

Erythromycin 내성 A군 연쇄구균의 Pulsed-field Gel Electrophoresis를 이용한 유행 조사

이남용, 고은하¹, 김선주¹

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학교실,
경상대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 건강과학원¹

Clonality Analysis Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Erythromycin Resistant Group A Streptococci

Nam Yong Lee, Eun Ha Koh¹, and Sunjoo Kim¹

Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul;
Department of Laboratory Medicine¹, Institute of Health Sciences¹, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju, Korea

Background : Antibiotic resistance of group A streptococci (GAS) is increasing nationwide. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is useful for investigating genetic relationship among outbreaks of bacterial infection. Erythromycin (EM) resistance is mediated by either *ermB*, *ermTR*, or *mefA* gene. The *emm* gene encodes M protein which is the most important virulence factor of GAS.

Methods : The clonal relationship among 56 EM resistant GAS isolated from the children with acute pharyngitis in Jinju was investigated by analysis of chromosomal DNA restriction pattern with *SmaI* enzyme. The *ermB* and *mefA* genes were amplified and *emm* genotype was identified with PCR and sequencing. Their relationship with PFGE pattern was investigated.

Results : The *emm* genotypes were identified as 2, 3, 12, 18, and 75. Mostly *emm*12 had *ermB* gene, while *emm* 3, 18 and 75 had *mefA* resistance gene. All strains with *mefA* gene were not restricted with *SmaI*. The *emm*12 strains showed 5 different PFGE patterns.

Conclusions : The *emm* genotypes were closely related with resistance genes. Analysis of macro-restriction fragment patterns by PFGE showed that EM resistant GAS were polyclonal at least in Jinju. GAS strains with *mefA* gene were not restricted with *SmaI* suggesting *mefA* gene might inhibit chromosomal digestion with *SmaI*. (*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(1):27-30)

Key words : Group A streptococci, PFGE, Erythromycin resistance, Clonality

서 론

A군 연쇄구균(group A streptococci, 이하 GAS)은 세균성 인두염의 가장 흔한 원인으로서는 상기도 감염 환자에

접수번호: CM7-1-2
교신저자: 김선주

(660-280)경남 진주시 칠암동 92
경상대학교병원 진단검사의학과

TEL: (055)750-8239 FAX: (055)762-2696
E-mail: sjkim8239@hanmail.net

서 올바른 진단이 이루어지지 않고 무분별하게 항생제가 남용될 경우 항생제 내성 문제가 심각해 질 수 있는 대표적인 균이다. A군 연쇄구균의 역학조사로서 가장 많이 사용되는 것이 T 항원형과 M 항원형이다. 최근에는 M 항원형 대신에 그 조절 유전자인 *emm* 유전자형을 조사하기도 한다[1-3]. 그러나 동일한 혈청형 혹은 유전자형이라도 집단발생의 원인균이 클론성인지 감별하기 위해서는 항생제 감수성 패턴 분석이나, 플라스미드, 염색체 DNA 제한효소 패턴, 라이보타이핑과 같은 추가적인 방법이 사용되어야 한다[4-5]. Erythromycin (이하 EM) 내성

유전자 중 *ermB*는 구성형 내성을 유도하여 EM에 고도내성을 보인다[6]. 반면 *mefA* 유전자는 M형 내성을 보이며, EM에는 낮은 최소억제농도를 보인다[7]. 최근 국내에서 EM에 대한 내성률이 점차 증가하고 있는데[8,9], 이들 균주들의 항균제 내성 및 분자생물학적인 특성을 살펴볼 필요가 있다. 본 연구에서는 EM 내성인 균주를 대상으로 이들이 클론성으로 집단 발생했는지 연구하고자 하였다. 염색체 DNA 패턴과 항생제 내성 사이의 연관성을 확인하기 위해 급성인두염 환자에서 분리된 EM 내성 GAS를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis (이하 PFGE)를 시행하였다. PFGE는 시간과 노력이 많이 들어가기는 하지만 유전자 전체를 대상으로 분석하기 때문에 분별력이 높고 재현성이 좋아 집단 발생의 원인균을 조사하거나 감염 전과 경로를 파악하는 등 역학적 조사에 표준방법으로 사용되고 있다[10]. 또 연구 대상 균주에 대해 *emm* 유전자형과 EM 내성 유전자인 *ermB*, *mefA* 유전자 유무를 조사하고, 이들과 PFGE 결과와 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상 균주

2001년 11월부터 약 6개월동안 경남 진주에 위치한 소아과의원에서 상기도 감염 환자 246명(남자 123명, 여자 123명)을 대상으로 인두배양을 시행하였다. 그 중 125명(50.8%)이 A군 연쇄구균 양성이었다. 디스크 확산법에 의해 EM에 대한 감수성을 시행하였는데, 그 중 56균주(44.8%)가 내성을 보였다.

