GAG CTG AGC GT-3'	This study
AX1 ..... 5'-P04-CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3'	Handley SA, et al., 2002
AX2 ..... 5'-GCC AGT A-3'	Handley SA, et al., 2002
AX2_new <sup>a</sup> ..... 5'-AT GAC CGT CTG-3'	This study
PX ..... 5'-AGA GTC TGC CAG TAC TAG A-3'	Handley SA, et al., 2002
PX-G ..... 5'-AGA GTC TGC CAG TAC TAG AG-3'	Handley SA, et al., 2002

<sup>a</sup>Newly designed for this study.

Taq DNA polymerase diluent 5  $\mu$ L로 구성하여 PCR 반응액을 만들었다.

증폭반응은 초기 denaturation 단계는 95°C에서 15분간 시행하고, denaturation 94°C 1분, annealing 58°C 1분, extension 72°C 2분으로, 25회 시행한 후 마지막 extension은 72°C 10분으로 하였다. PCR 산물은 6.5% polyacrylamide gel에서 170 V로 1시간 동안 실시하고, 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide로 염색하여 UV광조영으로 사진을 촬영하였고, 결과는 군집분석을 통해 dendrogram을 작성하여 비교하였다.

## 결과

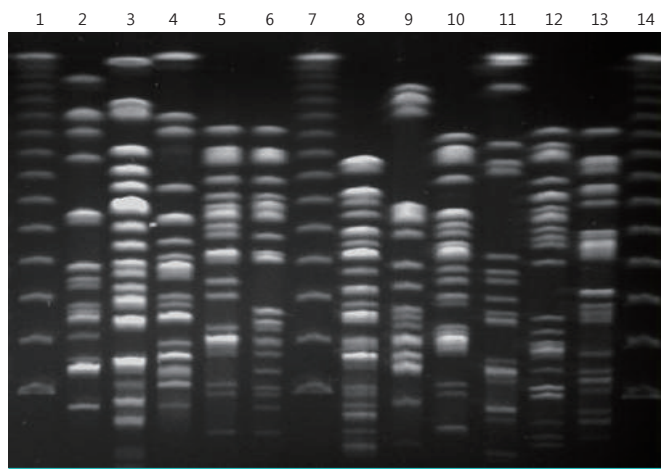
### 1. 항생제 감수성 결과

총 51개 균주 감수성 결과 aztreonam는 88.2% (45/51), ceftazidime는 62.7% (32/51), amikacin는 26.6% (4/51)의 내성이 있는 것으로 분석되었다. 나머지 ampicillin-sulbactam, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanate, tobramycin, trimethoprim-sulfamethoxazole 에서는 내성이 보이지 않았다. 또한 각 항생제 내성 패턴들을 PFGE 및 IRS-PCR 그룹들과 비교하였으나, 연관성을 찾기 어려웠다.

### 2. IRS-PCR 방법의 개선

Mazurek 등과 Handley 등이 사용한 adaptor의 Tm값을 확인해 본 결과 AH2의 경우 20.6°C, AX2의 경우 14.3°C로 측정 되었다[8, 16]. Tm의 값이 낮으면 adaptor의 결합이 불안정하여 PCR 결과의 재현성이 매우 불안정하였다(Fig. 2A, 2B, 2C).

