

## 안개 D형 저지원을 갖는 MLS 내성 황색 포도상 구균의 분포와 내성 기전

윤은정 · 김현지 · 권애란 · 최성숙\* · 심미자\*\* · 최응칠#

서울대학교 약학대학 · 종합 약학 연구소, \*삼육대학교 약학과,

\*\*서울시립대학교 생명과학과

(Received April 4, 2006; Revised May 16, 2006)

### Characterization of *S. aureus* Showing MLS Resistance with Foggy D Shape (fMLS)

Eun-Jeong Yoon, Hyunjee Kim, Ae-Ran Kwon, Sung-Sook Choi\*, Mi-Ja Shim\*\* and Eung-Chil Choi#

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Department of pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

\*\*Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**Abstract** — A new type of macrolides, lincosamides and streptogramin B antibiotics (MLS) resistance, showing the characteristic phenotype growing within the inhibition zone area around the clindamycin disk, was identified among clinically isolated *Staphylococcus aureus*. We named the phenotype as MLS resistance with foggy-D shape (fMLS). The average frequency of fMLS isolates was 9%. All of fMLS isolates have only *erm*(A) for the resistance determinant. The growth pattern of the challenged fMLS isolate looks intermediate phase between the patterns of inducible MLS resistance and constitutive MLS resistance.

**Keywords** □ MLS resistance, fMLS, *Staphylococcus aureus*

그람 양성 구균은 원내 감염성 호흡기 질환 및 패혈증의 주요한 원인균이다.<sup>1,2)</sup> 이 그람 양성 구균 감염증의 1차 치료제는  $\beta$ -lactam계 항생물질이나, 이 계열의 항생물질은 앨러지의 위험이 있고, 내성률도 매우 높아 제한적으로만 쓰이고 있다.<sup>3-5)</sup> 이에 대체 치료제로 quinolone계 항생물질 및 macrolides, lincosamides, streptogramin B(MLS) 계 항생물질을 많이 사용하고 있다.<sup>3-5)</sup> 그람 양성 구균 감염증에 대한 MLS계 항생제의 치료 계획을 세우는 데 있어 최소 성장 억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)와 더불어 내성형까지 확인하는 것은 반드시 필요한 지표가 된다.<sup>6-8)</sup>

MLS계 항생물질의 내성형은 디스크법을 이용하여 확인하게 되며, 나타나는 저지원의 모양과 크기에 따라 크게 3가지 형태로 분류한다. 항생제 유출형과 유도 내성형, 그리고 지속성 내성형이 그들이다.<sup>6,8)</sup> 항생제 유출형 내성은 *msr* 유전자에 의해 일어나며, 에너지 의존적으로 MLS계 항생제 중 일부 종류만 선택

적으로 세포막 밖으로 유출하게 되어 그들에 대해 특이적으로 내성을 가지게 되는 형태이다.<sup>9,10)</sup> 유도 내성형과 지속성 내성형은 공히 *erm* 유전자에 의해 일어난다. 유도 내성형의 경우에, MLS계 항생제 중 일부가 유도제로 작용하여 다른 계열 항생제의 내성을 유도하기 때문에 디스크법 실험을 할 경우에 유도제가 있는 쪽의 저지원이 찌그러지는 D형의 저지원을 가지게 된다. 지속성 내성균의 경우에는 별도의 내성 유도 과정이 없이도 지속적으로 MLS계 항생제 전반에 관해 내성을 가지게 하여 디스크법을 시행할 경우에 저지원이 하나도 나타나지 않게 된다.<sup>9,10)</sup> 지속성 내성형 균주의 경우에는, MLS계 항생제 이외의 다른 항생제의 사용을 고려하게 되며, 유도성 내성형 균주들은 내성 유도제로 판정 받은 항생제의 사용을 제한하게 된다. 이렇게 항생제를 이용한 치료 계획을 세움에 있어 내성형의 확인 및 분류는 매우 중요한 단서가 되므로 이를 정확하게 확인하는 과정이 반드시 필요하다.<sup>6-8)</sup>

임상 분리 그람 양성 구균의 내성형을 분석하던 중, 일부 임상 분리 균주들 중 지속성 내성형과 유도성 내성형의 특징을 공유하고 있는 특이한 내성형 균주를 확인하였다. 이러한 특징을 안개형 저지원을 가지는 MLS 내성형 균주, 즉 fMLS(MLS

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802  
(E-mail) ecchoi@snu.ac.kr

