

혈액에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 Coagulase 유전자의 다형성과 독소 유전자에 의한 유전형 분석

김용균 · 김재석 · 김한성 · 송원근 · 조현찬 · 이규만

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실

Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood on the Basis of Coagulase Gene Polymorphism and Toxin Genes

Yong-Kyun Kim, M.D., Jae-Seok Kim, M.D., Han-Sung Kim, M.D., Wonkeun Song, M.D., Hyoun Chan Cho, M.D.,
and Kyu Man Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Coagulase is produced by all strains of *Staphylococcus aureus*. The 3' coding region of the coagulase (*coa*) gene contains varying numbers of 81 bp tandem repeats. *S. aureus* produces a variety of extracellular protein toxins. Here, we typed *S. aureus* strains isolated from blood by *coa* gene restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns and toxin gene profiles.

Methods : A total of 120 strains of *S. aureus* were isolated from blood cultures during 2003-2006 at Kangdong Sacred Heart Hospital. The isolates were typed by PCR RFLP analysis of the *coa* gene and by multiplex PCR for detection of genes encoding enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*), toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*), exfoliative toxins (*eta* and *etb*), *mecA* and *femA*.

Results : All the *S. aureus* strains were classified into 16 types on the basis of *coa* gene RFLP and could be further differentiated into 34 types according to the combined patterns of *coa* gene RFLP and toxin gene profiles. Of 85 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, 43 (50.6%) and 36 (42.4%) belonged to the RFLP pattern L5 and pattern L1, respectively. MRSA strains belonging to pattern L5 frequently carried *tst* (93.0%) or *sec* gene (81.4%), and strains belonging to pattern L1 frequently carried *sea* (88.9%) or *see* gene (44.4%). The rate of the pattern L5 in MRSA strains increased over the past few years and was higher in intensive care unit than in other wards.

Conclusions : We typed *S. aureus* strains isolated from blood on the basis of *coa* gene RFLP and toxin genes. The strains belonging to *coa* gene RFLP pattern L5 and L1 appeared to be the major types of MRSA isolated from bacteremia and revealed specific toxin gene profiles according to the *coa* gene RFLP patterns. (*Korean J Lab Med* 2008;28:286-92)

Key Words : *Staphylococcus aureus*, Coagulase, Restriction fragment length polymorphism, Enterotoxins, Methicillin resistance

접 수 : 2008년 1월 14일

접수번호 : KJLM2107

수정본접수 : 2008년 5월 9일

게재승인일 : 2008년 5월 27일

교신저자 : 김 재 석

우 134-701 서울시 강동구 길1동 445

강동성심병원 진단검사의학과

전화 : 02-2224-2327, Fax : 02-2224-2214

E-mail : jaeseok@hallym.or.kr

서 론

*Staphylococcus aureus*는 병원감염과 지역사회 획득감염의 주요 병원균으로 다양한 질환을 일으킨다. 메티실린 내성 균주의 출현 이후 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)에

의한 병원감염은 전 세계적으로 중요한 문제가 되었으며, 국내 전국 의료기관에서 분리된 *S. aureus* 중 MRSA는 68.8%로 보고된 바 있다[1]. *S. aureus*에 의한 균혈증의 경우 그 원인의 삼분의 이가 병원감염과 관련 있는 것으로 알려져 있으며[2], 이러한 병원감염을 차단하고 예방하기 위하여 검출되는 균주들에 대한 역학적 분석이 요구된다.

S. aureus 균주의 역학적 분석을 위한 기법으로는 항균제 내성양상, 혈청형, 리보타이핑, 파지타이핑, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 및 PCR에 기반한 방법 등이 사용된다. PCR에 기반한 방법은 16S에서부터 23S까지의 rRNA inter-genic spacer region, coagulase 유전자 및 protein A 유전자 등을 이용한다[2].

