

임신부에서 분리된 B군 연구균의 중합효소연쇄반응과 염기서열분석을 통한 혈청형 분석

서울대학교 의과대학 소아과학교실, 별 소아청소년과*, 인제대학교 의과대학 일산백병원 소아청소년과†
오지은·장현오*·김남희†·이진아·최은화·이환중

Molecular Serotyping of Group B Streptococcus Isolated from the Pregnant Women by Polymerase Chain Reaction and Sequence Analysis

Chi Eun Oh, M.D., Hyun Oh Jang, M.D.*, Nam Hee Kim, M.D.†, Jina Lee, M.D.,
Eun Hwa Choi, M.D., and Hoan Jong Lee, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea, Byul Pediatrics*, Goyang, Korea
Department of Pediatrics†, Ilsan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University, Goyang, Korea†

Purpose : This study was performed to investigate the serotype distribution of group B streptococcus (GBS) isolated from pregnant Korean women using molecular methods.

Methods : The study materials included 42 GBS isolates obtained from the vagina and anorectum of pregnant women in Goyang, Korea between 2005 and 2006. Four clinical isolates with known serotypes (Ia, Ib, III, and V) were used for validation of molecular serotyping. We used serotype-specific primers for identification of the serotypes (Ia, Ib, III, V, and VI). To determine the ambiguous serotypes by serotype-specific PCR, sequence analysis of the PCR amplicons which had been amplified with GBS-common primers was used.

Results : The serotypes determined by the molecular methods agreed with the previously known 4 serotypes (Ia, Ib, III, and V). The serotypes of all 42 isolates were successfully determined by molecular methods. The distribution of the GBS serotype was as follows in order of frequency: serotype III was found in 12 isolates (28.6%), serotype V was found in 11 isolates (26.2%), serotype Ia was found in 11 isolates (26.2%), serotype VI was found in 4 isolates (9.5%), serotype Ib was found in 2 isolates (4.8%), and serotype II was found in 2 isolates (4.8%).

Conclusion : Serotypes III, V, and Ia were the most frequently identified serotypes in pregnant Korean women. Molecular serotyping is useful for surveillance of the serotype distribution of GBS in colonized pregnant women and GBS diseases of neonates. (Korean J Pediatr Infect Dis 2009;16:47-53)

Key Words : Group B streptococcus, Serotype, PCR, Sequence analysis

서 론

Group B Streptococcus (GBS)는 건강한 사람의 하부 소화

관이나 여성의 생식기에 무증상으로 집락화(asymptomatic colonization)될 수 있으나 신생아와 3개월 이하의 영아에서 패혈증과 수막염의 주요 원인균이며 주산기의 임신부 및 성인, 특히 당뇨와 같은 기저 질환을 가진 사람에게서 침습적인 감염의 원인균으로 알려져 있다¹⁾. 임신부에서 GBS 감염은 용모양막염, 산욕기 패혈증, 산후 모성 골수염, 폐렴을 일으킬 수 있으며²⁾ 임신 후반기에 생식기와 직장에 heavy colonization 된 경우 신생아의 조기(early-onset) GBS 감염의 빈도가 증가한다고 알려져 있다³⁾.

접수 : 2009년 5월 12일, 수정 : 2009년 5월 20일

승인 : 2009년 5월 24일

책임저자 : 최은화, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 031)787-7283, Fax : 031)717-7283

E-mail : eunchoi@snu.ac.kr

이 연구는 2008년 제1회 한국소아감염병학회 학술연구상의 보조로 이루어졌음.

GBS에 의한 신생아 감염병의 유병률은 임신부의 GBS 보균율과 GBS의 신생아 전파율, GBS 혈청형, 임신부와 신생아의 면역상태에 따라 달라진다. 특히 신생아의 GBS 조기 감염은 대부분 출생시 산도 내의 균을 흡인함으로써 발생하기 때문에 산모의 GBS 보균율에 따라 신생아 조기 감염의 유병률이 좌우된다⁴⁾. 임신부의 GBS 보균율은 임신 주수, 인종, 선행 질환 등에 따라 차이가 있다⁵⁾.