**Table I** – Primer sequences and annealing temperature used in the PCR for detection of *erm* gene

Name	Primer sequence	Product size (base pairs)	Annealing temperature
<i>erm</i> (A)	5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3 <sup>a</sup> 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3 <sup>b</sup>	421	50°C
<i>erm</i> (B)	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3 <sup>a</sup> 5'-ATGAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3 <sup>b</sup>	639	50°C
<i>erm</i> (C)	5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3 <sup>a</sup> 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3 <sup>b</sup>	572	50°C
<i>msr</i> (A)	5'-GGACAATAAGAGTGTTTAAAGG-3 <sup>a</sup> 5'-AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT-3 <sup>b</sup>	940	50°C

<sup>a</sup>Upper primer.<sup>b</sup>Lower primer.

resistance with foggy-D shape)라고 명명하고 이에 대한 내성 기전 연구를 수행하여 그 일부를 규명하였다.

## 실험 방법

### 항생물질과 세균 균주

MLS계 항생제로는, 14환 macrolide계 항생물질인 erythromycin(Sigma Chemical Co., MO, USA), 16환 macrolide계 항생물질인 josamycin(ICN Biomedical, CA, USA), lincosamide계 항생물질인 clindamycin(Sigma Chemical Co., MO, USA)을 사용하였다. 세균 균주는 서울의 3차 의료기관에서, 1999년과 2001년, 그리고 2003년과 2005년에 임상적으로 분리된 황색 포도상구균 1111주를 사용하였다.

### MIC의 측정

실험 대상 균종에 대한 항생물질의 최소 억제 농도 측정은, Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI, USA)의 고체 배지 희석법에 의하여 실시하였다.<sup>11)</sup> Mueller Hinton agar(MHA; Difco, MD, USA) 배지에 접종하여, 37°C에서 17시간 동안 배양하였다. 항생물질은 최고 농도를 64 µg/ml가 되도록 하여, 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최저농도 0.06 µg/ml가 되도록 항생물질 희석계열을 만들었다. 각 항생물질의 농도는 CLSI에서 권장하는 ATCC 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC25923를 이용하여 품질 관리하였다. 여기에 전 배양한 균액을 희석하여 최종 균액 농도가 10<sup>5</sup> CFU/ml가 되도록 한 뒤, 미량 접종기(Sakuma Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 이용하여 5 µl씩 접종하였다. 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였고, 내성의 기준은 CLSI의 breakpoint를 따랐다.

### 내성 표현형

실험 대상 균종에 대한 내성 표현형은, CLSI의 디스크법에 의하여 실시하였다. 진탕 배양한 균액을 MHA 배지에 도말한 후, erythromycin 15 µg, josamycin 15 µg과 clindamycin 2 µg이 포

합된 종이 디스크를 서로간의 간격이 15 mm가 되도록 놓았다. 37°C에서 17시간 동안 배양한 후 생기는 저지원의 모양과 크기로 그 내성형을 판단하였다.

### 내성 유전자의 검색

Genomic DNA extraction kit인 G spin<sup>TM</sup>(INtRON, Gyeonggi, Korea)를 이용하여, macrolide계 항생물질에 내성인 균주의 genomic DNA를 얻었다. 이 genomic DNA와 3쌍의 *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) primer을 이용하여 multiplex PCR을 한 뒤에 전기 영동을 통하여 어떤 유전자를 가지고 있는지 확인하였다. *msr*(A)에 해당하는 1쌍의 primer을 이용하여 PCR로 *msr*(A) 유전자도 확인하였다.<sup>12)</sup> 이때 사용한 primer의 sequence와 반응 조건은 Table I과 같다. Primer는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서 합성한 것을 이용하였으며, PCR은 Peltier thermocycler(MJ Research, MA, USA)를 이용하였다. 최초에 95°C에서 5분간 denaturing을 하고, 이어 97°C에서 10초, Table I에 명기된 primer별 annealing 온도에서 1분, 74°C에서 1분 간의 반응을 28 회 반복하여 증폭한 뒤, 74°C에서 10분간 마무리 elongation을 하였다.<sup>12)</sup>

### 성장곡선

안개형 저지원을 가지는 균주를 Mueller Hinton broth(MH; Difco, MD, USA)에서 전 배양하여 중간 지수기까지 키운 후, erythromycin을 최종 농도 0.1 µg/ml가 되도록 첨가하여 1시간 30분 동안 내성을 유도하였다. 파장 590 nm 에서의 흡광도를 측정하여, 내성을 유도한 균과 그렇지 않은 균액의 농도를 OD 0.05가 되도록 균일하게 맞추었다. 그리고, clindamycin을 최종 농도 10 µg/ml이 되도록 첨가하여 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 매 시간마다 균액을 채취하여 OD 값을 재어 기록하며 21시간 동안의 성장곡선을 그렸다. 성장곡선의 변화양상을 비교하기 위해 감수성 균, 유도성 내성형을 가지는 균 및 저속성 내성형을 가지는 균의 성장곡선도 같은 조건으로 그려보았다.