Coagulase는 모든 *S. aureus* 균주에서 생산되는 세포외 단백질로 검사실에서 *S. aureus*를 동정하는데 있어 중요한 기준으로 사용되고 있다[3]. Coagulase는 사람 프로트롬빈을 활성화시켜 혈전을 생성하는데, 그 병독성에 대해서는 논란이 있다[4]. Coagulase를 암호화하는 유전자의 3' 염기 말단부위에는 81 bp의 반복되는 일련의 염기서열들이 존재하는데, 균주에 따라 그 반복되는 수와 염기서열에 차이를 보인다[5, 6]. 이러한 coagulase 유전자의 다형성에 기반하여 유전형질을 분석하기 위해 PCR 및 제한효소절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)법을 사용한 여러 보고들이 있다[7-11].

*S. aureus*는 30여 개 이상의 외독소들을 생산하며, 대표적인 외독소로는 장독소(staphylococcal enterotoxin, SE), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 및 표피박리독소(exfoliative toxin, ET) 등이 있다[12]. SE는 다섯 개의 주요 항원형(SEA, SEB, SEC, SED 및 SEE)을 포함하여 최근까지 19개의 항원형이 알려져 있으며[13], TSST-1는 1개의 혈청형이 알려져 있다. ET는 사람에게서 staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS)의 원인이 되며, 생물학적 활성도는 같지만 그 항원형에서 ETA와 ETB로 분류된다[14]. 이러한 독소의 검출을 위한 DNA-DNA 교잡법이나 다상중합효소연쇄반응(multiplex PCR)과 같은 분자유전학적 방법들은 통상적인 면역학적 방법의 검사보다 빠르고 민감하며, 독소 생성능의 발현과 상관없이 균주의 유전정보를 제공하는 장점을 가진다[15, 16].

본 연구에서는 2003년부터 2006년까지 일개 3차병원 입원 환자의 혈액에서 분리된 *S. aureus* 균주들을 대상으로 coagulase 유전자 3' 말단의 다형성 부위를 PCR RFLP법으로 분석하고, 독소 유전자 및 *mecA* 유전자를 다상중합효소연쇄반응법으로 검출하여, 그 유전형 양상을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 균주수집과 검체정보

2003년 1월부터 2006년 12월까지 한림의대 강동성심병원의 검사실에 의뢰된 혈액배양검체 중 동일 환자에서 2번 이상 분리되어 균혈증의 원인으로 의심되는 *S. aureus* 120주를 대상으로 하였다. 균주의 동정은 coagulase, DNase 및 mannitol salt agar 검사와 Microscan WalkAway 96 (Dade Behring Inc., West Sacramento, CA, USA)을 사용하였으며, 항균제 내성 검사는 Microscan WalkAway 96 (Dade Behring Inc.)을 사용하였다. 분리된 균주는 탈지분유 혼탁액에 넣어 -70°C에 보관하였다.

검체가 의뢰된 환자 연령의 중앙값은 61.4세이며, 6개월에서 94세까지 다양한 연령층을 포함하였다. 환자의 성별은 남자 69명, 여자 51명이었다. 일반병동에서 70주, 중환자실에서 47주가 분리되었으며, 3주는 의뢰처가 확인되지 않았다. 연도에 따라 2003년에 21주, 2004년에 42주, 2005년에 24주, 2006년에 33주가 수집되었다.

2. DNA 추출

-70°C에 보관되었던 균주를 혈액하천배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양 후, InstaGene Matrix (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 제조사의 지침대로 DNA를 추출하였다.