2. *emm*형 조사 및 항생제 내성 유전자 조사

EM 내성 균주를 대상으로 *emm* 유전자형과 *ermB*, *mefA* 유전자 유무를 조사하였다. *emm* 유전자형은 유전자 증폭 후 염기서열 분석을 통하여 동정하였다[1-3]. *ermB* 및 *mefA* 두 가지 유전자는 유전자 증폭을 하여 그 유무를 확인하였다[9].

3. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE는 Stanley 등[11]의 방법을 약간 변형하였다. 각각의 균주를 brain heart infusion 액체배지 10 mL에 배양한 후 원심분리로 침전시키고, 세척완충액(10 mL Tris HCl, pH 7.8, 1 M NaCl)으로 3회 세척하였다. 세척된 균을 세척완충액으로 부유시킨 후 동량의 1.3% 저융해도한천(low melting temperature agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA)과 혼합하여 주형(mold)에 부은 후 4℃로 냉각하여 고형화하였다. 각 agarose block을 용해완충액(6 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine)에 넣고

37℃에서 세포를 용해하였다. 37℃에서 항온 처리된 각 agarose block은 4 mL의 단백질해 완충액(0.5 M EDTA, pH 8.0, 10% sodium lauroyl sarcosine)에 proteinase K (2 mg/mL)를 넣어 50℃에서 1일간 방치하였다. 다음날 TE 완충액(10 mM Tris HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA)으로 4회 세척하였고, 고형화 된 세균의 DNA는 30 unit *Sma*I으로 25℃에서 제한효소 처리하였다. PFGE는 CHEF MAPPER system (BioRad Lab., Hercules, CA, USA)를 이용하여 6.0 v/cm, pulse time은 10초에서 35초로 14℃에서 24시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 된 젤은 ethidium bromide (1 µg/mL)로 염색하여 자외선 조사기에서 촬영하였다. 분자량 표지자는 파지 lambda에서 분리한 DNA concatemer를 이용하였다. PFGE로 절단된 DNA 절편 양상의 분석은 Tenover 등이 제시한 기준에 따라 시행하였다[10].

결 과

EM 내성균인 56균주의 염색체 DNA를 *Sma*I으로 처리한 뒤 PFGE를 시행한 결과 5가지의 패턴으로 분류되었다(Fig. 1). *emm* 유전자형은 *emm* 2, 3, 12, 18, 75로 동정되었는데, 유전자형과 PFGE형 간에는 연관성이 관찰되지 않았다. *emm* 2, 18, 75는 대부분 *mefA* 유전자 양성하였고, *emm*12는 대부분 *ermB* 양성이어서, *emm* 유전자형과 내성 유전자간에는 연관성이 관찰되었다. *mefA* 유전자 양성인 *emm* 2, 18, 75는 *Sma*I에 의해 절단되지 않아 모두 non-typeable의 PFGE 패턴을 보였다. *emm*12는 서로 다른 5가지의 다양한 PFGE 패턴을 보였다(Table 1).

M A B C D E

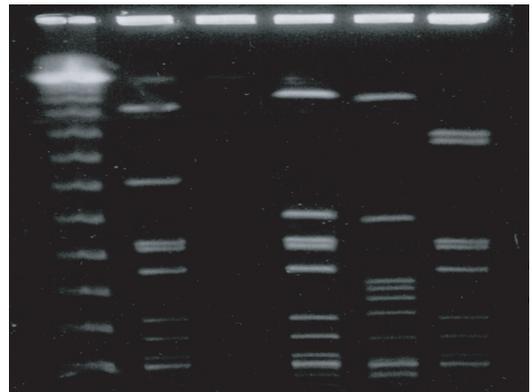


Fig. 1. PFGE pattern of erythromycin resistant group A streptococci restricted with *Sma*I enzyme. Lane M: molecular PFG marker.

고 찰

염색체 DNA 절편 검사는 비록 유전자 삽입과 소실 혹은 무작위 돌연변이 등에 의해 영향을 받기는 하지만 표현형 검사에 비해서는 외부 조건에 의한 영향이 적기 때

Table 1. PFGE pattern according to *emm* types and antibiotic resistance genes

<i>emm</i> type	No. of strains	Resistance gene	PFGE pattern
2	3	<i>mefA</i>	B*
3	1	none	D
12	6	<i>ermB</i>	A
12	1	<i>mefA</i>	B
12	2	<i>ermB</i>	C
12	12	<i>ermB</i>	D
12	1	<i>ermB</i>	E
18	7	<i>mefA</i>	B
18	1	<i>ermB</i>	B
75	22	<i>mefA</i>	B

