



메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 분자역학 연구에서 IRS-PCR (Infrequent-Restriction-Site PCR)의 응용

신나영¹ · 유진홍² · 박철민³ · 이동건² · 최수미² · 권재철² · 김시현² · 박선희² · 최정현²
가톨릭대학교 의과대학 일반대학원 생명과학과¹, 내과학교실², 가톨릭대학교 의학연구소³

Application of Infrequent-Restriction-Site Polymerase Reaction (IRS-PCR) to the Molecular Epidemiologic Analysis of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Background: We investigated the usefulness of infrequent-restriction-site polymerase chain reaction (IRS-PCR) compared with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) on the molecular epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Materials and Methods: We used fifty clinical isolates of MRSA collected from 10 university hospitals located in Seoul. We performed three procedures on these isolates: PFGE using *Sma*I, IRS-PCR using *Xba*I-*Hha*I or *Eag*I-*Hha*I, and MLST using seven house-keeping genes. We determined the clusters of molecular types by dendrogram using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and Dice coefficients

Results: MLST analysis showed that isolates exhibited ST1, ST5, ST72, ST89, and ST239. In PFGE, the isolates clustered into 5 major groups with 80% similarity, which subsequently became classified into 18 subgroups with 95% similarity. In IRS-PCR using *Eag*I-*Hha*I restriction enzymes, there was little resolution among the patterns of isolates. However, *Xba*I-*Hha*I IRS-PCR showed 5 groups with a 90% similarity. These groups were then classified into 9 subgroups with a 95% similarity. There were no significant differences among the isolates from different hospitals.

Conclusions: The *Xba*I-*Hha*I IRS-PCR method could be a useful tool in the molecular epidemiology of MRSA. Its resolution power was good enough to analyze isolates, because the patterns of IRS-PCR were closely correlated with those of MLST and showed diverse groups.

Key words: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Pulsed Field Gel Electrophoresis, Infrequent restriction site PCR, Multilocus sequence typing

Na-Young Shin¹, Jin-Hong Yoo², Chulmin Park³, Dong-Gun Lee², Su-Mi Choi², Jae-Cheol Kwon², Si-Hyun Kim², Sun-Hee Park², and Jung-Hyun Choi²

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

Copyright © 2011 by The Korean Society of Infectious Diseases | Korean Society for Chemotherapy

Submitted: July 6, 2011

Revised: August 23, 2011

Accepted: September 20, 2011

Correspondence to Jin-Hong Yoo, M.D.

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

서론

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 인체에 흔하게 감염증을 일으키는 병원균으로써, 피부연조직 감염증과 같은 가벼운 질환에서부터 폐렴증과 같은 전신성 중증질환을 일으키기도 한다. 특히 전 세계적으로 문제가 되고 있는 메티실린 내성 황색포도알균(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)은 병원 감염의 주요 원인균이며, 최근 들어서는 병원뿐만 아니라 지역사회 관련 메티실린 내성 황색포도알균(community-associated MRSA, CA-MRSA)이 새로운 문제로 대두되고 있다[1-6].

국내에 발표된 연구에서도, 국내 3차 병원에서 분리되는 *S. aureus* 중 MRSA는 70% 이상이며[7,8], 1, 2차 병원에서도 40% 이상으로 보고되고 있다[9]. MRSA에 의한 원내감염을 방지하기 위해서 MRSA의 감염원, 감염경로의 정확한 파악이 필요하기 때문에 형별(typing)이 사용된다[10].

현재 MRSA의 분자역학적 형별법중 표준방법으로 사용되는 기법은 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)이다[11]. 이는 genomic DNA를 제한효소로 처리한 후 PFGE 장비를 이용하여, 일반적인 전기영동 방법(electrophoresis system)으로 분리될 수 없는 커다란 크기의 DNA 절편을 분리하여 그 양상을 비교 분석하는 기법이다. 이를 이용하여 MRSA 균주의 집단방생에 대한 분석과 역학적 형별, 그리고 유전적 관계를 밝힐 수 있다는 장점들을 지닌다. 그러나 고가의 장비가 필요하고, 연구자가 능숙해질 때까지 많은 시간이 필요하며, 결과를 보기까지 시간이 오래 걸리고 연구실 간의 재현성을 확보하는데 어려움이 있다.

또한 multiple house-keeping genes[12]을 이용한 multilocus sequence typing (MLST)는 유전적 다양성을 분석하는 PCR 방법으로 적은 양의 검체로 누구나 쉽게 실험할 수 있으나 염기서열분석에 비용이 많이 들고 시일이 걸린다.

이에 보다 저렴하고 신속하게 시행하여 PFGE나 MLST에 필적하는 결과를 얻을 수 있는 여러 대안들이 개발되었다. 이들 중, infrequent restriction site PCR (IRS-PCR)이 제시되었는데[13], 이는 infrequent와 frequent restriction site를 인식하는 두 종류의 제한 효소를 사용하여 각 효소에 의해 잘려진 절단면에 결합하는 adaptor를 primer와 함께 사용하여 필요한 부위만 선택적으로 증폭하여 확인하는 방법이다. IRS-PCR은 고가의 장비가 필요 없으며 DNA를 증폭하여 사용하기 때문에 적은 양으로도 실험이 가능하여 PFGE와 MLST보다 단시간에 수행할 수 있으며, 재현성 확보에도 유리한 방법으로 평가 받고 있다. 하지만 IRS-PCR은 현재까지 그람 음성균에만 사용되어 왔고 많은 종에 응용되지 않아 추가적인 검증이 필요하다. 이에 본 연구진은 이 기법이 분자역학적 분석을 위한 대안 수단이 될 수 있는지 여부를 확인해보기 위하여 대표적인 그람양성균인 MRSA를 대상으로 한 분자역학연구에서 IRS-PCR의 적용 가능성을 평가해 보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주 및 세균학적 검사

서울, 경기도에 위치하는 9곳의 대학병원에서 2008년 5월부터 2009년 3월까지 MRSA에 감염된 중환자실 환자의 비강배양(nasal swab)과 균혈증(bacteremia) 검체에서 분리된 MRSA 수집균주와 가톨릭대학교 의과연구소 감염내과 연구실에 보관된 MRSA 균주를 대상으로 사용하였다.