3. Coagulase 유전자(*coa*) PCR RFLP

시발체는 coagulase 유전자의 3번 염기말단부위 내의 반복되는 부위들을 포함하면서 시발체 내에 다형성 부위가 포함되지 않도록 기존에 고안된 것을 사용하였으며, 염기서열은 COA-1 (ATAGAGATGCTGGTACAGG)과 COA-2 (GCTTCCGAT-TGTTTCGATGC)이다[9]. 반응액은 10× buffer 5 µL, 각각 2.5 mM의 dNTP 4 µL, 20 pmol의 각 시발체(COA-1, COA-2), 1.25 U의 *Taq* polymerase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) 및 InstaGene (Bio-rad)으로 추출한 DNA template 10 µL로 구성하여 총 50 µL를 만들었다. 반응은 Master-cycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)를 사용하여 94°C에서 45초간 전변성 후, 94°C 20초, 57°C 45초, 70°C 15초 주기로 35회 반복하였으며, 최종연장반응은 72°C에

서 10분간 실시하였다. 반응산물은 2.0% 아가로오즈겔에 넣고, 1× TAE buffer에서 100 V, 30분 동안 전기영동하여 확인하였다. 이후 반응산물 20 μ L를 *AluI* (바이오니아, 대전, 대한민국) 2 U를 사용하여 제조사의 지침대로 반응시켰다. 절단된 증폭산물은 2.5% 아가로오즈겔에 넣어 1× TAE buffer, 100 V에서 30분 동안 전기영동 후 확인하였다.

4. Multiplex PCR를 통한 독소 유전자 및 *mecA* 유전자 검출

시발체는 Mehrotra 등[17]의 방법에 따라 두 가지의 조합(set A, set B)으로 구성하였다. Set A 조합의 반응액은 10× buffer

10 μ L, 각각 2.5 mM의 dNTP 4 μ L, 0.5 mM의 $MgCl_2$ 2 μ L, 20 pmol의 각 시발체(SEA, SEB, SEC, FEMA), 40 pmol의 SED 시발체, 60 pmol의 SEE 시발체, 1.25 U의 *Taq* polymerase (Roche Diagnostics), DNA template 10 μ L로 구성하여 총 50 μ L를 만들었다. Set B 조합의 반응액은 10× buffer 5 μ L, 각각 2.5 mM의 dNTP 4 μ L, 0.5 mM의 $MgCl_2$ 1 μ L, 20 pmol의 각 시발체(TST, ETB, MECA, FEMA), 50 pmol의 ETA 시발체, 1.25 U의 *Taq* polymerase (Roche Diagnostics), InstaGene (Bio-rad)으로 DNA template 10 μ L로 구성하여 총 50 μ L를 만들었다. 반응은 Mastercycler gradient (Eppendorf AG)를 사용하여 94°C에서 5분간 전변성 후, 94°C 1분, 53°C 1분, 72°C 30초 주기로 35회 반복하고, 최종연장반응은 72°C에서 7분간 실시하였다. 반응산물은 3.0% 아가로오즈겔에 넣어 1×TAE buffer, 100 V에서 35분 동안 전기영동 후 확인하였다.

결 과

1. *coa* 유전자 크기의 다양성

S. aureus 120주 모두에서 *coa* 유전자가 검출되었으며, Ishino 등[10]이 정한 크기 분류기준에 따라 S, M, L, XL로 분류하였고(Fig. 1), 각각 6주(5%), 13주(10.8%), 97주(80.8%), 4주(3.3%)가 해당하였다.

2. *coa* 유전자의 PCR RFLP 유형

coa 유전자의 PCR 증폭산물을 *AluI*으로 처리한 후 전기영동하여 관찰하였다(Fig. 2). 총 16가지의 RFLP 유형이 나타났다

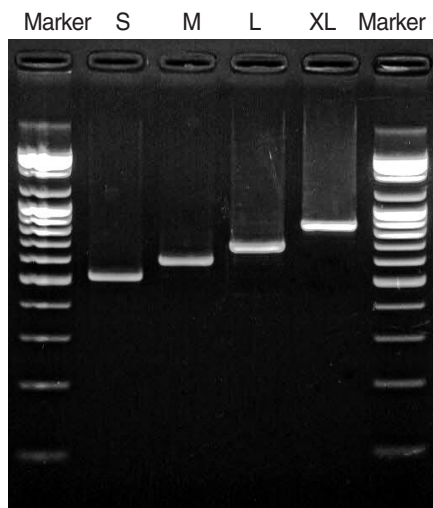


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *coa* genes from *S. aureus* strains. PCR amplification with primers COA-1 and COA-2 [9] resulted in single fragment bands of four different sizes: S, M, L, and XL. Marker Lanes contain molecular size standard (100 bp ladder).