실험의 재현성이 확보하기 위해 Tm값을 높여 가며, 여러 번 반복

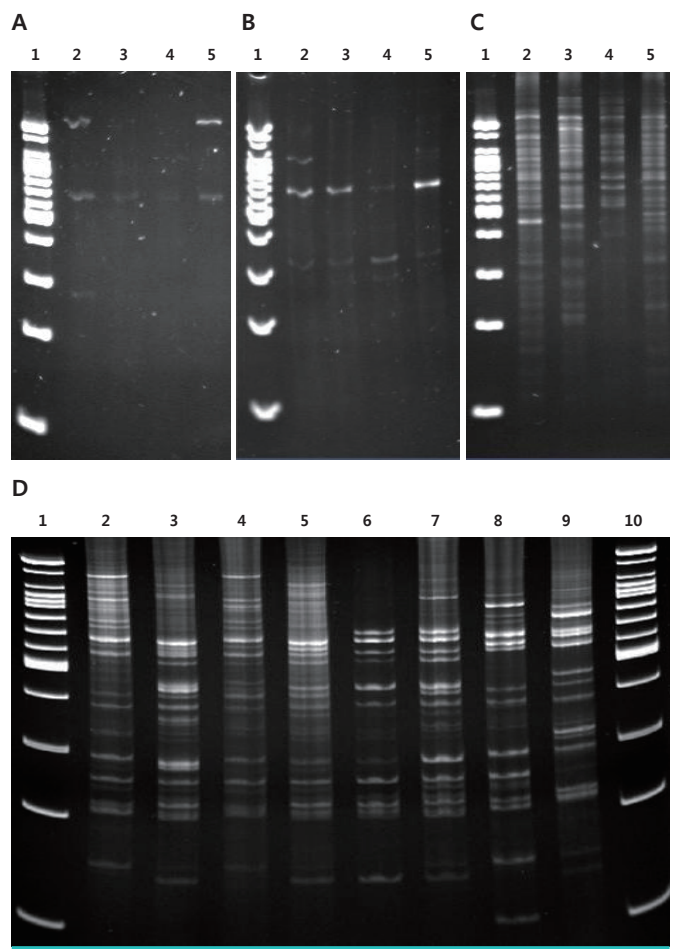


**Figure 1.** Representative Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) images of ESBL *Escherichia coli* isolates. Lanes 3 to 6 and 8 to 11 were BL430, BL435, BL440, BL441, BL442, BL443, BL446, BL447, BL448, BL450, and BL451, respectively. Markers were in lanes 1, 7 and 14 (50-1,000kb ladders).

을 하였다. 그래서 adaptor의 안정성을 좀 더 높이기 위하여 oligonucleotides의 GC%를 50-60% 이상으로 하고, Tm값을 각각 51.4°C와 37.4°C로 상향되도록 새로 설계하였고, 이들을 AH2\_new, AX2\_new라고 명명하였다.

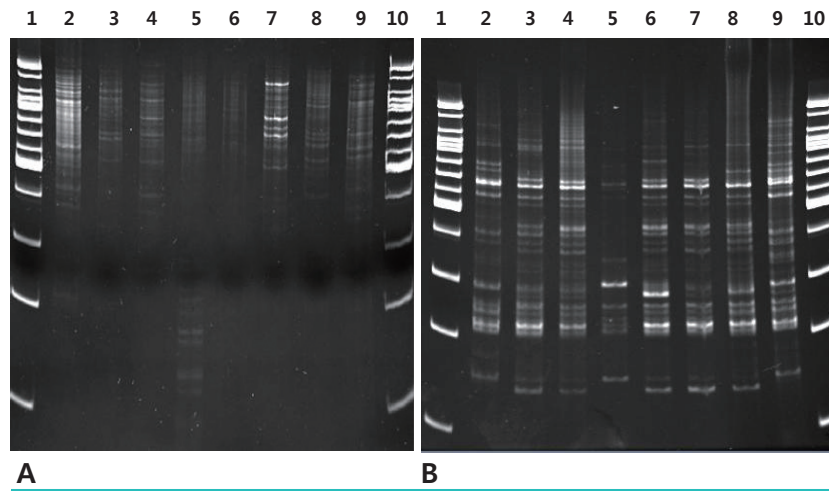
Tm값을 높여 새롭게 설계한 adaptor로 IRS-PCR을 실시한 결과, PCR의 증폭 산물이 안정적으로 증폭되었다(Fig. 2D).

또한 adaptor상의 문제뿐만 아니라, ligation 온도의 차이를 검토하였는데, 다른 반응온도 조건으로 IRS-PCR을 실시하였다. 실온의 조건에서는 반응이 잘 이루어지지 않았으나(Fig. 3A), 16°C에서 ligation을 실시하였을 때 더욱 PCR 결과가 안정되었다(Fig. 3B).

