

## 임상 분리 그람 양성 구균에 대한 MLS계 항생물질의 내성

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

서울대학교 약학대학 · 종합 약학 연구소, \*삼육대학교 약학과, \*\*서울시립대학교 생명과학과

(Received April 4, 2006; Revised May 22, 2006)

### The Study of MLS-Resistant Gram Positive Cocci Isolated in a Korean Hospital

Eun-Jeong Yoon, Jong-Min Yoon, Sung-Sook Choi\*, Ae-Ran Kwon, 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 total of 398 strains of *Staphylococcus aureus* (99), coagulase-negative staphylococci (CNS) (99), enterococci (100), *Streptococcus pyogenes* (18) and *Streptococcus agalatiæ* (82) were in Korean tertiary hospital from Dec. 2004 to Mar. 2005. When minimal inhibitory concentrations (MIC), phenotypes and genotypes were determined, 70% of *S. aureus*, 65.7% of CNS, 78% of enterococci and 37.8% of *S. agalatiæ* were resistant to erythromycin and 95.7% of erythromycin-resistant (EMR) *S. aureus*, 92.3% of EMR CNS and all of EMR enterococci and *S. agalatiæ* had *erm* of the methylase gene or *msr(A)* of the efflux gene.

**Keywords** □ macrolide resistance, *Staphylococcus aureus*, CNS, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalatiæ*, enterococci

병원균의 내성균화 경향을 연구하는 것은 치료 방향을 결정하고 집단 내에서의 항생제 사용을 관리하는데 중요한 단서가 된다.<sup>1-4</sup> 그람 양성 구균은 기관지염, 폐렴 등의 원내 감염 호흡기 감염증과 폐혈증 등의 중요한 감염증을 일으키는 임상적으로 중요한 병원균이다.<sup>5,6</sup> 이들 그람 양성 세균 감염증을 치료하는 데 1차 선택 약물로 사용되는  $\beta$ -lactam계 항생물질은 내성율이 높을 뿐 아니라 알레르기의 위험이 있어 그 사용에 제약이 있다는 단점이 있는데, 이에 2차 치료제로 퀴놀론계 항생물질과 더불어 macrolide-lincosamide-streptogramin(MLS)계 항생물질의 이용률이 높아지고 있다.<sup>7-9</sup> 다만 이 MLS계 항생물질의 내성빈도가 매우 높은 편이어서 최신의 임상 균주를 이용하여 그 내성율의 추이를 보는 것이 반드시 필요하고, 또한 MLS계 항생물질은 그 내성형에 따라 치료 방향이 달라지게 되므로 disk 법을 통해 내성형까지 확인해야한다.<sup>8,10-15</sup>

이에 본 연구에서는, 그람 양성 구균 감염증의 대표 원인 균종인, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci

(CNS), enterococci, *Streptococcus pyogenes*와 *S. agalatiæ* 중 최근에 수집된 임상 균주에 대해 주요 MLS계 항생물질의 최소 억제 농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정하고, 내성형과 그 기전을 규명함으로써 현재 우리나라에서 사용되고 있는 이들 항생물질이 임상적으로 계속 유효한가를 예측하였다.

서울의 연세대학교 세브란스 병원에서, 2004년 12월부터 2005년 3월에 걸쳐 임상에서 분리된 *S. aureus* 99주, CNS 99주, enterococci 100주, *S. pyogenes* 18주, *S. agalatiæ* 82주를 사용하였다. MLS계 항생물질은 14환 macrolide계 항생물질인 erythromycin(Sigma Chemical Co., MO, USA), 15환 macrolide계 항생물질인 azithromycin(Pfizer Inc., NY, USA), 16환 macrolide계 항생물질인 josamycin(ICN Biomedical, CA, USA), lincosamide계 항생물질인 clindamycin(Sigma Chemical Co., MO, USA), streptogramin계 항생물질인 synergid(Rhone Poulenc Rorer, UK)를 사용하였다. 비교 항생제로는, oxacillin(Sigma Chemical Co., MO, USA), ampicillin(Sigma Chemical Co., MO, USA)과 vancomycin(Amersham life science, Uppsala, Sweden)을 사용하였다.