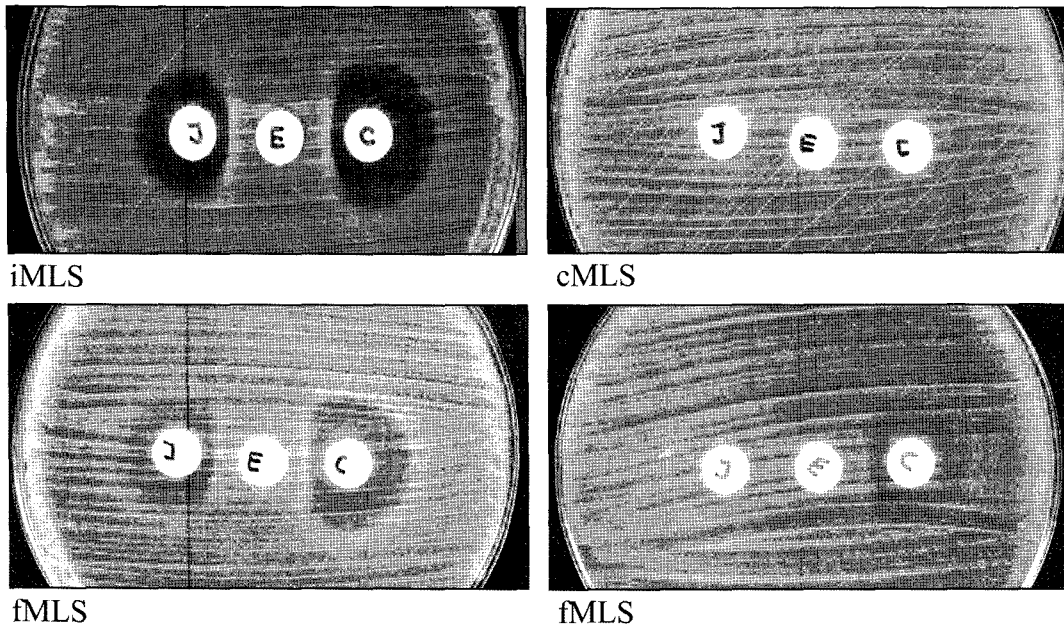


Fig. 1 – Phenotype of fMLS. The disks labeled with J contain 15 µg of josamycin, E contain 15 µg of erythromycin and C contain 2 µg of clindamycin per disk. The figure upper left shows the typical form of iMLS phenotype with D-shaped inhibition zone area of josamycin and clindamycin. Also, the figure upper right is the typical form of cMLS phenotype. Two other figures lower show fMLS phenotypes which show the slight growth of bacteria within inhibition zone area of josamycin and clindamycin.

실험 결과 및 고찰

MLS계 항생물질에 내성을 가질 것으로 추정되는 erythromycin 내성 황색 포도상 구균에 대해 디스크 법으로 MLS 계 항생물질 내성 표현형을 조사한 결과 기존의 유도성 내성 표현형과 지속성 내성 표현형 균주 이외에 안개형 저지원 균주가 확인되었다 (Fig. 1). 이 안개형 저지원을 가지는 균주는 D 모양의 전형적인 유도성 내성형의 저지원을 가지면서도, 저지원 안에서 균의 생장이 관찰되는 특이한 내성형을 보였다. 오염인지를 알아보기 위한 순수 분리 배양 실험을 여러 차례에 걸쳐 실시하고 저지원 안과 밖에서 성장한 균을 형태, 생화학적 성질 및 항생물질에 대한 감수성 내성면에서 비교한 결과 동일하였다. 따라서, 오염에 의한 현상이 아닌, 균종이 가지는 특이적인 내성형인 것으로 판정