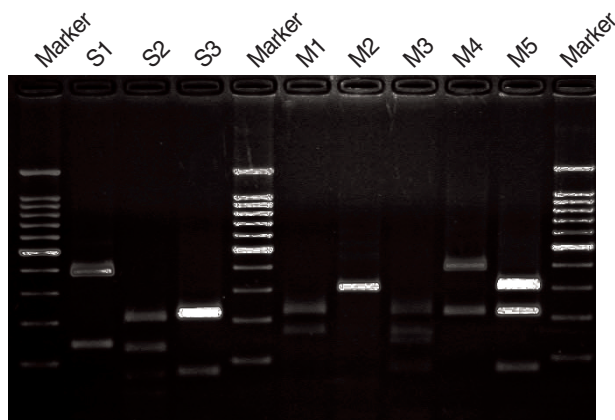
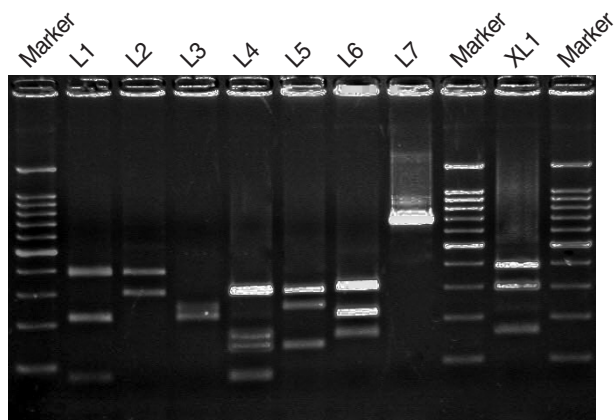


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *coa* genes digested with the restriction endonuclease *AluI* from representative strains of *S. aureus*. Marker Lanes contain molecular size standard (100 bp ladder).



며, S 크기의 *coa* 유전자는 3가지(유형 S1-S3), M 크기는 5가지(유형 M1-M5), L 크기는 7가지(유형 L1-L7), XL 크기의 경우 1가지(유형 XL 1)의 유형을 나타내었다. 120주 중 RFLP 유형 L1과 유형 L5에 해당하는 균주가 각각 37주(30.8%)와 46주(38.3%)로 높은 빈도를 차지하였으며, 나머지 유형들은 1주에서 8주까지 해당하였다(Table 1).

3. 독소 유전자 양상 및 *mecA* 유전자의 검출

120주 중 94주(78.3%)에서 하나 이상의 독소 유전자를 갖고

있었으며, *sea*는 49주(40.8%), *sec*는 40주(33.3%), *see*는 24주(20.0%), *tst*는 47주(39.2%)에서 검출되었다. *seb*, *sed*, *eta* 또는 *etb*가 검출된 균주는 없었다. *femA*는 120주 모두에서 검출되었으며, *mecA*는 85주(70.8%)에서 검출되었다.

4. 메티실린 내성에 따른 RFLP 유형과 독소 유전자 양상

Microscan WalkAway 96 (Dade Behring Inc.)의 항균제 내성검사서에서 MRSA는 전체 120주 중 85주(70.8%)였으며, 모두 *mecA* 유전자가 검출되었다. MRSA 85주는 RFLP 유형 S1,