항생물질의 최소 억제 농도는 Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI; USA)의 고체 배지 희석법에 의하여 실시하였다.<sup>16</sup>

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

*S. aureus*와 CNS는 Mueller Hinton agar(MHA; Difco, MD, USA) 배지, enterococci는 Brain Heart Infusion agar(BHI; Difco, MD, USA)배지, *S. pyogenes*와 *S. agalatae*는 최종 5%의 horse serum을 포함하는 BHI agar 배지에 각각 접종하여, 37°C에서 17시간 동안 배양하였다. 단, oxacillin과 ampicillin, vancomycin의 경우는 24시간 동안 배양하였다. 항생물질은 최고 농도를 64 µg/ml가 되도록 하여, 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최저농도 0.06 µg/ml가 되도록 항생물질 희석계열을 만들었다. 여기에 전배양한 균액을 희석하여 최종 균액 농도가 10<sup>6</sup> CFU/ml가 되도록 한 뒤, microinoculator(Sakuma Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 이용하여 5 µl씩 접종하였다. 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였고, 내성의 기준은 CLSI의 breakpoint를 따랐다. *S. aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *S. pneumoniae* ATCC49619를 표준 균주로 사용하였다.

내성 표현형은, CLSI의 disk test 법에 의하여 실시하였다.<sup>16)</sup> 진탕 배양한 균액을, 균종의 성장에 적합한 배지에 도말한 뒤, erythromycin 15 µg과 josamycin 15 µg, clindamycin 2 µg이 각각 함유된 디스크를 놓아 배양하여 나타나는 내성형을 확인하였다. G-spin<sup>TM</sup>(INtRON Biotechnology, Gyunggido, Korea)를 이용하여, 균주의 genomic DNA를 얻고 이 genomic DNA와 3쌍의 *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) primer을 이용하여 multiplex PCR을 한 뒤에 전기 영동을 통하여 어떤 gene을 가지고 있는지 확인하였다. *erm*(A) (5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3'과 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3'), *erm*(B) (5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'과 5'-ATGAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'), *erm*(C) (5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT-

TCC-3'과 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3')에 대한 유전자 증폭 반응은 최초에 95°C에서 5분간 denaturing을 하고, 이어 97°C에서 10초, 54°C에서 1분, 74°C에서 1분 간의 반응을 28회 반복하여 충분히 증폭한 뒤, 74°C에서 10분간 마무리 elongation을 하였다. 유전자 *msr*(A)는 프라이머(5'-GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG-3'와 5'-AAGTTATATCATGAATAGATGTGCTCTGTT-3')를 이용하여 annealing 온도만 50°C로 조정하여, *erm* 유전자를 확인하는 방법과 동일한 방법으로 확인하였다. 프라이머는 바이오니아회사(Daejon, Korea)에서 합성한 것을 이용하였으며, PCR은 Peltier thermocycler(MJ Research, MA, USA)를 이용하였다.

각 균주에 대한 항생물질 별 최저 및 최고 MIC와 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, 내성율을 Table I에 나타내었다. VRE의 비율은 13.0%이었으며, MRSA와 MRCNS는 각 72.7, 82.8%였다. *S. pyogenes*를 제외한 모든 균주에서, MLS계 항생물질의 내성율은 매우 높았다. 이는 이전에 한국에서 분리된 임상균주의 내성율보다는 조금 낮아져보이나<sup>15)</sup> 여전히 다른 나라들과 비교해 높은 수준을 유지하고 있다.<sup>14,17,18)</sup> *S. pyogenes*는 josamycin을 제외한 다른 macrolide계 항생제 모두에 대해 내성 균이 전혀 발견되지 않았는데, 감수성 시험을 시행한 균주의 수가 매우 적으므로 *S. pyogenes*의 전반적인 현상이라고 결론지을 수는 없으며, 좀 더 광범위한 연구가 필요하다.