각 병원에서는 각각의 균주를 GP 카드와 AST-P601 카드를 이용한 Vitek II automated system (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA)을 사용하거나 PBC28 카드를 이용한 MicroScan Pos Combo Panel Type 6 automated system (Baxter Diagnostics, West Sacramento, CA, USA)를 사용하여 항균제 감수성 검사를 하여 MRSA를 감별하였다. 이렇게 수집된 균주는 다시 실험실에서 최종확인으로 혈액 한천 배지(BAP; Komed, Korea)에 접종하여 37°C에서 18시간 순수 배양하여 그람염색법을 시행하여 현미경으로 균체의 형태를 확인 한 후 단일 집락을 선별한 후 mannitol salt agar (MI; Difco Lab., Livonia, USA)에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양하여 관찰하는 통해 screening[14, 15] 검사를 실시하여 보관되었다.

분자생물학적 연구를 위한 세균배양은 brain heart infusion (BHI; becton dickonson {BD}, Franklin Lakes, NJ, USA)와 luria bertani (LB; BD, FranklinLakes, NJ, USA) broth에서 이루어졌다.

2. 분자 역학 방법

1) PFGE

PFGE를 위한 DNA 분리는 Schwartz[16] 방법을 일부 수정하여 실시하였다.

MRSA 균주를 3 mL의 LB broth에 접종하여 37°C에서 13,000 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 분광광도계(SPECTRONIC 20D+, Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA) 610 nm에서 OD 0.3 (1×10^8 CFU/mL)이 되도록 조정하고 희석하여 최종농도는 각 tube 당 $\sim 2.69 \times 10^5$ CFU/mL로 하였다.

침사에 lysis I buffer (30 mM Tris-hydrochloride; pH8.0, 1M NaCl, 100 mM EDTA-NaOH, 0.5% Brij-58, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% Sodium laurylsarcosine) 50 μ L를 첨가한 다음, 37°C, 30분 정도 배양한 후 2% CleanCut agarose (CHEF Genomic DNA Plug Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 50 μ L와 100units Lysostapin (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) 2 μ L를 혼합하여 4°C에서 굳혀 1% plug를 만들었다[11]. Plug를 lysis II buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100units Lysostapin, Lysozyme 1 mg/mL) 300 μ L에 37°C에서 1시간 반응 후 Lysis I buffer 250 μ L에 37°C에서 1시간 더 추가 반응시켰다. 다시 proteinase K buffer (0.5M EDTA-NaOH, 25 units/mL proteinase K) 300 μ L에 넣어 50°C에서 하룻밤 반응하였다. 다음 날 증류수와 washing buffer로 3회 이상 반복 세척 후 TE 완충액에 넣어 4°C에 보관하였다.

제한효소 처리는 20U의 SmaI을 사용하여 25℃에서 4시간 반응시켰다[17]. CHEP DR III (Bio-Rad Laboratories Inc.)에서 block I (Switching time 5-15초, 200V, 6V/cm, 10시간 14℃) 와 block II (Switching time 15-60초, 200V, 6V/cm, 13시간 14℃)의 조건으로 전기영동 하였다.

S. aureus 표준균주인 NCTC 8325를 normalization 하는데 사용하였다.

PFGE 군집(cluster) 분석은 fingerprinting II informatix software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 데이터 베이스화 하였다. unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)와 dice coefficients 방법을 통해 dendrogram을 얻었다 (band position tolerance-1.25 or 1, optimization-0.5%), pulse-ulsed-field type (PFT) clusters는 Tenover 등이 제시한 기준에 따라 판독 하였다(similarity coefficient of 80%)[18].

2) MLST

균주의 allelic profile은 Mark Enright[12] 방법을 일부 수정하여 수행하였다.

PCR 반응액은 MRSA의 임상 분리주의 Genomic DNA 50 ng과, 0.25 U Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 1 ×PCR buffer (20 mM TrisHydro-chloride; pH8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol), 200 μM dNTP mixture (2.5 mM each), 각각의 0.2 μM primer, DW (final volume 50 μL)을 혼합하여 준비한 후 My cycler (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다.

PCR 조건은 초기 변성(denaturation)단계는 95℃에서 3분, 변성 94℃에서 30초, primer 결합(annealing)단계는 55℃에서 30초, DNA 합성(extension)단계는 72℃에서 1분으로 30회 시행 후 마지막 DNA 합성단계는 72℃에서 5분으로 하였다.

MRSA DNA로 7가지의 유전자를 PCR 한 후 그 산물을 염기서열 분석하였다. 각 균주들의 검사결과에 따른 sequence type (STs)은 *S. aureus* MLST server (<http://saureus.mlst.net/>)[19]를 통하여 분리되어 결정되었다.

3) IRS-PCR

(1) Adaptor and primers

Adaptor 제작은 Handley SA [20] 가 제시한 방법과 수정한 방법을 동시에 수행하여 비교하였다.

HhaI (AH1 & AH2 또는 AH1 & AH2-new), *XbaI* (AX1와 AX2 또는 AX1와 AX2-new), *EagI* (AE1 & AE2 또는 AE1 & AE2-new) adaptor는 각 oligonucleotide 조합을 균등한 양(20 pmol/μL each)으로 혼합하여 2시간 동안 95℃에서 4℃로 냉각시켜 만든 후 -20℃에 보존하였다.

이번 연구에서는 adaptor의 안정성을 높이고 PCR과정의 선택성을 높이기 위하여 oligonucleotides는 GC% 가 50-60% 이상으로 하여

melting temperature (Tm) 값이 상향 조정된 oligonucleotides를 새로 설계하였고 Fast PCR (Running PCR)을 이용하여 PCR efficiency (quality)를 높였다.

In silico server (<http://insilico.ehu.es/digest/>)를 통하여 기존 염기서열분석이 완료된 *S. aureus* genomic DNA에서 *XbaI*, *EagI*, *HhaI*의 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 패턴을 미리 예측하였다. 사용된 *S. aureus* 균주의 목록은 *S. aureus* RF122, Mu50, COL, ED98, JH1, JH9, MRSA252, MSSA476, MW2, Mu3, N315, NCTC 8325, USA300_FPR3757, USA300_TCH1516이었다. 약 20개에서 30개 밴드 패턴이 예측된 primers (*XbaI* primers; PX-CG & PX-GC, *EagI* primers; PE-C & PE-T)그룹을 선택하여, IRS-PCR의 선택성과 전기영동의 분석능을 최적화하도록 하였다.