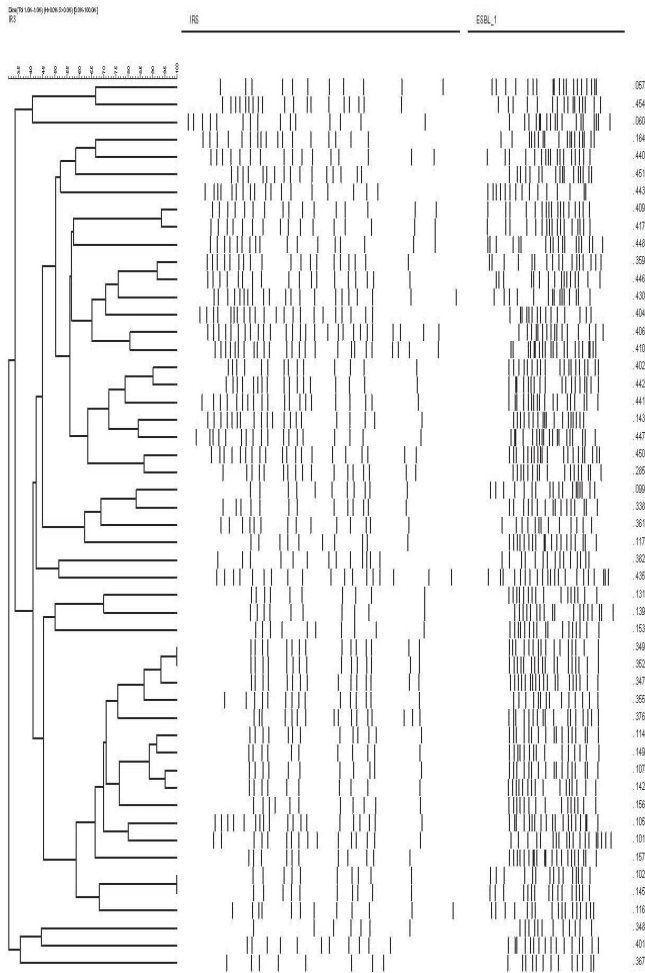


**Figure 2.** Electrophoretic results of IRS-PCR amplification of restricted-ligated *XbaI-HhaI* fragments from ESBL strains. (A) Lane 1 was 100-bp ladder. Lanes 2 through 5 were isolates of BL99, BL101, BL102 and BL105, respectively. Clinically isolated strains used adaptors (AH1 and AX2) and primer PX-G. Tm; 20.6°C, 14.3°C. (B) Lane 1 was 100-bp ladder. Lanes 2 through 5 were isolates of BL99, BL101, BL102 and BL105, respectively. Clinically isolated strains used adaptors (AH1 and AH2) and primer PX-G. Tm; 32.6°C, 27.3°C. (C) Lane 1 was 100-bp ladder. Lanes 2 through 5 were isolates of BL99, BL101, BL102, and BL105, respectively. Clinically isolated strains used adaptors (AH1\_new and AH2\_new) and primer PX-G. Tm; 51.4°C, 37.4°C. (D) Representative IRS-PCR electrophoresis patterns of eight ESBL *E. coli* isolates. Lanes 2 through 9 were BL99, BL101, BL102, BL105, BL107, BL114, BL116 and BL117, respectively. Lanes 1 and 10 were 100bp ladders. The IRS-PCR annealing temperature was 58°C, and the primers were PX-G, AH2\_new and AX2\_new.





**Figure 3.** IRS-PCR electrophoretic patterns of ESBL *E. coli* produced by amplification of restricted-ligated *XbaI-HhaI* fragments. (A) Lane 1 and 10 were 100bp ladders. Lanes 2 through 9 were isolates BL99, BL101, BL102, BL105, BL107, BL114, BL116 and BL117, respectively. Clinically isolated strains used adaptors (AH2\_new and AX2\_new) and primer PX-G. Room temperature ligation performed at 20-25°C. (B) Lane 1 and 10 were 100bp ladders. Lanes 2 through 9 were isolates BL99, BL101, BL102, BL105, BL107, BL114, BL116 and BL117, respectively. Clinically isolated strains used adaptors (AH2\_new and AX2\_new) and primer PX-G. Room temperature ligation performed at -16°C.