하였다. 포도상 구균, 장구균, 연쇄상 구균 등의 그람 양성 구균을 대상으로 내성형을 검토하였을 때 안개형 저지원의 특징을 가지는 균주는 황색 포도상 구균에서만 확인되었다. 전체 임상 분리 황색 포도상 구균 중에서 안개형 저지원을 가지는 균주들의 발현 빈도는 Table II과 같다. 연구 대상 전체 균주 중 9.0%가 안개형 저지원 내성 표현형을 나타냈으며, 연도별로 볼 때에는 1999년도 균주에서는 10.8%, 2001년도 균주에서는 8.0%, 2003년도 균주에서는 4.8%, 2005년도 균주에서는 9.0%가 그런 내성 표현형을 보여 연도별 증감 현상은 아직은 인정되지 않았다. 이들 균주들은 내성 원인 유전자로 모두 *erm(A)* 유전자를 가지고 있었으며, *erm(B)*나 *erm(C)*, *msr(A)* 등 MLS 내성형의 원인이 되는 다른 유전자는 가지고 있지 않았다. 반면, 유도 내성형 및 지속성 내성형을 보이는 황색 포도상 구균 균주들은 *erm(A)*와

Table II – The frequency of fMLS among clinically isolated *S. aureus*

		iMLS	fMLS	cMLS	Total MLS	Susceptible	Total
1999	No. of isolates	72	69	340	481	155	636
	%	11.3	10.8	53.5	75.6	24.4	100
2001	No. of isolates	7	10	67	84	41	125
	%	5.6	8.0	53.6	67.2	32.8	100
2003	No. of isolates	37	12	88	137	113	250
	%	14.8	4.8	35.2	54.8	45.2	100
2005	No. of isolates	6	9	53	68	32	100
	%	6.0	9.0	53.0	68.0	32.0	100
Total	No. of isolates	122	100	548	770	341	1111
	%	11.0	9.0	49.3	69.3	30.7	100

cMLS: Constitutive MLS resistance; iMLS: Inducible MLS resistance; MLS: MLS resistance

Table III - Genotype of fMLS

Gene	erm(A)	erm(B)	erm(C)	msr(A)
iMLS	+/-	-	+/-	-
fMLS	+	-	-	-
cMLS	+/-	-	+/-	+/-

+; Detected in all  
 -; Not detected in all  
 +/-; Detected in some of them

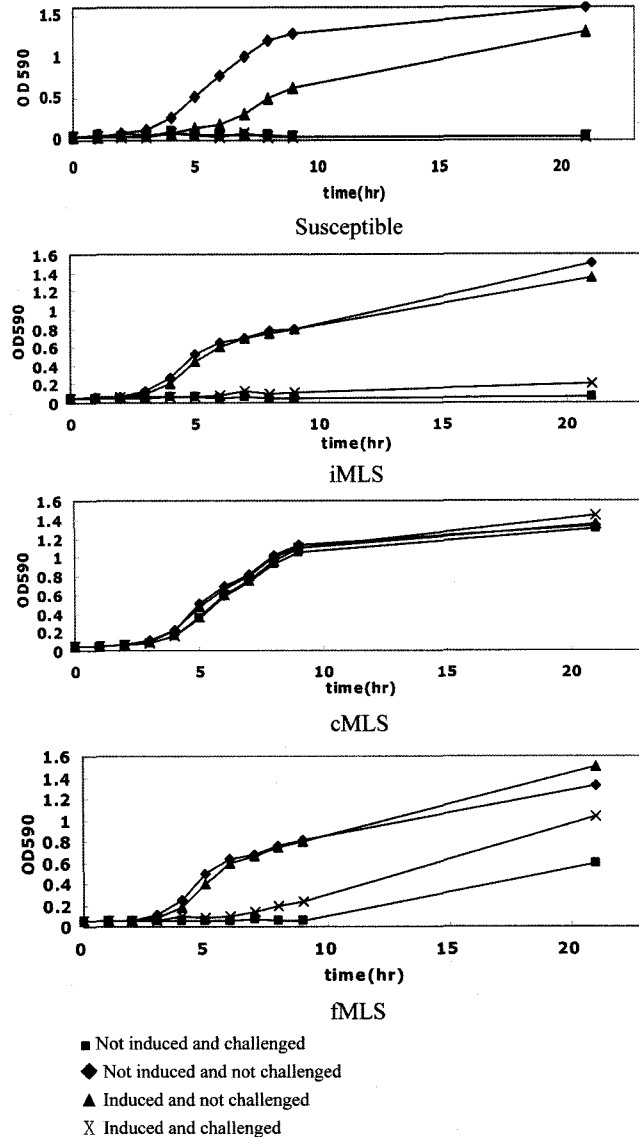


Fig. 2 - Growth curve through the phenotype.

erm(C), 그리고 msr(A) 등 다양한 내성 유전자를 가지고 있었다 (Table III).