Table 1. A number of 120 *S. aureus* blood isolates according to RFLP patterns, staphylococcal toxic genes, *mecA* gene, and methicillin resistance

| PCR-amplified <i>coa</i> gene size* | RFLP pattern† | N | Toxin gene | <i>mecA</i> gene | MRSA (N=85) | MSSA (N=35) |
|--|------------------|----|----------------------|------------------|-------------|-------------|
| S (N=6) | S1 | 1 | <i>sec, tst</i> | + | 1 | |
| | S2 | 1 | - | + | 1 | |
| | | | <i>tst</i> | - | | 1 |
| | S3 | 4 | <i>sea, tst</i> | - | | 2 |
| | | | <i>sea, see, tst</i> | - | | 1 |
| M (N=13) | M1 | 1 | - | - | | 1 |
| | M2 | 1 | - | - | | 1 |
| | M3 | 1 | - | - | | 1 |
| | M4 | 2 | - | - | | 2 |
| | | | - | - | | 1 |
| | M5 | 8 | <i>sea</i> | - | | 3 |
| | | | <i>see</i> | - | | 1 |
| L (N=97) | | | <i>sea, see</i> | - | | 3 |
| | L1 | 37 | - | - | | 1 |
| | | | - | + | 4 | |
| | | | <i>sea</i> | + | 16 | |
| | | | <i>sea, see</i> | + | 16 | |
| | L2 | 3 | - | + | 2 | |
| | | | <i>sec, tst</i> | + | 1 | |
| | L3 | 3 | <i>sea</i> | - | | 1 |
| | | | <i>sea, see</i> | - | | 2 |
| | L4 | 1 | <i>sec, tst</i> | + | 1 | |
| | L5 | 46 | - | - | | 1 |
| | | | <i>sea</i> | - | | 1 |
| | | | <i>sea, see</i> | - | | 1 |
| | | | - | + | 2 | |
| | | | <i>tst</i> | + | 6 | |
| | | | <i>sea, sec</i> | + | 1 | |
| | | | <i>sec, tst</i> | + | 32 | |
| | | | <i>sea, sec, tst</i> | + | 2 | |
| XL (N=4) | L6 | 4 | - | - | | 4 |
| | L7 | 3 | - | - | | 1 |
| | | | <i>sec</i> | - | | 2 |
| XL (N=4) | XL 1 | 4 | - | - | | 4 |

*, The categorization of size of *coa* gene is based on the size reported by Ishino et al.[10]; †, The *coa* gene RFLP patterns are arbitrarily categorized in this study.

Abbreviations: RFLP, restriction fragment length polymorphism; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*.

S2, L1, L2, L4, L5를 나타냈으며, 각각 1주(1.2%), 1주(1.2%), 36주(42.4%), 3주(3.5%), 1주(1.2%), 43주(50.6%)였다(Table 1). MRSA 85주 중 76주(89.4%)에서 하나 이상의 독소 유전자를 갖고 있었으며, *sea*, *sec*, *see*, *tst*가 각각 35주(41.2%), 38주(44.7%), 16주(18.8%), 43주(50.6%)에서 검출되었다. MRSA 중 주요 유형인 L1과 L5에서 각각 특정 독소 유전자의 빈도가 높았는데, 유형 L1의 36주 중 32주(88.9%)에서 *sea*를 갖고 있었으며, 이 중 16주(44.4%)에서는 *sea*와 동시에 *see*를 갖고 있었다. 유형 L5의 43주에서는 40주(93.0%)에서 *tst*를 갖고 있었으며, 이 중 34주(79.1%)에서 *tst*와 동시에 *sec*를 갖고 있었다.

Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 35주는 RFLP 유형 S3, M1, M2, M3, M4, M5, L1, L3, L5, L6, L7, XL1를 나타냈으며, 메티실린 내성균주에 비해 상대적으로 다양한 분포를 보였다(Table 1). MSSA 35주 중 18주(51.4%)에서 하나 이상의 독소 유전자가 검출되어 MRSA에 비해 낮은 빈도를 나타냈으며, *sea*, *sec*, *see*, *tst*가 각각 14주(40.0%), 2주(5.7%), 8주(22.9%), 14주(40.0%)에서 검출되었다.