*B : not-digested with *SmaI* enzyme

문에 정확한 감염원과 병독성이 강한 균주를 찾아내고 감시하며, 감염 유행 양상을 알아내는데 유용하다[10]. 영국에서 Stanley 등[11]이 침습성 질환을 일으킨 GAS에서 R28, M5는 다클론성이었으나, M1, M3, M6, M11형은 동일한 PFGE 패턴을 보였다고 했다. 이탈리아의 Cornaglia 등[12]은 환자에서 분리한 EM 내성균의 PFGE 결과가 서로 다른 패턴으로 다양하게 나와 유전적으로 다양한 균의 전파라고 주장하였다. 반면 일본의 Murase 등[13]은 224명의 환자를 대상으로 한 연구에서 EM 내성균의 82.4%에서 *ermB* 유전자 양성인면서 동시에 동일한 PFGE 패턴을 보여 단일 클론에 의한 전파였다고 보고하였다. 국내에서는 GAS에서 PFGE를 이용한 염색체 DNA 분석에 대한 보고가 많지 않다. Lee 등[15]은 서울지역 환자에서 분리한 균을 대상으로 서로 다른 *emm* 유전자형 사이에는 각각 다른 PFGE 패턴을 보였지만, 같은 *emm* 유전자형은 동일한 PFGE 패턴을 보인다고 하였다. 이 등[16]은 EM, clindamycin에 내성인 균주의 84%에서 혈청형이 T12이면서 동일한 PFGE 패턴을 보여 서로 연관성이 있으며, 역학조사 시 PFGE의 유용성을 주장하였다. 그러나 본 연구에서는 *emm12*는 41%(22/54)에 불과하였으며, PFGE는 5가지 패턴으로 다양하였다. 손 등[16]은 초등학교 보건조사에서 분리한 GAS의 PFGE를 시행한 결과 서로 다른 12가지 패턴을 보였고, T 혈청형과 함께 사용할 경우 교실에서 균주 획득이나 소실을 연구하는 역학조사에 유용하다고 하였다.

mefA 유전자 양성인 M 표현형 33균주는 *SmaI*에 의해 절단되지 않아 모두 non-typeable의 PFGE 패턴을 보였다. 문헌 고찰에 따르면 내성 표현형이 M형인 EM 내성균은 *SmaI*에 의해 절단되지 않는다는 보고가 있었다. 이는 *Coccuza* 등[17]에 의해 이미 보고 되었는데, M형 내성 표현형을 코딩하는 유전자에 *SmaI* 작용부위를 변형시킬 수 있는 유전자가 같이 코딩되어 있고, 이 유전자는 tetracy-

cline 내성 유전자인 *tet*에 의해 작용이 억제된다고 하였다. 이런 현상은 *ermB* 유전자 양성인 GAS는 tetracycline에 감수성 결과와 무관하게 *SmaI*에 의해 절단이 되고, *mefA* 유전자 양성인 GAS에서만 *tet* 유전자와 연관성이 특이하게 관찰된다. Valisena 등[18]은 혈청형이 T4인 *mefA* 양성 GAS 중에서 tetracycline에 감수성인 균주는 *SmaI*으로 절단이 되지 않았기 때문에 *SfiI*으로 처리한 뒤 PFGE를 시행하였고, 그 결과 혈청형은 같지만 유전자형이 서로 다른 다클론성임을 관찰하였다 벨기에의 Descheemaeker 등[19]도 역시 EM 내성균에서 내성 표현형이 M형인 균은 대부분 *SmaI*에 의해 non-typeable이거나 판독이 어려운 패턴을 보였으나, *SfiI*으로 처리한 뒤 시행한 PFGE에서는 다양한 패턴을 보였다고 하였다. 따라서 본 연구에서 non-typeable이었던 *mefA* 양성 EM 내성균은 *Apal*이나 *SfiI*와 같은 제한효소를 사용한 PFGE 패턴 분석이 필요하다고 사료된다.

결론적으로 제한된 균주 수이지만 EM 내성 GAS 균주는 클론성 보다는 *emm* 2, 12, 18, 및 75 등의 유전자형이 다양하게 혼합되어 있으며, *SmaI*에 의한 염색체 분절 패턴은 *emm* 형보다는 항생제 유전자형과 밀접한 연관이 있었다.

요 약

배 경 : A군 연쇄구균(group A streptococci, GAS)의 항생제 내성은 심각한 수준이다. 집단발생의 원인균을 찾거나 감염 전파경로를 파악하기 위해 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)가 유용하게 사용된다. Erythromycin (EM) 내성은 *ermB*, *ermTR*, 혹은 *mefA* 유전자에 의해 매개된다. *emm* 유전자에 의해 코딩 되는 M단백은 GAS의 매우 중요한 독성 인자이다.