각각의 adaptor와 primers는 Table 1과 같다.

(2) Digestion & ligation

1983년 Dyer DW[21] 방법을 응용하여 QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용해서 genomic DNA를 분리하고 정량 하였다.

임상 분리균의 chromosomal DNAs는 1 μg, 1× NEB buffer 4 (pH 7.9; 50 mM potassium acetate, 20mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol), DW (final volume, 40 μL), 1× BSA에 10 U *HhaI*와 10 U *XbaI* 또는 10 U *HhaI*와 10 U *EagI*를 넣어 37℃에서 3시간 동안 반응시킨 후 65℃에서 20분간 불활성화 시켰다[13].

잘린 DNA 10 μL, T4 DNA ligase (400 U), ATP (12.6 pmol), 1 × ligase buffer (pH 7.5; 1 mM ATP, 50 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 10 mM dithiothreitol), *HhaI* adaptor (AH 또는 AH-new 20 pmol), *XbaI* adaptor (AX 또는 AX-new 20 pmol) 또는

Table 1. Adaptors and Primers Used in Infrequent Restriction Site Polymerase Chain Reactions

Oligonucleotide	Sequence	References
<i>HhaI</i> adaptor		
AH1	5'-AGA ACT GAC CTC GAC TCG CAC G-3' ^a	Handley SA et al., 2002
AH2	3'- TG AGC GT-5'	Handley SA et al., 2002
AH2-new	3'-TGA CTG GAG CTG AGC GT-5'	In this study
<i>XbaI</i> adaptor		
AX1	5'-P04-CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3'	Handley SA et al., 2002
AX2	3'- AT GAC CG-5' ^b	Handley SA et al., 2002
AX2-new	3'- AT GAC CGT CTG -5' ^c	In this study
<i>XbaI</i> primers, PX-CG	5'-AGA GTC TGC CAG TAC TAG ACG-3'	In this study
<i>XbaI</i> primers, PX-GC	5'-AGA GTC TGC CAG TAC TAG AGC-3'	In this study
<i>EagI</i> adaptor		
AE1	5'-P04-GGC CTA CTG GCA GAC TCT-3'	Handley SA et al., 2002
AE2	3'- AT GAC CG-5' ^b	Handley SA et al., 2002
AX2-new	3'- AT GAC CGT CTG -5' ^c	In this study
<i>EagI</i> primers, PE-C	5'-AGA GTC TGC CAG TAG GCC GC-3'	In this study
<i>EagI</i> primers, PE-T	5'-AGA GTC TGC CAG TAG GCC GT-3'	In this study

^aAH1 serves as part of the adaptors and primers as the *HhaI* primer.

^{b,c} *EagI* and *XbaI* use the same sequence for this portion of the adaptor.

EagI adaptor (AE 또는 AE-new 20 pmol), DW (final volume, 20 μ L) 혼합하여 16°C에 1시간 동안 반응시켜 ligation 후 65°C에서 20분간 불활성화시켰다(Fig. 1)[22].

4) PCR

IRS-PCR은 Mazurek GH[13]와 Yoo JH[24]의 방법을 수정하여 수행하였다.

혼합물 template DNA 50 ng (1/50th of the ligation-redigestion product), 0.25 U Taq polymerase, 1 \times PCR buffer, 200 μ M dNTP mixture (2.5 mM each), 20pmol AH1 primer, PX-CG primer 또는 PE-C 20 pmol, DW (final volume, 50 μ L) 혼합한 후 My cycler를 사용하여 증합효소연쇄 반응을 증폭시켰다[23].

PCR조건은 *XbaI-HhaI*는 95°C에서 15분간 초기 변성시킨 후 변성단계는 94°C에서 1분, primer 결합단계는 61°C에서 1분, DNA 합성단계는 72°C에서 2분으로 25회 시행 후 마지막 DNA 합성단계는 72°C에서 10분으로 하였고, *EagI-HhaI*는 95°C에서 15분간 초기 변성시킨 후 변성단계는 94°C에서 1분, primer 결합단계는 67°C에서 1분, DNA 합성단계는 72°C에서 2분으로 25회 시행 후 마지막 DNA 합성단계는 72°C에서 10분으로 하였다[13].

5) Pattern 분석

IRS-PCR product는 PAGE (Polyacrylamide gel Electrophoresis) analysis로 1 \times TBE buffer (pH 8.0, 89 mM Tris base, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA), 6.5% Polyacrylamide gel로 180 volt에서 1시간 10분 동안 얼음 수조에 넣고 전기영동 하였다. DNA marker로 25bp ladder (Bioneer)를 사용하였다. EtBr로 20분 염색하고 증류수로 10분간 세척 후 Gel Doc에서 UV illumination으로 이미지를 얻었다[23, 24].

IRS-PCR 군집 분석은 Fingerprinting II Informatix software으로 데이터 베이스화 하여 dice coefficients 방법을 통해 dendrogram을 얻었다(band position tolerance-1.5, optimization-0.5%).

결과

1. Adaptor 설계

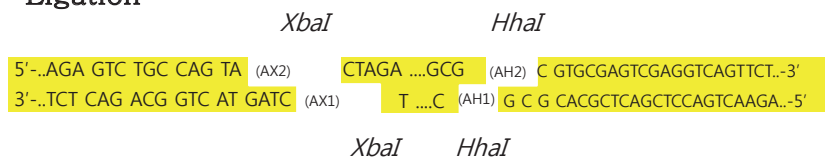
Fast PCR을 이용해 확인한 결과 기존의 논문들에서 사용한 adaptor 중 Tm값이 AH2의 경우 23.3°C, AX2 (AE2)의 경우 18.8°C로 측정되었다. Tm값이 낮고 PCR 산물이 제대로 증폭되지 않았으며 실험의 재현성이 확보되지 않았다(Fig. 2A).