**Figure 4.** Dendrogram resulting from cluster analysis of *E. coli* using IRS-PCR and PFGE.

### 3. PFGE, IRS-PCR 결과와의 비교

*E. coli*의 PFGE와 IRS-PCR의 결과는 Fig. 1, 2(D)에 도시되었으며, dendrogram을 통한 군집분석 결과는 Fig. 4과 같았다. 전반적으로 PFGE와 IRS-PCR에 의한 형별은 변별력면에서 거의 일치하였다.

Table 2에서 도시된 바와 같이, PFGE에서 27 형으로 분류된 strain BL131, BL139은 IRS-PCR에서는 각각 27, 28 형으로 다른 형별로 분류되었다. 이들은 band수 2개의 차이를 보이고 있었다. PFGE는 형별상 31 형으로 분류된 BL107과 BL142는 IRS-PCR에서 32, 33 형으로 다른 것으로 나왔던 반면, strain BL114처럼 PFGE에서 32 형으로 분류된 균주는 IRS-PCR에서는 32로, PFGE 형별 31인 strain BL107과 동일한 것으로 나와, 양 방법의 결과에 차이를 보였다. strain BL149, BL156, BL105도 PFGE와 IRS-PCR결과에 유사한 차이를 보였다.

최종적으로, PFGE에서는 51균주 중 39가지 형별이 구별되어 76.4%의 변별력을 보인 반면, IRS-PCR은 80.3% (41/51)로 유의한 차이는 없었다( $Z=0.481$ ,  $P=0.3151$ ).

### 고찰

IRS-PCR 분석법이 기존 PCR typing과 다른 점으로는 infrequent 및 frequent cutter 두 가지의 제한 효소를 함께 사용하고, 각 효소에 해당하는 adaptor와 linker를 primer와 함께 사용하여 필요한 부위만을 선택적으로 증폭할 수 있다는 점이다. 이때 adaptor는 *HhaI* adaptor (AH)와 *XbaI* adaptor (AX)가 있고, 각각의 구성은 AH1, AH2, AX1, AX2이다. primer PX는 AX1에 상보적으로 3'-end에 하나의 염기가 붙어 PX-A, PX-T, PX-C, PX-G를 만들게 되고, 이는 primer의 결합을 낮추게 하여, primer가 특정부위만을 증폭하여 짧은 시간 안에 필요한 부

**Table 2.** Results of PFGE and IRS-PCR Performed on 51 Clinical Isolates of *E. coli*

Strain	Specimen	PFGE	IRS_PCR
BL 057	sputum	1	1
BL 454	wound	2	2
BL 060	urine	3	3
BL 164	urine	4	4
BL 440	sputum	5	5
BL 451	urine	6	6
BL 443	close pus	7	7
BL 409	bile	8	8
BL 417	urine	8	8
BL 448	bile urine	9	9
BL 359	urine	10	10
BL 446	blood	11	11
BL 430	urine	12	12
BL 404	urine	13	13
BL 406	urine	14	14
BL 410	urine	15	15
BL 402	blood	16	16
BL 442	urine	16	16
BL 441	urine	17	17
BL 143	sore	18	18
BL 447	blood	19	19
BL 450	blood	20	20
BL 285	sputum	20.1	20.1
BL 099	sputum	21	21
BL 338	urine	22	22
BL 361	DM foot wound	23	23
BL 117	sore	24	24
BL 382	urine	25	25
BL 435	urine	26	26
BL 131	sputum	27	27
BL 139	urine	27	28
BL 153	urine	27.1	27
BL 349	urine	28	29
BL 352	sputum	28	29
BL 347	sputum	28	29
BL 355	sputum	29	30
BL 376	urine	30	31
BL 107	urine	31	32
BL 142	sputum	31	33
BL 114	sore	32	32
BL 149	sputum	31	33
BL 156	sputum	31	33
BL 105	bile	32	34
BL 101	sputum	33	35
BL 157	sputum	34	36
BL 102	sputum	35	37
BL 145	sputum	35	37
BL 116	blood	36	38
BL 348	urine	37	39
BL 401	urine	38	40

위를 효과적으로 증폭할 수 있다.