MRSA와 MSSA가 동시에 나타난 RFLP 유형은 L1과 L5였으며, 나머지 유형에서는 유형에 따라 균주들의 메티실린 내성이 구분되었다. RFLP 유형 L1과 L5 균주들은 대부분 MRSA였으며, L1의 균주 중 MRSA는 97.3%, L5의 균주 중 MRSA는 93.5%였다.

5. 수집연도에 따른 분석

수집연도에 따라 MRSA의 빈도는 2003년 57.1%, 2004년 69.0%, 2005년 79.2%, 2006년 75.8%였다. MRSA 중 가장 주요한 RFLP 유형인 L5의 균주들은 연도에 따라 MRSA에서 차지하는 빈도가 증가하는 추세를 보였다(2003년, 25.0%; 2004년, 55.2%; 2005년, 47.4%; 2006년, 60.0%).

6. 분리된 병동에 따른 양상

일반병동에서 70주, 중환자실에서 47주가 분리되었으며, 3주는 장소를 확인할 수가 없었다. 일반병동에서 분리된 70주 중 MRSA는 45주(64.3%)였으며, 주요한 RFLP 유형은 L1과 L5로서 각각 22주(48.9%), 20주(44.4%)가 해당하였다. 중환자실에서 분리된 47주 중 MRSA는 38주(80.9%)로 일반병동에 비해 빈도가 높았으며, 주요한 RFLP 유형은 L1과 L5로 각각 13주(34.2%)와 23주(60.5%)가 해당하였다.

고 찰

*S. aureus*의 *coa* 유전자의 3' 말단의 다형성에 기반하여 유전형질을 분석하는 방법으로는 PCR RFLP 방법이나 직접 염기서열 분석이 사용된다[7-11, 18, 19]. 염기서열 분석이 높은 해상도를 보이는 것으로 알려져 있으나[18, 19], 본 연구에서는 실행과정의 편리함과 해석의 용이함을 이유로 PCR RFLP 방법을 사용하였다.

PCR RFLP 방법을 사용한 기존의 보고들을 보면, 시발체의 고안과 제한효소의 선택에 따라 *coa* 유전자의 크기와 RFLP 유형에서 차이를 보이며[7, 9], 현재까지 표준화된 방법은 없다. 본 연구에서는 *coa* 유전자의 크기와 RFLP 유형이 각각 4가지와 16가지가 나타났으나, 본 연구와 동일한 방법을 사용한 Hookey 등[9]의 보고에서는 각각 4가지와 10가지, Ishino 등[10]의 보고에서는 각각 8가지와 31가지가 나타났다. 연구에 따라 RFLP 유형의 수와 종류가 다르게 나타나는 것은 대상 균주들의 수와 분리된 지역 및 역학적 배경 등의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. 본 연구에서 *coa* 유전자의 크기는 Ishino 등[10]이 보고한 크기에 따라 S, M, L, XL로 분류하였는데, RFLP 유형은 실제 데이터를 비교하는데 어려움이 있어 본 연구에서 임의로 분류하였다.

coa 유전자의 RFLP 유형에 따른 *S. aureus* 균주들의 분석은 직접 염기서열 분석이나 PFGE 방법에 비해 분별력이 낮은 것으로 보고된다[18-20]. 하지만 RFLP 유형에 따라 대부분의 메티실린 내성균주를 구분할 수 있고[11], 혈청형 분석에 비해서는 높은 분별력을 보이며, arbekacin-resistant MRSA를 구분하는데 유용하다는 보고도 있다[10]. 영국에서 분리된 MRSA를 대상으로 한 보고에서는 *coa* 유전자 RFLP 유형분석이 계통유전학적 분석, 파지타이핑의 방법과 비교하여 대등한 분별력을 나타내었다[9].