미국의 경우 임신부 GBS 보균율은 약 10-30%이며 우리나라 임신부의 GBS 보균율은 0.3-5.9% 정도로 미국과는 현저한 차이를 보이고 있다⁵⁻⁷⁾. 국내 신생아의 GBS 감염증 발생률은 서구 여러 나라들에 비교하면 낮은 편인데 이것은 임신부의 GBS 보균율이 낮은 것과 관련이 있는 것으로 생각되고 있다. 하지만 우리나라에서도 1984년에 Yun 등⁸⁾에 의해 처음 보고된 이후로 GBS 감염 예가 증가하는 양상이고 신생아기 패혈증과 수막염의 주요 원인균으로 여겨지고 있다^{9, 10)}.

GBS의 피막 다당질의 혈청형은 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII형 및 VIII형이 알려져 있고 지역, 질병 형태, 환자 연령군에 따라 다른 분포를 보인다¹¹⁾. 혈청형의 결정방법은 항혈청을 이용한 coagglutination 등의 방법이 있으나 많은 노동력을 필요로 하고 자가 응집 등 검사방법의 제한점이 있으며 낮은 특이성 때문에 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 염기서열분석을 통한 분자생물학적 혈청형 결정법으로 대체되고 있는 경향이 있다¹²⁾.

본 연구에서는 국내 임신부의 생식기와 직장에 집락된 균주에 대해 혈청형 특이 PCR과 염기서열 분석을 통한 molecular serotyping을 시행하여 국내 임신부에서 집락된 GBS 혈청형의 분포를 파악하고 향후 신생아를 대상으로 한 전향적 연구의 토대를 마련하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

2005년 11월부터 2006년 4월까지 산전 진찰을 위해 고양 시내 4개 산부인과 전문병원을 방문한 임신기간 35-37주의 임신부 667명을 대상으로 질과 직장에서 채취한 검체로부터

분리된 GBS 42균주를 대상으로 하였다.

멸균된 면봉으로 질과 직장에서 검체를 채취하여 Stuart 수송배지에 옮기고 24시간 이내에 gentamicin (8 µg/mL)과 nalidixic acid (15 µg/mL)를 첨가한 Todd-Hewitt broth에 접종한 후 35-37°C 항온기에서 18-24시간 배양하였다. 이것을 10 µL disposable loop를 이용하여 sheep blood agar plate에 계대배양한 후 완전용혈을 보이고 그람염색 양성이며 catalase 음성인 colony를 선택하여 CAMP 반응과 Phage-bact group B streptococci reagent로 응집시험을 하여 GBS를 동정하였다¹³⁾.

2. 혈청형 특이 PCR과 염기서열 분석을 통한 혈청형 결정

1) DNA 추출

임신부의 질과 직장에서 분리하여 -70°C에 냉동 보관 중이던 GBS 42균주를 해빙시켜 혈액한천배지에 계대배양하고 37°C 항온기에서 하룻밤동안 두었다. 혈액한천배지에 배양된 GBS colony를 면봉으로 배지의 1/4 정도 채취하여 1.7 mL microfuge tube에 담긴 350 µL의 증류수에 잘 섞은 다음 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Bionex Co., Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

2) 혈청형 특이 PCR

1992년부터 2005년까지 서울대병원을 내원한 소아의 임상 검체에서 동정되어 -70°C에 냉동보관 중인 GBS 중 라텍스 응집법(Wellcogen bacterial antigen kit, Murex Biotech Limited, Kent, England)으로 검사하여 혈청형을 미리 알고 있는 4균주(Ia, Ib, III형과 V형 각 1균주)를 선택하여 PCR의 적정화 및 혈청형 특이 PCR 시행시 양성대조로 이용하였다. 또한 42균주 중에서 9균주를 무작위로 선택하여 Table 1의 시발체 중에서 cpsES3-cpsGA1을 이용하여 PCR을 시행하고 염기서열분석을 통해 VI형 1 균주를 확인하였고 이것을 VI형 특이 PCR의 양성대조로 이용하였다.

Kong 등¹²⁾에 의해 고안된 방법에 따라 Table 1과 같은 시발체를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응은 genomic DNA를 50-200 ng을 사용하였으며 10X reaction buffer 1 µL, MgCl₂ 2.0 mM, dNTP mix 0.2 mM, 전시발체와

역시발제 각각 20 pmol, AmpliTaq Gold DNA polymerase 2.5 units (Applied Biosystems, Inc, Foster City, USA)를 혼합하여 시행하였고 양성대조와 음성대조를 항상 포함하였다. denaturation, annealing 그리고 elongation 온도와 시간은 각각 95℃에서 30초, 60℃에서 40초 그리고 72℃에서 40초이며 35회 실시하였다. 증폭된 PCR 생산물 5 µL를 0.5 µg/mL ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 혈청형 특이 PCR은 Ia, Ib, III, V형과 VI형을 확인하는데 이용되었다.