PFGE 분석법과 비교하였을 때, IRS-PCR의 큰 장점은 우선, 일반적인 PCR을 수행할 수 있는 검사실이라면 기술적인 어려움 없이 신속하게 사용 할 수 있다는 것이다. 실험소요 시간이 2-3일이었던 PFGE 분석법과는 달리 DNA의 유무에 따라 실험시간이 1일정도 단축된다.

또한 실험자 의도에 따라 실험을 계획하고 변화시킬 수 있으며, 분석할 DNA염기서열에 대한 정보가 없다고 하여도 사용된 adaptor의 DNA 염기서열에 따라 primer를 제작하여 분석 할 수 있다[9, 16].

이런 이유로, 본 연구자는 보다 능률적인 대안일 것이라 기대 하에 분자 수준의 역학적 형별(molecular epidemiologic typing)을 시행하는데 있어서 분자생물학적 기법 중 PFGE 분석법과 IRS-PCR을 비교 분석하였다. 그러나 과거의 방법을 바탕으로 실험을 해본 결과 몇 가지 문제점을 발견 할 수 있었다.

기존 실험 방법에 사용된 adaptor의 Tm값이 낮아 adaptor의 결합이 불안정하여 PCR 결과 재현성이 매우 불안정 하였다. 재현성을 확보하기 위해 Fast PCR을 이용하여 Tm값을 높여 가며, 여러 번 반복하여 실험을 하였다. Tm값을 높여 새롭게 설계한 adaptor로 IRS-PCR을 실시한 결과, PCR의 증폭산물이 안정적으로 증폭되었다. 또한 adaptor상 문제를 제외한 나머지 부분에서 검토를 한 결과, ligation의 온도 차이에서 문제점이 있었다. 이를 보완 하기 위하여 다른 반응온도 조건으로 IRS-PCR을 실시 하였다. 실온의 조건으로 ligation을 해보았지만, 반응이 잘 이루어지지 않았으며, 16℃에서 ligation을 실시하였을 때 더욱 PCR 결과가 안정되었다. 방법론적으로 새로 IRS-PCR 개선한 방법이 기존 방법론 보다 재현성면에서는 더 나았다.

*E. coli*를 이용하여 분석한 결과, 각 실험에 소요된 시간을 살펴보면 PFGE는 2-3일이 걸렸으며, IRS-PCR은 1일이면 가능하였다.

실험 결과 51개의 균주를 이용하여 병원균인 *E. coli*의 형별 분석을 위해 PFGE분석법과 IRS-PCR분석법으로 적용하였다.

*E. coli*는 PFGE분석결과에서는 51개 균주 중 39 형의 형별 구별이 가능하여 76.4%의 변별력을 보였고, IRS-PCR 분석법은 41 형으로 80.3%의 변별력을 보였다. 이 중에서 PFGE 분석결과보다는 IRS-PCR분석결과에서 형별 구별을 2가지 더 할 수 있었지만, 유의한 차이는 아니었다. PFGE에서 같은 형별로 분석된 BL139, BL107, BL105 균주는 IRS-PCR 분석법에서는 다른 형별로 추정되는데, 이는 infrequent cutter로 작용하는 제한효소가 특정 부위를 잘라서 adaptor와 linker를 primer와 함께 필요한 부위를 선택적으로 증폭시키기 때문에 PFGE보다 좀 더 특이적일 가능성이 있다.

PFGE 분석 결과 BL131, BL139 균주에서 확인된 27 형의 경우, PFGE 분석과는 달리 IRS-PCR 분석 결과에서는 BL139 균주에서 28 형을 확인하였으며, BL107, BL142, BL149 및 BL156 균주의 PFGE 분석결과에서 확인된 31 형과는 달리 IRS 분석결과에서는 4가지 균주 중 BL107 균주에서만 32 형을 확인하였고, 나머지 균주에서는 33 형을 확인하였다. 또한, BL114와 BL105 균주에서 확인하였던 32 형이 PFGE 분석과는 다르게 IRS 분석 결과 BL105 균주에서 34 형이 상이하게 나타났다(Table 2).

또한 항생제 감수성 결과 총 51균주에 내성 패턴형은 6개의 형으로 구분되며, 11.8%의 변별력을 나타내었다. 각 항생제 내성 패턴들

을 PFGE 및 IRS-PCR 그룹들과 비교하였으나, 연관성을 찾기 어려웠다 (Table 2).