그래서 adaptor의 안정성을 높이기 위하여 Tm 값이 각각 56.6°C

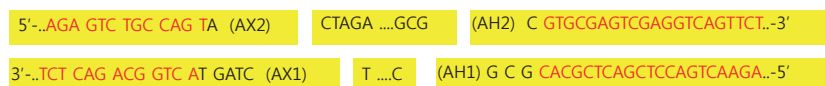
Digestion



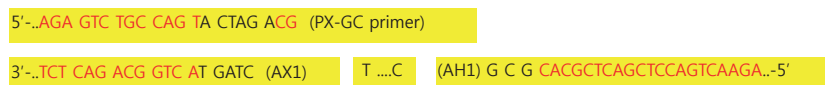
Ligation



Denaturation



Initial primer annealing



Initial extension

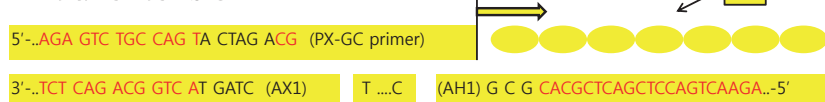


Figure 1. Schematic presentation of IRS-PCR.

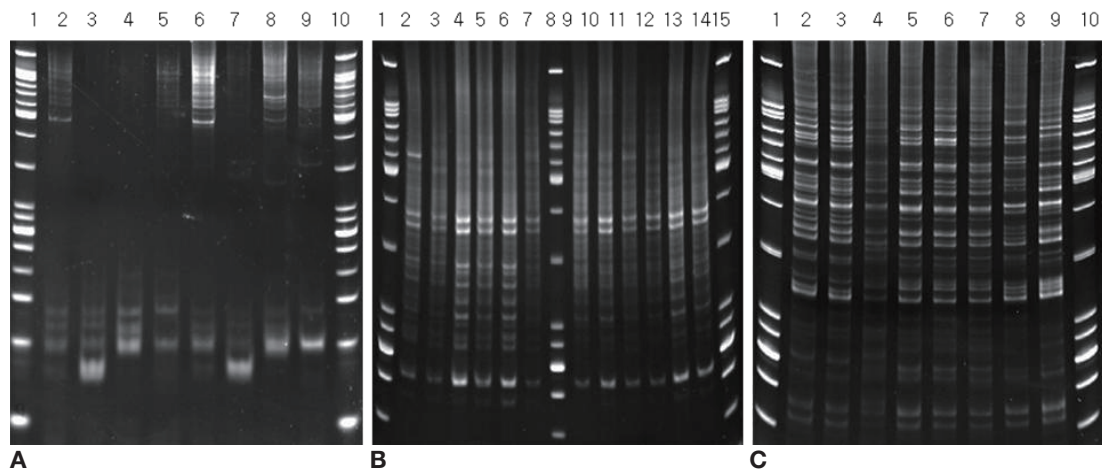


Figure 2. IRS-PCR electrophoretic patterns of MRSA produced by amplification of restricted-ligated *Xba*I-*Hha*I fragments. (A) Lane 1 and 10 contained 25-bp ladders; lane 2 through 9 contained clinically isolated strains using adaptor (AH1&AH2, AX1 & AX2, AE1 & AE2) and primer PX-C. (B) Lane 1, 8, and 15 contained 25-bp ladders; lane 2 through 7 and 9 through 14 contained clinically-isolated strains using new adaptor (AH1 & AH2-new, AX1 & AX2-new, AE1 & AE2-new) and primer PX-C. (C) Lane 1 and 10 contained 25-bp ladders; lane 2 through 9 contained clinically-isolated strains using new adaptor (AH1 & AH2-new, AX1 & AX2-new, AE1 & AE2-new) and primer PX-CG.

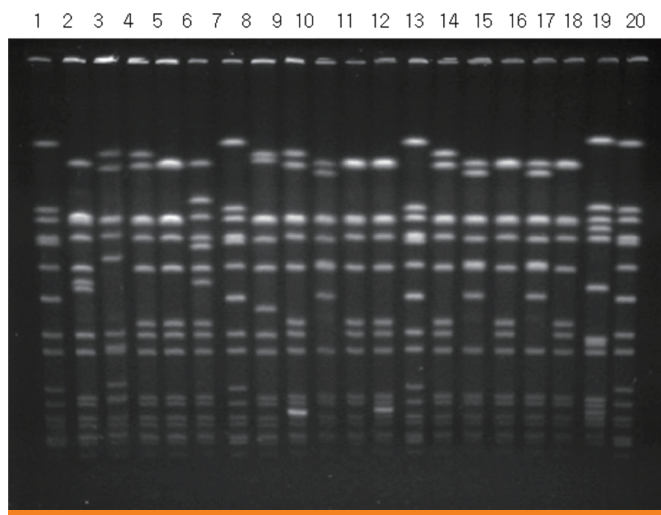


Figure 3. Representative products of PFGE. Lane 1, 7, 13, and 20 contained DNA marker (NCTC8325 *S. aureus*); lane 2 through 6, 8 through 12, and 14 through 19 contained clinically-isolated strains.

와 38.8℃로 상향되도록 새로 설계한 AH2-new, AX2-new & AE2-new라는 adaptor를 고안하였다. 이렇게 Tm값을 높여 새로 설계한 adaptors로 IRS-PCR를 실시한 결과, PCR 증폭 산물이 안정적으로 증폭되었다(Fig. 2C).

2. In silico 방법을 통한 *S. aureus*에서의 IRS-PCR 방법론적 확립

In silico server를 통하여 *S. aureus* genomes에서 RFLP 패턴을 미리 예측한 결과, *Xba*I 이용 시 343-522개, *Hha*I 이용 시 3000개 이상, *Eag*I 이용 시 25-29개의 Site를 예측할 수 있었다. 또한 *Xba*I를 이용한 IRS-PCR에서 PX-CG primer를 선택 증폭할 경우 17-23개, PX-GC primer의 경우 26-29개의 밴드 패턴으로 예측되었다. 즉, *Xba*I-*Hha*I

adaptor를 이용한 IRS-PCR 결과는 PX-C primer (PX-N)를 사용할 경우 PCR 증폭산물이 너무 많아 구별이 어려웠지만(Fig. 2B), PX-CG primer (PX-NN)의 경우 PCR산물이 적당하게 증폭되어 IRS-PCR 조건에 최적화되었다(Fig. 2C).

*Eag*I-*Hha*I adaptor를 이용한 IRS-PCR를 수행하여 측정한 결과는 밴드 수가 매우 적고 구별점도 없어, 변별력을 찾기 어려웠다.