Erythromycin에 내성을 보이는 균주들을 대상으로 그 내성형과 내성의 원인이 되는 유전자를 확인해 보고 그 결과를 Table II와 III에 나타내었다. MLS 타입의 모든 균종에서 유도내성형보다는 지속성 내성형이 많이 발견되었다. 특히 enterococci의 경우에는, 모든 MLS형이 지속성 내성형을 보였다. 이렇게 지속성

Table I - Susceptibility of gram positive cocci

	<i>Staphylococcus aureus</i> (99)				Coagulase-negative staphylococci (99)				Enterococci (100)			
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)
Erythromycin	0.5-≥64	≥64	≥64	70.7	0.125-≥64	≥64	≥64	65.7	0.125-≥64	≥64	≥64	78.0
Azithromycin	1-≥64	≥64	≥64	70.7	1-≥64	≥64	≥64	78.8	0.125-≥64	≥64	≥64	80.0
Josamycin	2-≥64	≥64	≥64	98.0	0.5-≥64	8	≥64	51.5	0.5-≥64	≥64	≥64	81.0
Clindamycin	0.125-≥64	≥64	≥64	61.6	≤0.06-≥64	0.5	≥64	44.4	≤0.06-≥64	≥64	≥64	ND
Synercid	0.25-4	1	2	1.0	0.125-4	0.5	2	2.0	1-≥64	32	≥64	79.0
Oxacillin	0.5-≥64	≥64	≥64	72.7	0.125-≥64	4	≥64	82.8	2-≥64	≥64	≥64	91.0
Vancomycin									0.5-≥64	2	≥64	13.0

  

	<i>Streptococcus pyogenes</i> (18)				<i>Streptococcus agalatae</i> (82)			
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)
Erythromycin	≤0.06-0.125	≤0.06	0.125	0.0	≤0.06-≥64	≤0.06	≥64	37.8
Azithromycin	≤0.06-0.5	0.25	0.25	0.0	≤0.06-≥64	0.5	≥64	43.9
Josamycin	0.25-4	0.5	2	16.7	0.125-≥64	1	≥64	47.6
Clindamycin	≤0.06-0.25	≤0.06	0.125	0.0	≤0.06-≥64	1	≥64	53.7
Synercid	≤0.06-0.25	0.125	0.25	0.0	0.25-8	0.5	1	2.4
Ampicillin	0.25-0.5	0.5	0.5	55.6	0.25-≥64	1	2	98.8

Table II - Phenotype of erythromycin resistant Gram positive cocci

Phenotype	<i>Staphylococcus aureus</i>		Coagulase-negative staphylococci		Enterococci		<i>Streptococcus viridans</i>	
	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%
S	29	29.3	34	34.3	22	22	51	62.2
MLS	70	70.7	65	65.7	78	78	31	37.8
iMLS	7	7.1	9	9.1	0	0	2	2.4
cMLS	61	61.6	43	43.4	78	78	29	35.4
M	2	2.0	13	13.1	0	0	0	0
Total	99	100	99	100	100	100	82	100

Table III - Genotype of erythromycin resistant Gram positive cocci

Gene	<i>Staphylococcus aureus</i>		Coagulase-negative staphylococci		Enterococci		<i>Streptococcus agalatae</i>	
	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%
<i>erm</i> (A)	66	94.3	12	18.5	2	2.6	1	3.2
<i>erm</i> (B)					70	89.7	30	96.8
<i>erm</i> (C)	1	1.4	31	47.7				
<i>msr</i> (A)			12	18.5				
<i>erm</i> (A)+ <i>erm</i> (B)								
<i>erm</i> (A)+ <i>erm</i> (C)					6	7.7		
<i>erm</i> (C)+ <i>msr</i> (A)			5	7.7				
Not detected	3	4.3	5	7.7				
Total	70	100	65	100	78	100	31	100

내성형 균주의 비율이 높은 것은, 우리나라에서 분리된 임상균주에서 특히 현저하게 발견되는 현상으로 보이며, 그에 대해서는 지속적인 탐색 및 원인규명을 위한 연구가 필요하다.<sup>14)</sup> Efflux pump가 작동하는 대표적인 형태인 M형의 내성형을 나타내는 균종은, *S. aureus*와 CNS에서만 각 2종, 13균종이 확인되었다. 내성형을 확인하는 과정에서, iMLS와 같은 D형을 보이나 그 저지환 안에서 균주의 생장을 확인할 수 있는 특이한 내성형의 균주들을 발견하였다. 이들 균주에 대해, 저지환의 안쪽에서 자라는 균과 저지환의 밖에서 자라는 균의 혼재 가능성을 하였으나, 이는 오염이 아닌 균종의 특이적인 내성형인 것으로 밝혀졌으며, 이러한 현상에 대한 분자적 의미에서의 원인은 후속 연구에서 계속 진행될 것이다.