3) 염기서열 분석

혈청형 특이 PCR에서 혈청형이 확인되지 않거나 혈청형의 감별이 필요한 검체에 대하여 염기서열 분석을 시행하였다. 염기서열 분석을 위한 PCR은 모든 GBS에 공통인 cpsES3-cpsGA1 시발체를 사용하여 PCR을 시행하였다(Table 1). 혈청형 특이 PCR과 같은 조건에서 20 µL reaction을 시행하였다. 증폭된 PCR 생산물 중 15 µL를 취하여 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer Co, Daejeon, Korea)로 정제하여

염기서열 분석에 사용하였다. Standard protocol에 의해 BigDye™ terminator cycling condition (Applied Biosystems, Inc, Foster city, USA)으로 염기서열 분석을 수행하고 정제하여 3730 xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Inc)에서 전기영동한 후 자료는 Sequencing analysis v3.3 (Applied Biosystems, Inc)으로 분석하였다. 염기 서열의 비교에는 Sequencher® 4.8 (Gene Codes Co, Ann Arbor, USA)을 사용하였다.

4) 혈청형의 결정

각 균주를 대상으로 혈청형 특이 PCR을 통해 Ia, Ib, III, V형과 VI형을 결정하였다. II, IV, VII형과 세부 혈청형 III-1, 2, 3, 4형은 시발체 cpsES3-cpsGA1를 이용하여 PCR 시행 후 790 bp에 해당하는 PCR 생산물을 염기서열 분석하여 염기서열 이질성(sequence heterogeneity)에 따라 결정하였다. GBS로 동정되었으면서 상기한 모든 시발체를 이용한 PCR에서 amplicon을 형성하지 않는 경우 VIII형으로 결정하기로 했다¹²⁾ (Table 2).

Table 1. Oligonucleotide Primers Used in This Study

Primer	Target	Melting temp (°C)	GenBank accession no (s)	Sequence
cpsES3	<i>cpsE</i> gene	71.5	AB028896 (Ia), AF163833 (III)	6410/6020-GTT AGA TGT TCA ATA TAT CAA TGA ATG GTC TAT TTG GTC AG-6450/6060
cpsGA1	<i>cpsG</i> gene	74.5	AB028896 (Ia), AF163833 (III)	7199/6809-CCG CCA/G TGT GTG ATA ACA ATC TCA GCT TC-7171/6781
IacpsHS1	<i>cpsH</i> gene	77.9	AB028896 (Ia)	8463-GGC CTG CTG GGA TTA ATG AAT ATA GTT CCA GGT TTG C-8499
cpsIA	<i>cpsI</i> gene	70.3	AB028896 (Ia), AF163833 (III)	8816/8312-GTA TAA CTT CTA TCA ATG GAT GAG TCT GTT GTA GTA CGG-8778/8274
IbcpsIS	<i>cpsI</i> gene	71.1	AB050723 (Ib)	4116-GAT AAT AGT GGA GAA ATT TGT GAT AAT TTA TCT CAA AAA GAC G-4158
IbcpsIA1	<i>cpsI</i> gene	78.6	AB050723 (Ib)	4638-CCT GAT TCA TTG CAG AAG TCT TTA CGA TGC GAT AGG TG-4601
IIIcpsHS	<i>cpsH</i> gene	72.1	AF163833 (III)	7672-GAA TAC TAT TGG TCT GTA TGT TGG TTT TAT TAG CAT CGC-7710
VcpsHS2	<i>cpsH</i> gene	74.0	AF349539 (V)	7871-CCC AGT GTG GTA ATG AAT ATT AGT TGG CTA GTT TTT GG-7908
VcpsMA	<i>cpsM</i> gene	73.1	AF349539 (V)	8244-CCC CCC ATA AGT ATA AAT AAT ATC CAA TCT TGC ATA GTC AG-8204
VIcpsHS1	<i>cpsH</i> gene	77.2	AF337958 (VI)	7767-CCT TAT TGG GCA AGG TAT AAG AGT TCC CTC CAG TGT G-7803
VIcpsIA	<i>cpsI</i> gene	74.5	AF337958 (VI)	8126-GAA GCA AAG ATT CTA CAC AGT TCT CAA TCA CTA ACT CCG-8088