방 법 : 상기도 감염 환자의 인두에서 분리된 56균주의 EM 내성균을 대상으로 *SmaI* 염색체 DNA 절편 분석을 시행하여 클론성 여부를 조사하였다. *ermB*와 *mefA* 유전자를 증폭하였고 *emm* 유전자형을 염기서열 분석법으로 동정하였으며, 이들 결과와 PFGE 패턴과의 연관성을 살펴보았다.

결 과 : *emm* 유전자형은 2, 3, 12, 18과 75로 동정되었다. 대부분 *emm12*는 *ermB* 유전자 양성이었고, *emm* 3, 18, 75는 *mefA* 유전자 양성이었다. *mefA* 유전자 양성인 균주는 모두 *SmaI*에 의해 절단되지 않았다. *emm12*는 서로 다른 5가지 PFGE 패턴을 보였다.

결 론 : *emm* 유전자형은 내성 유전자와 밀접한 연관이 있었다. PFGE에 의한 DNA 절편 분석에서 적어도 진주지역에서 EM 내성균은 클론성은 아니었다. *mefA* 유전자를 가진 GAS는 *SmaI*에 의해 절단되지 않아, *mefA* 유전자가 *SmaI*의 작용을 억제한다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 김선주. *emm* 유전자형을 이용한 초등학생에서 분리된 A군 연쇄구균의 역학조사. 대한진단검사의학회지 2002;22:417-23.
2. 김선주 및 김의종. 혈액에서 분리된 A군 연쇄구균의 *emm* 유전자형과 외독소 생산. 대한임상병리학회지 1999;19:672-9.
3. 정현주, 이남용, 권오영, 맹국영, 김선주. 소아과 의원을 방문한 급성인두염 환자의 인후배양과 *emm* 유전자형을 이용한 A군 연쇄구균의 역학조사. 소아감염 2003;10:178-85.
4. Cleary PP, Kaplan EL, Livdahl C, Skjold S. DNA fingerprints of *Streptococcus pyogenes* are M type specific. J Infect Dis 1988;158:1317-23.
5. Haase AM, Melder A, Mathews JD, Kemp DJ, Adams M. Clonal diversity of *Streptococcus pyogenes* within some M-types revealed by multilocus enzyme electrophoresis. Epidemiol Infect 1994;113:455-62.
6. Leclercq R and Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemoth 1991; 35:1267-72.
7. Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol 1996;22: 867-79.
8. 차성호. Erythromycin resistant group A streptococci의 출현과 역학적 중요성. 소아감염 1999;6:29-40.
9. 박수진 및 김선주. 진주지역 초등학생에서 분리된 A군 연쇄구균의 항생제 내성 양상 및 내성 기전. 대한임상미생물학회지 2003;6:7-11.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
11. Stanley J, Linton D, Desai M, Efstratiou A, Geore R. Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease. J Clin Microbiol 1995;33:2850-5.
12. Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A, Masala L, Cascio G, Orefici G. et al. Resistance of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and related antibiotics in Italy. J Infect Dis 1998;27:87-92.
13. Murase T, Suzuki R, Watanabe Y, Yamai S. Erythromycin resistance genes in *Streptococcus pyogenes* isolates in Kanagawa, Japan. Microbiol Immunol 2000;44:863-5.
14. Lee YH, Hwang KJ, Lee KJ, Park KS, Choi YS, Sung HY, et al. Genotypic and phenotypic analysis among clinical isolate of *Streptococcus pyogenes* in Seoul, Korea. J Bacteriol Virol 2001;31:259-68.
15. 이영희, 황규잠, 이광준, 박강수, 배송미, 성화영 등. 국내분리 Erythromycin-Clindamycin 내성 *Streptococcus pyogenes*에 대한 Pulsed Field Gel Electrophoresis 양상 분석. 대한미생물학회지 2000;35:171-80.
16. 손진아, 안돈희, 황규잠, 이영희, 차성호. 정상 소아에서 분리된 *Streptococcus pyogenes*의 Pulsed Field Gel Electrophoresis(PFGE)와 혈청학적 형 분류에 의한 분자학적 역학 연구. 소아과 2000;43:1330-42.
17. Cocuzza CE, Mattina R, Mazzariol A, Orefici G, Rescaldani R, Primavera A, et al. High incidence of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Monza (North Italy) in untreated children with symptoms of acute pharyngo-tonsillitis: An epidemiological and molecular study. Microbiol Drug Resist 1997;3:371-8.
18. Valisena S, Falci C, Mazzariol A, Cornaglia G, Cocuzza CE, Nicoletti P, et al. Molecular typing of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains with the M phenotype isolated in Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:260-4.
19. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, et al. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2000;45: 167-73.