3. PFGE, MLST, IRS-PCR 분자역학방법 비교

PFGE와 IRS-PCR을 통해 얻은 대표적인 전기영동 결과는 각각 Fig. 3와 Fig. 4에 예시하였다.

IRS-PCR 결과, 비슷한 패턴의 밴드가 형성되었지만 MLST 형별(Sequence type)을 기준으로 보면 각각의 다른 패턴을 형성하여 변별력을 찾아볼 수 있었다.

총 50주의 MRSA DNA를 *Sma*I 제한효소로 처리하여 PFGE를 수행한 결과를 군집분석하여 얻은 dendrogram을 보면, pulsotype은 80% similarity 수준에서 볼 때 총 5가지(A-E)의 군집으로 분류되었다(Fig. 5).

MRSA DNA를 7가지의 house-keeping gene의 염기서열 분석을 통하여 MLST 형별(Sequence type)을 검사한 결과 총 50주 중 9주가 ST5였으며, 3주가 ST1, 4주가 ST89, 16주가 ST239, 18주가 ST72였다(Table 2).

PFGE similarity 90% 수준에서 볼 때는 ST5 군주내에서 A-1, A-2, A-3으로 3가지 군집, ST1 군주내에서 B-1, B-2로 2가지 군집, ST89 군주내에서 C로 1가지 군집, ST239 군주내에서 D로 1가지 군집, ST72 군주내에서 E-1, E-2, E-3로 3가지 군집으로 나타났고 PFGE similarity 95% 수준에서 볼 때에는 ST5 군주내에서 A-1, A-2, A-3, A-4로 4가지 군집, ST1 군주내에서 B-1, B-2, B-3로 3가지 군집, ST89 군주내에

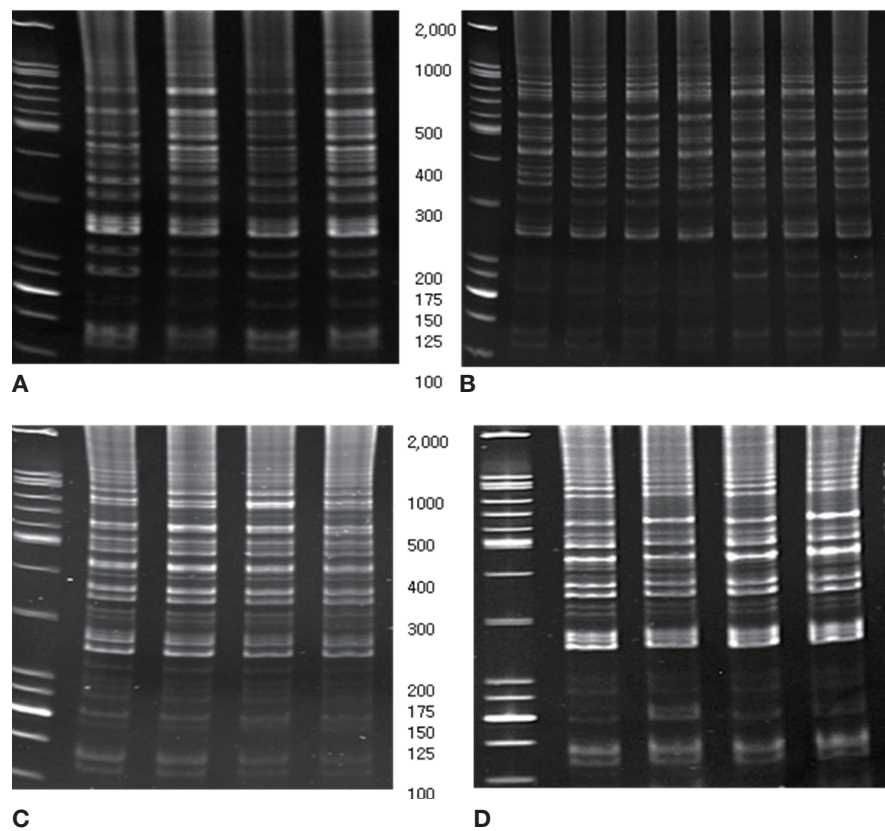


Figure 4. IRS-PCR electrophoretic patterns of MRSA produced by amplification of restricted-ligated XbaI-HhaI DNA using primer PX-CG in MRSA. The lane 1 in each gel contained 25-bp ladders; (A) ST239 isolates. (B) lane 2 to 5 contained ST89 isolates; lanes 6 to 9 contained ST72 isolates. (C) ST1 isolates. (D) ST5 isolates.

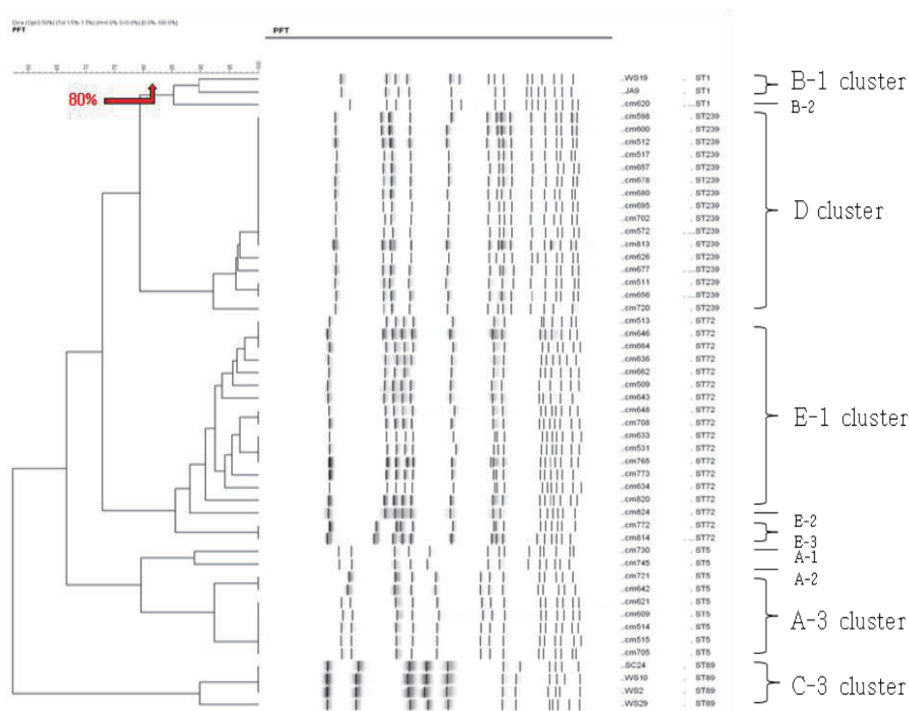


Figure 5. Dendrogram of MRSA in PFGE.