Table 2. Group B Streptococcus Molecular Serotype Identification by PCR and Sequence Analysis

Amplification primer pairs	PCR product size (bp)	Interpretation
GBS MS identification by MS-specific PCR		
IacpsHS1-cpsIA	354	Serotype Ia
IbcpsIS-IbcpsIA1	523	Serotype Ib
IIIcpsHS-cpsIA	641	Serotype III
VcpsHS2-VcpsMA	374	Serotype V
VIcpsHS1-VIcpsIA	360	Serotype VI
GBS MS identification by sequence analysis		
cpsES3-cpsGA1	790	

Abbreviations : GBS, Group B Streptococcus; MS, molecular serotype

결 과

1. 인구학적 특징

667명의 임신부 중에서 42명이 질과 직장에서 채취한 검체에서 GBS 배양 양성 소견을 보여 6.3%의 보균율을 확인하였다. 참여한 임신부들의 평균 연령은 30.9세였고 검체 채취 당시 임신 주수는 35주 6일이었다.

2. Molecular serotyping의 적정화 및 라텍스 응집

법과의 일치도

라텍스 응집법(Wellcogen bacterial antigen kit, Murex Biotech Limited, Kent, England)으로 검사하여 혈청형을 미리 알고 있는 4군주(Ia, Ib, III, V형 각 1 군주씩)를 선택하여 우선적으로 염기서열을 분석하여 각 혈청형에 일치한 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다. 각 4가지 혈청형의 군주에 대하여 5가지의 혈청형 특이(Ia, Ib, III, V 및 VI형) PCR을 시행하여 해당 혈청형 특이 PCR에서는 양성이지만 다른 혈청형 특이 PCR에서는 음성이 나오는 PCR 조건을 적정화하여, 혈청형 Ia, Ib, III, V형에 대하여 라텍스 응집법과 혈청형 특이 PCR의 결과가 일치함을 확인하였다.

Table 3. Molecular Serotype Distribution of 42 Group B Streptococcus Isolates

MS	PCR and sequence analysis	PCR only	Total (%)
III	0	12	12 (28.6)
V	0	11	11 (26.2)
Ia	0	11	11 (26.2)
VI	0	4	4 (9.5)
Ib	2	0	2 (4.8)
II	2	0	2 (4.8)
Total (%)	4 (9.5)	38 (90.5)	42 (100)

3. 혈청형 결정 과정

전체 42군주 중 38군주는 혈청형 특이 PCR만으로 혈청형 결정이 가능하였다. 혈청형 특이 PCR에서 모두 음성이었던 2군주와 Ia형과 Ib형 특이 PCR에서 모두 양성이었던 2군주는 추가로 염기서열 분석을 통해 혈청형을 결정하였다(Table 3).

4. Molecular serotype의 분포

42군주 모두에서 혈청형 특이 PCR과 염기서열 분석을 통해 molecular serotype이 결정되었고 결과는 빈도순으로 III형이 12군주(28.6%), V형이 11군주(26.2%), Ia형이 11군주(26.2%), VI형이 4군주(9.5%), Ib형이 2군주(4.8%)였고 II형이 2군주(4.8%)였다(Table 3).

고 찰

GBS는 Lancefield 분류에 따라 B군으로 분류되며 피막 다당질의 혈청형 및 cell-surface expressed protein에 의해 형 특이성이 결정된다¹⁾. 피막 다당질 항원은 중요한 병독인자이며 역학적인 지표이고 단백결합 백신의 주요 구성성분이다. 피막 다당질의 혈청형은 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII형 및 VIII형으로 9가지가 알려져 있다. 표면 단백항원은 C alpha protein, C alpha like protein 2와 3, C beta protein, Rib이 알려져 있고 GBS 감염의 병독성에 기여하며 protective immunity를 유도한다¹⁴⁾.