MLS 내성형을 보인 균주들 중 95.7%의 *S. aureus*, 73.8%의 CNS, 그리고 enterococci와 *S. agalatae*의 전부가 *erm* 유전자에 의한 것이었다. 그 중에서도 *S. aureus*의 경우에는 *erm*(A) 단독이, CNS의 경우에는 *erm*(C)단독이, 그리고 enterococci와 *S. agalatae*의 경우에는 *erm*(B) 단독이 가장 많은 부분을 차지하는 원인이었다. *msr*(A) gene은 CNS에서만 확인하였다.

그람 양성 구균의 MLS계 항생제에 대한 내성율은 매우 높은 편이다.<sup>15)</sup> 특히 그 내성형은 cMLS가 대부분이다.<sup>15)</sup> cMLS의 내성형을 가지는 staphylococci의 경우에는 14환계 macrolide의 변형으로 새롭게 만들어져 차세대 항생물질로 주목받고 있는 ketolide계 항생제에도 내성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 임상시험 결과 없이 경험적으로 MLS계 항생제의 효과를 기대하기는 어렵고, 내성형의 확인을 포함하는 임상검사 후에

MLS계 항생제를 사용하는 것이 필요하다. 또한 새로운 항생제의 새로운 개발 노력이 필요하다.

### 감사의 말씀

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

### 참고문헌

- 1) Lode, H. : Management of serious nosocomial bacterial infections: do current therapeutic options meet the need?. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**(10), 778 (2005).
- 2) Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B. : Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**(3), 309 (2004).
- 3) Alanis, A. J. : Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **36**(6), 697 (2005).
- 4) Jones, R. N. : Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* **24**(1), 121 (2003).
- 5) Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. and Nouwen, J. L. : The role

- of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**(12), 751 (2005).
- 6) Jacobs, M. R., Anon, J. and Appelbaum, P. C. : Mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin. Lab. Med.* **24**(2), 419 (2004).
  - 7) 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 compatative *in vitro* activity of the ketolide, telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, Suppl S1, 25 (2002).
  - 8) 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).
  - 9) 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).
  - 10) von Eiff, C. and Peters, G. : Comparative *in vitro* activity of ABT-773 and two macrolides against staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**(1), 189 (2002).
  - 11) Hamilton-Miller, J. M. and Shah, S. : Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**(6), 941 (2000).
  - 12) Kim, S., Yong Lee N. : Antibiotic resistance and genotypic characteristics of group a streptococci associated with acute pharyngitis in Korea. *Microb. Drug. Resist.* **10**(4), 300 (2004).
  - 13) Bejuk, D. : Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant streptococci. *Acta. Med. Croatica.* **58**(4), 301 (2004).
  - 14) Delialioglu, N., Aslan, G., Ozturk, C., Baki, V., Sen, S. and Emekdas, G. : Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. *Jpn. J. Infect. Dis. Apr.*, **58**(2), 104 (2005).
  - 15) 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).
  - 16) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; 15th Informational Supplement. Document M100-S15, CLSI, Wayne, PA (2005).
  - 17) Fritsche, T. R., Sader, H. S. and Jones, R. N. : Comparative activity and spectrum of broad-spectrum beta-lactams (cefpime, ceftazidime, ceftriazone, piperacillin/tazobactam) tested against 12,295 staphylococci and streptococci: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (North America: 2001~2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **47**(2), 435 (2003).
  - 18) Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sanchez-conde, M., Sanchez-somolinos, M. and Bouza, E. : Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(11), 4240 (2004).