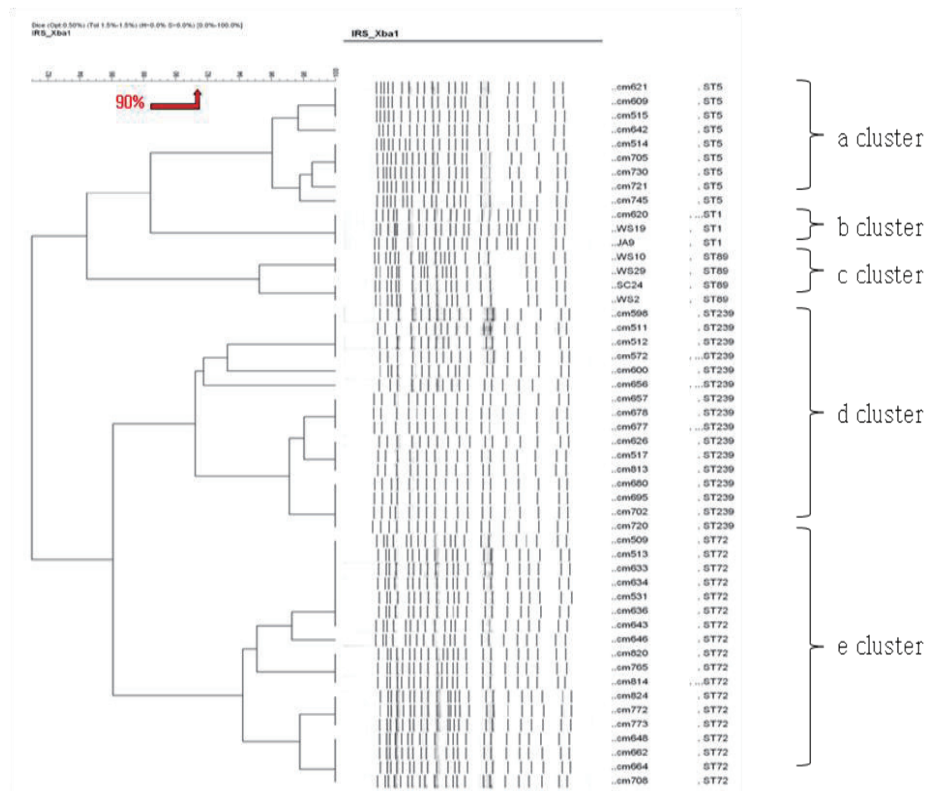


Figure 6. Dendrogram of MRSA in IRS-PCR.

Table 2. Comparison of Genotypes between MLST, IRS-PCR and PFGE

Strain () ^a	MLST	IRS-PCR	PFGE	Strain	MLST	IRS-PCR	PFGE
Cm621 (Kk)	ST5	a	A-3	Cm626 (Sb)	ST239	d	D
Cm609 (Kh)	ST5	a	A-3	Cm517 (Sb)	ST239	d	D
Cm515 (Sb)	ST5	a	A-3	Cm813 (Kk)	ST239	d	D
Cm642 (Kh)	ST5	a	A-3	Cm680 (Sb)	ST239	d	D
Cm514 (Sb)	ST5	a	A-3	Cm695 (Sb)	ST239	d	D
Cm705 (Cs)	ST5	a	A-3	Cm702 (Cs)	ST239	d	D
Cm730 (Sb)	ST5	a	A-1	Cm720 (Cs)	ST239	d	D
Cm721 (Cs)	ST5	a	A-3	Cm509 (Cs)	ST72	e	E-1
Cm745 (Is)	ST5	a	A-2	Cm513 (Sb)	ST72	e	E-1
Cm620 (Kk)	ST1	b	B-2	Cm633 (Cs)	ST72	e	E-1
Ws19 (Ws)	ST1	b	B-1	Cm634 (Cs)	ST72	e	E-1
Ja9 (Ja)	ST1	b	B-1	Cm531 (Cs)	ST72	e	E-1
Ws10 (Ws)	ST89	c	C	Cm636 (Cs)	ST72	e	E-1
Ws29 (Ws)	ST89	c	C	Cm643 (Sb)	ST72	e	E-1
Sc24 (Sc)	ST89	c	C	Cm646 (Kk)	ST72	e	E-1
Ws2 (Ws)	ST89	c	C	Cm820 (Ks)	ST72	e	E-1
Cm598 (Sb)	ST239	d	D	Cm765 (Cs)	ST72	e	E-1
Cm511 (Cs)	ST239	d	D	Cm814 (Kk)	ST72	e	E-3
Cm512 (Sb)	ST239	d	D	Cm824 (Kk)	ST72	e	E-2
Cm572 (Sb)	ST239	d	D	Cm772 (Cs)	ST72	e	E-3
Cm600 (Sb)	ST239	d	D	Cm773 (Kk)	ST72	e	E-1
Cm656 (Sb)	ST239	d	D	Cm648 (Sb)	ST72	e	E-1
Cm657 (Sb)	ST239	d	D	Cm662 (Cs)	ST72	e	E-1
Cm678 (Sb)	ST239	d	D	Cm664 (Kh)	ST72	e	E-1
Cm677 (Sb)	ST239	d	D	Cm708 (Cs)	ST72	e	E-1

^aAbbreviation of hospital name.

서 C-1, C-2로 2가지 군집, ST239 군주내에서 D-1, D-2로 2가지 군집, ST72 군주내에서 E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7로 7가지 군집으로 나타났다(Fig. 5).

반면, *XbaI-HhaI* 제한효소로 처리한 IRS-PCR를 수행한 결과를 군집분석하여 얻은 dendrogram을 보면, 90% similarity 수준에서 총 5가지(a-e)군집으로 분류되었다(Fig. 6).