본 연구자의 실험에서 dendrogram 분석결과 IRS-PCR 분석결과와는 변별력 면에서 PFGE 보다 대상균주의 역학적 특성과 검체 수의 차이에 의한 우연한 변이라고 판단된다. 위 두 가지 분석법은 동일한 제한효소를 이용한다는 점에서 일치하는 부분이 있다. PFGE 분석법은 DNA를 전기영동 하였을 때, 각 균주의 DNA를 gel pore size에 따라 DNA size 별로 나열된다는 것이다. 반면 IRS-PCR 분석법의 경우 DNA의 특정 부위를 제한효소를 통해 절단하고 그 부위를 선택적으로 primer를 사용하여 필요한 부위만을 증폭하기 때문에 PFGE 분석법과는 다르게 좀 더 다양한 size의 DNA를 검출할 수 있다는데 분석력의 의의를 두고 있다. 본 연구자의 실험에서 유전형 분석 시에 Mazurek et al. 과 Handley et al. 의 보고와 동일하게 PX-G 만으로도 *E. coli*의 유전형 분석을 하여 충분한 결과를 얻을 수 있었기에 A, T, C로 세분화되어 실험을 연장하지 않았다[9, 16].

IRS-PCR은 재현성 뿐 만 아니라 변별력이 PFGE에 필적할 만큼 높아, 분자역학적 형별 분석 검사에 있어, 좋은 대안으로서 연구를 시행할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, adaptor와 primer를 미리 만들어 냉동 보관해 두면, 검체 검사과정에서 하루 내에 이루어 질 수 있는 신속성과 편리성이 있어, 다른 분자적 역학 방법에 비해 이점이 있다고 생각한다. 그러나 IRS-PCR 실험진행에 있어서 adaptor와 primer를 제작하는 과정 중 실험 조건과 실험실내의 일정한 온도 유지가 가장 중요하리라 생각한다.

이와 같이 본 연구진은 IRS-PCR의 방법과 틀을 새로 설계하고 개선하여 시행함으로써 재현성과 검출률을 보다 향상시키는 성과를 얻었으며, 또한 ESBL생성 *E. coli*의 병원내 전파 및 지역사회로부터의 유입 차단을 위한 적절한 감염관리방안을 위하여 분자 역학이 필요하다고 사료된다.

## References

- Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, Kim EC. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1481-91.
- Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC, Jung HI, Sohn ES, Jeong SH, Lee KJ. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type beta-lactamase genes among clinical isolates of enterobacter species in Korea. *J Clin Microbiol* 2003;41:2477-82.
- Pai H, Lee HJ, Choi EH, Kim J, Jacoby GA. Evolution of TEM-related extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3651-3.
- Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, Choe KW. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol* 1999;37:1758-63.
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74.
- Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 (Suppl 1):33-41.
- Shin WS. Molecular epidemiologic typing Boonja yeokhakjeok hyungbyul. *Korean J Infect Dis* 1995;27:585-94.
- Mazurek GH, Hartman S, Zhang Y, Brown BA, Hector JS, Murphy D, Wallace RJ Jr. Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex: a potential epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 1993; 31:390-4.
- Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol* 1996;34:2386-90.
- Yoo JH. Application of molecular epidemiologic typing to the control of nosocomial infection. *Korean J Nosocomial Infect Control* 1997;2:61-71.
- Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, Soboh S, Colodner R, Cameron DN, Wykstra DL, Swerdlow DL, Farmer JJ 3rd. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Israel Vibrio Study Group. Lancet* 1999;354:1421-4.
- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997;24: 1122-8.
- Zhang J, Hollis RJ, Pfaller MA. Variations in DNA subtype and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;27:63-7.
- Kim SI, Yoo JH, Cho YK, Lee DG, Wie SH, Choi JH, Kim YR, Shin WS, Kang MW. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism, and infrequent restriction site-polymerase chain reaction for molecular typing of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Korean J Infect Dis* 1999;31:474-80.
- Yoo JH, Choi JH, Shin WS, Huh DH, Cho YK, Kim KM, Kim MY, Kang MW. Application of infrequent-restriction-site PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3108-12.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5.