피막 다당질의 혈청형을 확인하는데 사용되어 온 방법은 immunoprecipitation, enzyme immunoassay, coag-

glutination, latex agglutination, fluorescence microscopy, counterimmunoelectrophoresis와 capillary precipitation, 그리고 inhibition enzyme-linked immunosorbent assay 등이다. 이 방법들은 많은 노동력을 필요로 하고, 값비싼 혈청형 특이 항혈청(serotype-specific antisera)이 필요하며 이용 가능한 혈청형은 Ia형에서 V형까지 6가지로 제한적이다¹⁵⁾. 한편 분자생물학적 방법을 이용한 PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), restriction endonuclease analysis는 역학 연구에는 유용하지만 혈청형을 구분할 수 없는 제한점이 있으므로, 이런 배경에서 PCR을 이용한 molecular serotype 결정방법이 개발되었다¹²⁾.

저자들은 Kong 등¹²⁾이 고안한 시발체로 혈청형 특이 PCR과 염기서열 분석을 통해 molecular serotype을 결정하였다. Kong 등은 피막 다당질(capsular polysaccharide, cps) gene cluster의 염기서열을 이용한 혈청형 특이 시발체를 가지고 Ia, Ib, III, IV, V형과 VI형에 대해서는 직접 PCR을 통해 혈청형을 결정하였고, cpsES3-cpsGA1 시발체로 790 bp (positions 1437-2226, GenBank accession number AF332908) amplicon을 얻고 이 부분을 염기서열 분석하여 혈청형간 염기서열 이질성(sequence heterogeneity)에 따라 Ia, Ib, III-1, III-2, IV, V, VI형과 VII형을 결정하였다. 790 bp의 염기서열 내에서 III-3형과 Ia형 그리고 III-4형과 II형이 구분되지 않기 때문에 subserotype III-3, III-4형은 염기서열 분석 단독으로는 결정할 수 없고 혈청형 특이 PCR 결과를 함께 참고해야 한다. Kong 등¹²⁾은 임상 검체에서 분리된 206균주를 가지고 자신들이 고안한 molecular serotype 결정방법과 기존의 항혈청을 이용한 방법을 모두 시행하여 비교하였는데 기존의 방법으로는 91.3% (188/216)에서 혈청형 결정이 가능하였고, molecular serotype 결정방법을 통해서 100% (216/216)에서 혈청형이 결정되었다. 또한 두 가지 검사를 통해 혈청형 결정이 가능했던 188균주의 결과는 서로 일치하여 PCR과 염기서열 분석을 통한 혈청형 결정 방법이 기존의 항혈청을 이용한 혈청형 결정 방법을 대체할 수 있다고 결론지었다.

본 연구에서도 임신부의 생식기와 직장에서 분리된 42균주를 Kong 등¹²⁾이 고안한 방법으로 검사하였을 때 42균주 모두

에서 혈청형 결정이 가능하였다. 또한 서울대병원을 방문한 환아들의 무균성 체액에서 동정된 GBS 중 라텍스 응집법을 이용하여 혈청형을 알고 있던 14개 검체에서 혈청형 특이 PCR을 시행했을 때 모두 일치하는 결과를 보였다.

GBS의 혈청형은 지역, 질병 형태, 환자 연령군에 따라 다른 분포를 보이는데 본 연구에서는 III형(28.6%)이 가장 많은 빈도를 보였고 그 다음은 V형(26.2%), Ia형(26.2%), VI형(9.5%), Ib형(4.8%), II형(4.8%) 순이었으며 IV, VII형 및 VIII형으로 확인된 균주는 없었다. 1997년 Uh 등¹⁶⁾의 보고에 따르면 임신부의 GBS 보균율은 5.9%였고 집락화된 혈청형은 Ib형이 48.3%, Ia형이 24.1%, III형이 20.7%로 혈청형 분포에서 본 연구와는 다른 결과를 보여주었다.

한국의 경우 신생아의 GBS 감염 발생률은 서구 여러 나라들에 비교하면 낮은 편으로 알려져 있었지만, GBS에 의한 수막염 발생에 대한 보고가 증가하는 경향을 보이는 것에 주의를 기울일 필요가 있다^{9, 17)}. GBS에 의한 소아 감염증의 임상상에 대한 연구에서 Kim 등⁹⁾의 보고에 따르면 전체 신생아 패혈증에서 GBS가 차지하는 빈도를 확인할 수는 없지만 1985년 이후 1999년 까지의 추이를 보았을 때 1994년 이후의 증례 수는 그 이전에 비해 현저한 증가를 보이고 있다. Kim 등⁹⁾의 보고에서 1985년부터 1999년까지 한 대학병원에서 진단된 신생아 패혈증에서 분리된 6균주의 혈청형은 III형이 3균주, Ib형이 3균주였고, 수막염에서 분리된 7균주의 혈청형은 III형이 3균주, V형이 2균주, Ib형이 1균주, Ia형이 1균주였다.