IRS-PCR similarity 95% 수준에서 볼 때에는 ST5 군주내에서 a로 1가지 군집, ST1 군주내에서 b로 1가지 군집, ST89 군주내에서 c로 1가지 군집, ST239 군주내에서 d-1, d-2, d-3, d-4로 4가지 군집, ST72 군주내에서 e-1, e-2로 2가지 군집구분이 가능하였다. 그리고 ST1 인 b 군집(Ws19, Cm620, Ja9)은 각각 유사도 100%이었다.

같은 MLST ST5와 ST72를 기준으로 보았을 때 IRS-PCR은 모두 같은 밴드 패턴을 보였으나 PFGE의 경우엔 3가지의 밴드 패턴을 볼 수 있었고, ST1를 기준으로 보았을 때에도 IRS-PCR은 모두 같은 밴드 패턴을 보였으나 PFGE의 경우엔 2가지의 밴드 패턴을 볼 수 있었다. 반면에 ST89, ST239는 PFGE, IRS-PCR 모든 방법에서 같은 밴드 패턴을 볼 수 있었다(Table 2).

즉, IRS-PCR과 PFGE의 2가지 형별에서는 같았으나 3가지 형별에서는 다르다는 걸 확인할 수 있었고, MLST와 IRS-PCR의 형별 구분은 일치하였다.

또한 IRS-PCR 뿐만 아니라 MLST, PFGE 모두 병원별 다르지 않았다.

고찰

*S. aureus*은 인간에 기거하는 주요 정상세균총(normal bacterial flora)의 하나이며 코, 인두, 손, 목, 피부, 회음부, 겨드랑이 등 온몸에서 발견되지만 주요 서식처는 전비공(anterior nares)의 편평 상피세포(squamous epithelium)이다[25]. 건강한 숙주에서는 정상세균총의 일부로 존재하지만 특정요인 등에 의해 감염을 일으키는 기회감염균(opportunistic infection)이다. *S. aureus*의 비강 집락형성(nasal colonization)은 감염증의 주요 위험요소이고 높은 분포로 보고되기도 하였다[26]. 특히 전 세계적으로 문제가 되고 있는 MRSA는 농양이나 창상감염 등의 피부감염, 패혈증, 폐렴, 독성쇼크증후군, 식중독 등의 여러 가지 감염을 일으킬 수 있는 중요한 병원성 세균이다. 원내감염의 중요한 원인 균이지만 근래에는 지역사회감염도 증가되고 있다[27]. 질병관리예방본부(Centers for Disease Control, CDC)는 수술창상 또는 입원 후 72시간 이상 경과한 환자의 모든 부위에서 MRSA가 검출되는 경우를 병원 감염(Hospital infection)이라 정의하였고, 그 전에 MRSA가 검출되는 경우를 지역사회 감염(community-associated infection)이라 정의 하였다[28]. CA-MRSA에 의한 감염도 HA-MRSA와 같이 증가되고 있다. 그러므로 본 연구에서 MRSA를 대상으로 역학을 규명하여 대표 균주 여부를 파악하는 것을 주된 목표로 하여 보다 나은 분자생물학적 기법을 확립하고자 하였다.

현재까지 변별력 및 재현도 면에서 다른 형별 분류 방법보다 우월하고 단 기적 변화만을 분석하기 위한 목적으로 PFGE를 사용하지만 고가의 장비가 따로 필요하고 능숙해질 때까지 많은 시간과 노력이 필요한 방법이고 결과를 얻기까지 오랜 시간이 걸리는 단점이 있다.

또한 7개의 house-keeping genes의 염기서열을 분석하여 유형(ST)을 결정하는 MLST는 유전자의 장기적 역학 변동을 반영하고 검사실간 변이가 없어 전세계적 역학을 추정[29] 할 수 있으나 염기서열분석을 위해 수탁한 후 결과를 MLST server를 통해 분석하여 얻으므로 시일이 걸리고 비용도 많이 들었다.

반면 IRS-PCR 방법은 adaptor를 primer와 함께 사용하여 필요한 부위만 선택적으로 짧은 시간 내에 증폭하여 확인하는 방법으로 적은 양으로도 실험이 가능하며 고가의 장비가 필요 없으며 DNA만 준비되어 있으면 하루 만에 결과를 얻을 수 있어 PFGE 보다 적은 시간과 적은 노동력이 필요하였다.

이런 이유로, 현재까지 개발된 분석 방법들과 비교해서 보다 능률적인 대안일 것이라는 기대 하에 본 연구를 수행 하였다. 그러나 과거의 방법을 바탕으로 실험해 보면서 몇 가지 문제점을 발견할 수 있었다. 일단 ligation 단계에서는 회사마다 ligation 반응온도가 달라 모두 사용해 보았다. 실온에서 반응하는 ligation kit를 사용하였을 때 반응을 하지 않아 최종적으로 밴드 형성이 되어지지 않았다. 이에 16°C에서 반응할 수 있는 ligation kit를 사용하였더니 반응을 하여 밴드형성이 되었다. 그러나 최종적으로 두 가지 패턴의 밴드만을 형성하여 변별력이 좋다고 볼 수 없었다. Kit 상의 문제만이 아니었던 것으로 추정되었다. 그래서 다시 adaptor와 primer의 문제점을 찾아 보완하였다.

처음 사용했던 adaptor는 Tm값이 낮아서 좋은 결과를 얻지 못하였

다. 안정성을 높이기 위하여 Tm값을 높여 새로 설계한 adaptors로 IRS-PCR를 실시한 결과, PCR 증폭 산물이 안정적으로 증폭되었다.

그러나 PX-N primer를 사용할 경우 PCR 증폭산물이 너무 많아 구별이 어려웠다. 그래서 PCR 산물이 적당하게 증폭할 수 있게 PX-NN primer를 사용하여 IRS-PCR 조건 최적화시킬 수 있었고 변별력도 향상시킬 수 있었다. 이 외의 각 단계별로의 시간 조절을 해 본 결과 위의 방법의 조건에서 최적의 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 Mazurek GH[13]에서는 ligation 단계 후에 digestion을 잠시 동안 한번 더 반응시킨 후 IRS-PCR를 하였는데 이 단계를 거친 결과와 거치지 않은 결과는 별 차이가 없어 실험 간소화를 위해 이 단계는 생략하였다.