기존의 보고들에서 MRSA 균주들의 RFLP 유형의 수는 MSSA에 비해 상대적으로 적은 것으로 나타난다[7, 9, 11]. 본 연구에서도 MSSA의 균주들에서는 전체 16가지의 RFLP 유형 중 12가지가 나타났으며, MRSA의 균주들에서는 상대적으로 적은 5가지의 유형이 나타났다. 또한 MRSA 85주 중 RFLP 유형 L1과 L5가 각각 36주와 43주로 MRSA의 대부분(93.0%)을 차지하였는데, 이러한 양상은 MRSA 균주들 간의 높은 유전적 연관성과 관련 있을 것으로 생각된다[21].

본 연구에서 독소 유전자의 빈도는 *sea*, *sec*, *see*, *tst* 각각 40.8%, 33.3%, 20.0%, 39.2%였으며, *seb*, *sed*, *eta*, *etb*는 검출되지 않았다. MRSA에서의 독소 유전자의 빈도(89.4%)는

MSSA에서(51.4%) 보다 높게 나타났다. 이러한 양상은 국내에서 분리된 균주를 대상으로 보고한 것과 유사하였다[22]. 하지만 독일 지역의 혈액배양검체에서 분리된 균주에서는 *sea* (17.4%), *seb* (5.9%), *sec* (8.7%), *sed* (10.5%), *see* (0.5%), *tst* (18.3%), *eta* (0.5%), *etb* (0.0%)의 분포를 보여 상대적으로 *seb*, *sed*가 높은 빈도를 나타내고, 메티실린 내성에 따라 독소 유전자의 빈도가 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 나타나는데[23, 24], 이러한 독소 유전자의 양상의 차이는 지역에 따라 분포하는 균주들이 서로 다른 역학적, 유전적 배경을 갖고 있기 때문으로 생각된다.

본 연구에서는 *coa* 유전자의 RFLP 유형과 함께 독소 유전자의 검출을 병행하여 유전형의 양상을 파악하고자 하였다. 균주들은 *coa* 유전자의 RFLP 유형에 따라 16가지로 분류되었으며, 독소 유전자의 양상에 따라 34가지의 유형으로 세분할 수 있었다(Table 1). MRSA 85주 중 주요한 유전형의 균주는 *sec*와 *tst*를 갖고 있는 L5가 32주(37.6%), *sea*를 갖고 있는 L1이 16주(18.8%), *sea*, *see*를 갖고 있는 L1이 16주(18.8%)였다. 특히, RFLP 유형 L5는 Ishino 등[10]이 일본에서 분리된 MRSA의 77%를 차지한다고 보고한 RFLP 유형과 동일한 것으로 생각되는데, 일본의 MRSA에서도 *sec*와 *tst*의 높은 빈도가 보고된 바 있다[25].

연도에 따라 MRSA 균주 중 유형 L5 균주의 빈도는 증가하는 추세이며, 중환자실에서의 빈도가 일반 병동보다 높았다(60.5% vs 44.4%). 이러한 양상의 원인을 밝히기 위한 추가적인 연구는 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 환자의 혈액에서 분리된 *S. aureus* 균주를 대상으로 *coa* 유전자의 RFLP 유형과 독소 유전자에 따라 유전형 양상을 파악하였다. *coa* 유전자 RFLP 유형 L5 및 L1의 균주가 *S. aureus* 균혈증 환자에서 분리되는 주요 MRSA 균주로 생각되며, RFLP 유형에 따라 특정 독소 유전자 유형을 보였다.

요 약

배경 : 모든 *Staphylococcus aureus*는 coagulase를 생산한다. Coagulase 유전자(*coa*)의 3' 말단에는 81 bp의 반복되는 염기서열이 존재한다. *S. aureus*는 여러 외독소를 생산한다. 본 연구에서는 *coa* 유전자의 제한효소절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 유형과 독소 유전자의 양상에 따라 혈액에서 분리된 *S. aureus* 균주들의 유전형을 분석하였다.