미국에서의 보고에 따르면 1970대와 1980대에는 신생아 초기 감염의 1/3, 후기 감염의 90%에서 III형이 분리되었으나 1990년대에 들어서는 초기 감염의 원인 혈청형은 Ia형이 35-40%, III형이 25-30%, V형이 15%를 차지했고^{11, 18)} 후기 감염과 수막염의 경우 III형이 역시 주된 혈청형이었다¹⁹⁾. 동시에 임신부에 대한 조사에서 Ia, III형 및 V형이 생식기와 직장에 집락된 균의 2/3를 차지하는 주된 혈청형이었고 침습성 GBS 감염을 가진 산모의 80% 이상에서 이 세 가지 혈청형이 원인이었다²⁰⁾. 일본의 경우 1999년의 보고에 따르면 임신부에서 분리되는 혈청형은 VIII형(36%)과 VI형(25%)이 대부분을 차지했다²¹⁾. 한국에서는 1992년 이전까지는 VI형과 VIII형에 대한 보고가 없으나 1993년 이후 임

상 검체에서 각각 3%, 2%가 분리되었다²²⁾. VI형과 VIII형은 병독성이 적은 것으로 알려져 왔으나 덴마크에서는 침습성 감염 중 6%가 VIII형에 의한 것으로 보고되었다²³⁾.

서구 여러 나라들에서 신생아의 GBS 감염을 예방하는 목적으로 임신 기간 중 예방적 항생제 요법(intrapartum antibiotic prophylaxis)이 도입된 이후 신생아의 GBS 조기감염은 줄어들었으나²⁴⁾ 후기 감염, GBS와 연관된 사산, 조산의 빈도는 줄어들지 않고 있다¹³⁾. 또한 노인층과 면역저하자에서 GBS에 의한 이환율과 사망률이 증가하면서 백신의 필요성이 제기되었고 단백결합 다당질 GBS 백신을 개발 중이다²⁵⁾.

우리나라의 경우 현재까지는 GBS에 의한 질병의 발병률 및 질병부담에 대한 자료가 정립되어 있지 않은 상태로 향후 대규모의 전향적 연구가 필요하다. 나아가 서구 여러 나라들에서는 백신의 필요성이 제기되고 백신 개발이 진행되고 있는 바 향후 우리나라에서도 백신 도입이 필요한지 여부를 평가하기 위한 광범위한 역학연구도 진행되어야 할 것으로 보인다. 당면한 문제로는 국내에서 신생아의 GBS 감염증 발생이 이전에 비해 증가하는 경향을 보이기 때문에 신생아 GBS 감염증, 특히 조기 감염의 발병률과 관계되는 임신부의 GBS 보균율을 파악하고 추이 변화를 감시하는 것이 필요하다. 또한 임신부의 생식기와 직장에 집락된 균의 혈청형 분포를 분석하여 신생아 GBS 감염증에서 분리되는 균주의 혈청형 분포와의 관계를 파악하고, 새로운 혈청형에 의한 질병의 발생을 감시하는 것도 중요한 의미를 가진다.

향후 혈청형 분포에 대한 대규모 연구를 진행한다면 항혈청을 이용한 고전적인 혈청형 결정법의 결과와 잘 일치하며 기존의 검사법으로는 혈청형을 결정할 수 없었던 균주에서도 혈청형 결정이 가능하고 재현성(reproducibility)이 좋은 분자생물학적인 방법을 이용하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

요 약

목 적: 국내 임신부의 생식기와 직장에서 분리된 B군 연구균의 혈청형 분포를 분자생물학적인 방법으로 확인하고자 하였다.

방 법: 산전 진찰을 위해 고양시 소재 4개의 산부인과병원

을 방문한 임신 35주 이상 임신부의 생식기와 직장에서 분리되어 -70°C에 보관 중이던 42개의 B군 연구균에서 DNA를 추출하고 혈청형 특이 PCR 과 염기서열 분석을 이용하여 혈청형을 결정하였다.