또한 *S. aureus* genomes에서 *SmaI*을 이용 시 RFLP 패턴은 25-37개의 Site를 예측할 수 있어 가장 좋은 제한 효소라 생각할 수 있으나 절편에 blunt ends를 생성하는 제한효소이기 때문에 ligation시 비특이적 결합이나 이에 따라 PCR 증폭시 재현성이 매우 떨어질 수 있는 단점이 있어[20] 이번 연구설계에서는 *SmaI*을 이용한 IRS-PCR 방법은 배제하였다.

최종적으로 전기영동한 결과를 데이터 베이스화하여 형성된 dendrogram을 관찰해 보았을 때 밴드 패턴은 같은데도 ladder의 영향으로 서로 다른 군으로 나뉘게 되는 문제점을 발견하였다.

그 원인은 전기영동 시 polyacrylamide gel이 주위 영향을 쉽게 받는 것이라 생각하여 완충액(Buffer)을 한 번에 만들어 전기영동 시마다 덜어 쓰고 완충액이 담긴 통을 열을 수조에 담아 전기영동을 실시하여 같은 조건으로 맞추어 문제점을 해결 할 수 있었다.

이 연구에서 50주의 MRSA 임상 균주를 분석 한 결과 MLST 시행 시 5가지(ST1, ST5, ST72, ST89, ST239) 형으로 구별되었고, PFGE pulsotype은 80% similarity 수준에서는 총 5가지(A-E) 군집으로 분류되었고 90% similarity 수준에서는 총 10가지 군집으로, 95% similarity 수준에서는 총 18가지 군집으로 분리되었다. 그리고 응용된 IRS-PCR을 시행한 결과 *EagI-HhaI* 사용시에는 뚜렷한 변별력을 찾을 수 없었지만, *XbaI-HhaI* 사용시에는 밴드수가 많고 뚜렷한 구별점을 찾을 수 있어 90% similarity 수준에서는 총 5가지(a-e) 군집으로 분류되었고 95% similarity 수준에서는 총 9가지 군집으로 분리되었다.

MLST 형을 기준으로 하여 IRS-PCR과 PFGE의 결과를 비교해 보았을 때 IRS-PCR의 밴딩 패턴은 PFGE와 거의 일치했다.

검사 소요 시간을 비교해 보면 평균적으로 PFGE는 4일이 소요되고 MLST는 3일이 소요되는 반면 IPS-PCR은 이를 이내로 수행할 수 있었다.

IRS-PCR 방법을 사용시에는 *EagI-HhaI* 조합보다는 *XbaI-HhaI*를 사용하여 형별 변별력을 높일 수 있었다. 용도면에서는 단기간의 동시다발 감염(outbreak)을 분석하기 위해서는 IRS-PCR 방법 보다는 PFGE 방법으로 시행하는 것이 좋을 것으로 본다. 반면에, IRS-PCR 방법이 MLST 보다 시간과, 노력, 비용을 크게 절감할 수 있는 적절한 대안이 될 수 있다고 생각한다.

MRSA 분자역학연구에서 IRS-PCR 방법의 확립은 기존 PFGE와 MLST의 시간적, 경제적 비용을 절감시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한 IRS-PCR이 MRSA 분자역학연구 및 진단에서 그람양성균에도 유용

함을 확인한 바 향후 MRSA 이외의 다른 그람 양성균들에도 대상 범위를 넓힘으로 분자 역학연구의 발전에 기여 할 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2009년 질병관리본부 용역개발과제의 연구개발비지원(5-2010-A0082-00013)에 의해 수행됨.

또한 2008년 3월 18일에 가톨릭대학교 의과대학 생명의학연구윤리(IRB)에서 승인(HCMC08OT007) 받음.

References

- Williams REO, Jevons MP, Shoote RA, Thom BT, Noble WC, Lidwell OM, White RG, Taylor GW. Isolation for the control of staphylococcal infection in surgical wards. *Br Med J* 1962; 2:275-82.
- Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observation during a community-acquired outbreak. *Ann Intern Med* 1982;96:11-6.
- Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1840-6.
- Hussain FM, Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:763-7.
- Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra S, Daum RS. Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18: 410-4.
- Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, Tang AW, Phung TO, Spellberg B. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med* 2005;352:1445-53.
- Chong Y, Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. *J Infect Chemother* 2000;6:189-95.
- Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, Yoon SW, Chang HS, Chang KH, Lee SI, Lee MS, Song JH, Kang MW, Park SC, Choe KW, Pai CH. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. *Am J Infect Control* 2000; 28:454-8.
- Kim HB, Sa CM, Yoo J, Kim BS, Yun OJ, Yoon HR, Lee YS. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from the patients admitted to non-tertiary hospitals. *Korean J Infect Dis* 2000;32:259-63.
- Kim SM, Lee DC, Park SD, Kim BS, Kim JK, Choi MR, Park SY, Hwang SM, Shin NY, Shim ES, Kwon PS, Kwon DY, Hur SH, Kim HJ, Lim HB, Chong Y. Genotype, coagulase type and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dermatology patients and healthy individuals in Korea. *J Bacteriol Virol* 2009;39:307-16.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003;41:5113-20.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1008-15.
- Mazurek GH, Reddy V, Maston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol* 1996;34:2386-90.
- Lally RT, Ederer MN, Woolfrey BF. Evaluation of mannitol salt agar with oxacillin as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1985;22:501-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984;37:67-75.
- Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003;41: 1574-85.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
- Cha HY, Moon DC, Choi CH, Oh JY, Jeong YS, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Chang HH, Kim SW, Lee JC. Prevalence of the ST239

- clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differences in antimicrobial susceptibilities of ST239 and ST5 clones identified in a Korean hospital. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3610-4.
20. Handley SA, Regnery RL. Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent-restriction-site PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3010-5.
21. Dyer DW, Iandolo JJ. Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:283-95.
22. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 1998;36:161-7.
23. 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.
24. 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.
25. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 2001;9: 605-10.
26. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, Harriman K, Harrison LH, Lynfield R, Farley MM; Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* 2005;352:1436-44.
27. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 2005;43:3364-72.
28. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988;16:128-40.
29. Lee WG. Resistance mechanism and epidemiology of vancomycin resistant enterococci. *Korean J Clin Microbiol* 2008; 11:71-7.