방법 : 2003년부터 2006년까지 강동성심병원의 혈액배양검

체에서 수집된 *S. aureus* 120주를 대상으로 하였다. *coa* 유전자를 대상으로 PCR RFLP 분석을 시행하였으며, 장독소유전자(*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), toxic shock syndrome toxin-1 유전자(*tst*), 표피박리독소유전자(*eta*, *etb*), *mecA* 및 *femA* 유전자를 대상으로 다상중합효소연쇄반응을 시행하였다.

결과 : 모든 *S. aureus* 균주들은 *coa* 유전자의 RFLP 유형에 따라 16가지로 분류되었으며, 독소 유전자의 양상과 연관지어 34가지로 분류되었다. MRSA 85균주 중 43균주(50.6%)는 RFLP 유형 L5이었으며, 36균주(42.4%)는 유형 L1였다. 유형 L5의 MRSA 균주에서는 *tst* (93.0%)와 *sec* 유전자(81.4%)가 높은 빈도로 검출되었으며, 유형 L1의 MRSA 균주에서는 *sea* (88.9%)와 *see* 유전자(44.4%)의 빈도가 높았다. MRSA 균주 중 유형 L5 균주의 빈도는 연도에 따라 증가하는 추세이며, 중환자실에서의 빈도가 일반병동보다 높았다.

결론 : 혈액배양검체에서 분리된 *S. aureus* 균주들을 대상으로 *coa* 유전자의 RFLP 유형과 독소 유전자에 따라 유전형을 분석하였다. *coa* 유전자 RFLP 유형 L5 및 L1의 균주가 균혈증 환자에서 분리되는 주요 MRSA 균주로 생각되며, 각각 특정 독소 유전자 유형을 나타내었다.

참고문헌

- Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated in 13 Korean hospitals. Korean J Lab Med 2004;24:223-9. (김재석, 김한성, 송원근, 조현찬, 이규만, 김의중. 국내 13개 의료기관에서 수집된 *Staphylococcus aureus*의 항균제 감수성 양상. 대한진단검사의학회지 2004;24: 223-9.)
- Bannerman TL and Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, et al., eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press 2007; 392-402.
- Kloos WE and Schleifer KH. Genus *Staphylococcus* In: Sneath PHA, Mair NS, et al. eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1986:1013-35.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998;339: 520-32.
- Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. Nucleic Acids Res 1989;17:8871.
- Kawabata S, Morita T, Miyata T, Iwanaga S, Igarashi H. Isolation

- and characterization of staphylocoagulase chymotryptic fragment. Localization of the procoagulant- and prothrombin-binding domain of this protein. *J Biol Chem* 1986;261:1427-33.
7. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1992;30:1642-5.
 8. Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2186-90.
 9. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 1998;36:1083-9.
 10. Ishino T, Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K. Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 2007;45:607-9.
 11. Lawrence C, Cosseron M, Mimoz O, Brun-Buisson C, Costa Y, Samii K, et al. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:687-96.
 12. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16-34.
 13. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 2007;93:24-41.
 14. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:224-42.
 15. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:426-30.
 16. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998;36:2548-53.
 17. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000;38:1032-5.
 18. Schwarzkopf A and Karch H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J Clin Microbiol* 1994;32:2407-12.
 19. Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J Clin Microbiol* 2000;38:3453-6.
 20. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:407-15.
 21. Carles-Nurit MJ, Christophe B, Broche S, Gouby A, Bouziges N, Ramuz M. DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2092-6.
 22. Kim JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Choi MS, et al. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin gene profiles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:289-95.
 23. Schmitz FJ, MacKenzie CR, Geisel R, Wagner S, Idel H, Verhoef J, et al. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Epidemiol* 1997;13:699-708.
 24. Lehn N, Schaller E, Wagner H, Kronke M. Frequency of toxic shock syndrome toxin- and enterotoxin-producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:43-6.
 25. Nishi J, Yoshinaga M, Miyanojara H, Kawahara M, Kawabata M, Motoya T, et al. An epidemiologic survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by combined use of *mec*-HVR genotyping and toxin genotyping in a university hospital in Japan. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:506-10.