전형적인 형태의 유도 내성형 균주 및 지속성 내성형 균주와 함께 안개형 저지원을 가지는 균주의 성장곡선을 그려 그 차이 점을 비교해 보았다(Fig. 2). 안개형 저지원을 가지는 황색 포도

상 균주의 경우, erythromycin으로 유도 처리하였을 때 그 성장 속도가 처리하지 않은 경우에 비해 빨랐으며 따라서 지수기에 진입하는데 걸리는 시간이 단축되었다. 이는 유도 처리 전후에 아무런 변화가 없는 지속성 내성균이나 유도 처리를 시키지 않을 경우에 그 생장이 완전히 억제되는 유도성 내성형 균주와는 차이가 있는 현상으로 안개형 저지원 균주의 특성으로 간주되었다.

이러한 안개형 저지원 균주의 경우에 임상 실험실의 실험자로 하여금 정확치 않은 감수성 및 내성형의 보고를 하도록 유도할 수 있다는 점에서 특히 주의해서 확인해야 할 내성형이라고 할 수 있다. 이러한 안개형 저지원 균주는, 미국에서 그 존재가 보고된 적은 있으나,<sup>13)</sup> 이러한 현상에 대한 검증이나 기전의 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다. MLS계 항생물질에 대해 내성을 나타내는 황색 포도상 구균에서 이와 같은 안개형 저지원 내성 표현형은 아마도 유도형 내성 표현형에서 지속성 내성 표현형으로 변이되는 과정의 중간형으로 추정된다. 이 내성에서는 관여 유전자로 erm(A)가 확인되었으므로 erm(A) 유전자의 promotor와 leader peptide의 변이를 예상할 수 있다. 이 변이를 추적할 경우, 유도성 내성형에서 지속성 내성형으로 변화하는 단계를 확인할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 다른 원인에 의한 영향도 그 가능성을 배제할 수 없으므로 보다 폭 넓은 연구가 필요하다. 한편 최신의 임상 균주의 내성형을 확인하면서, 이들 내성형을 가지는 균주의 비율이 지속적으로 유지될 것인지도 지켜 볼 필요가 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었으며 (0409-2004-0094), 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Nouwen, J. L. : The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 5(12), 751 (2005).
- 2) Jacobs, M. R., Anon, J. and Appelbaum, P. C. : Mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin. Lab. Med.* 24(2), 419 (2004).
- 3) Felmingham, D., Reinert, R. R., Hirakata, Y. and Rodloff, A. : Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 50 Suppl S1, 25 (2002).
- 4) Uh, Y., Jang, I. H., Hwang, G. Y., Lee, M. K., Yoon, K. J. and Kim, H. Y. : Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide

- resistance genes of beta-hemolytic streptococci in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(7), 2716 (2004).
- 5) Shobha, K. L., Rao, P. S. and Thomas, J. : Survey of *Staphylococcus* isolates among hospital personnel, environment and their antibiogram with special emphasis on methicillin resistance. *Indian J Med Microbiol.* **23**(3), 186 (2005).
- 6) Giovanetti, E., Montanari, M. P., Mingoia, M. and Varaldo, P. E. : Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(8), 1935 (1999).
- 7) Clarebout, G., Nativelle, E., Bozdogan, B., Villers, C. and Leclercq, R. : Bactericidal activity of quinupristin-dalfopristin against strains of *Staphylococcus aureus* with the MLS(B) phenotype of resistance according to the erm gene type. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**(5), 444 (2004).
- 8) Clarebout, G., Nativelle, E. and Leclercq, R. : Unusual inducible cross resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B by methylase production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* **7**(4), 317 (2001).
- 9) Prieto, J., Calvo, A. and Gomez-Lus, M. L. : Antimicrobial resistance: a class effect? *J. Antimicrob. Chemother.* **50** Suppl S2, 7 (2002).
- 10) Arthur, M., Brisson-Noel, A. and Courvalin, P. : Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamides and streptogramin antibiotics: data and hypotheses. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**(6), 783 (1987).
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th Informational Supplement. Document M100-S15, CLSI, Wayne, PA (2005).
- 12) Lim, J. A., Kwon, A. R., Kim, S. K., Chong, Y., Lee, K. and Choi, E. C. : Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**(3) 489 (2002).
- 13) Steward, C. D., Raney, P. M., Morrell, A. K., Williams, P. P., McDougal, L. K., Jevitt, L., McGowan, J. E. Jr. and Tenover, F. C. : Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**(4), 1716 (2005).