결 과: 42개 균주 모두에서 혈청형 특이 PCR 과 염기서열 분석을 통해 혈청형을 결정할 수 있었고 빈도순으로 III형이 12균주(28.6%), V형이 11균주(26.2%), Ia형이 11균주(26.2%), VI형이 4균주(9.5%), Ib형이 2균주(4.8%), II형이 2균주(4.8%)였다.

결 론: 국내의 후기 임신부에서 흔하게 분리되는 B군 연구균의 혈청형은 III형, V형, Ia형이었고 본 연구에서 이용한 혈청형 특이 PCR과 염기서열 분석은 앞으로도 관련 연구에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 보인다.

References

- 1) Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae*. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Philadelphia : Elsevier Churchill Livingstone, 2005:2423-34.
- 2) Edwards MS, Nizet V, Baker CJ. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klien JO, Baker CJ, Wilson CB, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia : WB Saunders Co, 2006:1091-141.
- 3) Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. J Infect Dis 1983;148:802-9.
- 4) Schuchat A, Zywicki SS, Dinsmoor MJ, Mercer B, Romaguera J, O'Sullivan MJ, et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: A multicenter case-control study. Pediatrics 2000;105:21-6.
- 5) Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol 1991;77:604-10.
- 6) Uh Y, Kwon JY, Jang IH, Yoon KJ, Kim HK. Colonization rate of group B streptococcus in pregnant women and neonates. Korean J Clin Pathol 1994;14:447-53.

- 7) Kim MW, Jang HO, Chang DY, Cho JR, Kim YA, Choi HM et al. Group B streptococcal colonization rate in Korean pregnant women. Korean J Obstet Gynecol 2006;49:337-44.
- 8) Yun HK, Song PJ, Choi KC, Ju JR, Cho BS, Jung SJ. A case of neonatal meningitis by group B streptococcus. J Korean Pediatr Soc 1984;27:1011-7.
- 9) Kim YK, Kwak YH, Kim YJ, Jung HS, Hong JY, Lee HJ. Clinical features of group B β -hemolytic streptococcal infection in infants and children. Korean J Pediatr Infect Dis 1999;6:194-202.
- 10) Kim SH, Park HJ, Park SE, Hong YR, Lee YA, Shin JB. The etiology of neonatal bacterial meningitis in Busan, Korea. Korean J Pediatr Infect Dis 2007;14:43-6.
- 11) Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, et al. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. J Infect Dis 1998;177:998-1002.
- 12) Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. J Clin Microbiol 2002;40:216-26.
- 13) Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51(RR11):1-22.
- 14) Kong F, Martin D, James G, Gilbert GL. Towards a genotyping system for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus): use of mobile genetic elements in Australasian invasive isolates. J Med Microbiol 2003; 52:337-44.
- 15) Arakere G, Flores AE, Ferrieri P, Frasch CE. Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for serotyping of group B streptococcal isolates. J Clin Microbiol 1999; 37:2564-7.
- 16) Uh Y, Jang IH, Yoon KJ, Lee CH, Kwon JY, Kim MC. Colonization rates and serotypes of group B streptococci isolated from pregnant women in a Korean tertiary hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:753-6.
- 17) Kim HJ, Lee JW, Lee KI, Lee HS, Hong JH, Han SH, et al. Causative organisms in children with bacterial meningitis (1992-2002). J Korean Pediatr Soc 2003;46: 1085-8.
- 18) Lin FY, Clemens JD, Azimi PH, Regan JA, Weisman LE, Philips JB, et al. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. J Infect Dis 1998;177: 790-2.
- 19) Davies HD, Raj S, Adair C, Robinson J, McGeer A. Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications for vaccine formulation. Pediatr Infect Dis J 2001;20:879-84.
- 20) Zaleznik DF, Rench MA, Hillier S, Krohn MA, Platt R, Lee ML, et al. Invasive disease due to group B Streptococcus in pregnant women and neonates from diverse population groups. Clin Infect Dis 2000;30: 276-81.
- 21) Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, et al. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J Infect Dis 1999;179: 1030-3.
- 22) Uh Y, Kim HY, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ. Correlation of serotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae*. Yonsei Med J 2005;46:480-3.
- 23) Ekelund K, Slotved HC, Nielsen HU, Kaltoft MS, Konradsen HB. Emergence of invasive serotype VIII group B streptococcal infections in Denmark. J Clin Microbiol 2003;41:4442-4.
- 24) Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med 2000;342:15-20.
- 25) Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. N Engl J Med 1988;319:1180-5.