

병 · 의원에서 분리한 메티실린 내성 황색포도알균에서 SCCmec 유형과 Aminoglycoside 변형효소 유전자의 분포

질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 약제내성팀¹, 병원체방어연구팀², 녹십자 의료재단 미생물팀³, 서울임상감사센터 진단검사의학과⁴
정영희¹ · 김광욱¹ · 차정옥¹ · 이경민¹ · 유재일¹ · 유정식¹ · 김봉수² · 노영주³ · 윤혜령⁴ · 이영선¹

Distribution of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Type Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Non-tertiary Hospitals

Young-Hee Jung¹, Kwang Wook Kim¹, Jeong Ok Cha¹, Kyeong Min Lee¹, Jae Il Yoo¹
Jeong Sik Yoo¹, Bong Su Kim², Young Ju Oh³, Hye Ryoung Yoon⁴ and Yeong Seon Lee¹

¹Division of Antimicrobial Resistance; ²Division of Biodefense Research, Center for Infectious Disease, National Institute of Health Korea CDC, Korea; ³Green Cross Reference Lab; ⁴Seoul Clinical Laboratories

Background : Many genes encoding aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) on transposon or plasmid were transferred from one strain to another strain and inserted into a staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*). There are very diverse subtypes in SCC*mec* type to the insertion of resistant genes. Therefore, we researched the resistance rates of antibiotics and distribution of AME genes according to SCC*mec* type in MRSA strains.

Materials and Methods : We isolated 640 *Staphylococcus aureus* from non-tertiary hospitals in 2004, detected *mecA*, *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia* using the multiplex PCR method, tested antibacterial susceptibility disk diffusion and minimal inhibitory concentration, and determined SCC*mec* type.

Results : Of 640 *S. aureus* isolates, MRSA rate was 39.7% and all MRSA isolates carried *mecA* gene. Among 214 MRSA selected, aminoglycoside-resistant rates were 98.1% in kanamycin and tobramycin, 68.7% in gentamicin, 30.8% in amikacin, and 2.8% in netilmicin. The detection rates for *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia* were 77.1%, 13.1%, and 53.3%, respectively. Also, SCC*mec* type was 50.9% in SCC*mec* type II, 16.4% in type III, and 32.7% in type IV. The genes encoding AMEs were distributed *aac(6')-aph(2'')* (49.5%) and *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia* (36.7%) in SCC*mec* type II, *aph(3')-IIIa/aac(6')-aph(2'')* (60%) and *aac(6')-aph(2'')* (31.4%) in type III, and *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia* (41.4%) and *ant(4')-Ia* (50%) in type IV.

Conclusion : 39.7% of *S. aureus* isolated from non-tertiary hospitals was resistant to methicillin. More than 90% of MRSA isolates were detected *aac(6')-aph(2'')* in SCC*mec* type II and III, and *ant(4')-Ia* in type IV. With these results, the genes encoding AMEs may be closed related to SCC*mec* type.

Key Words : Aminoglycoside modifying enzyme, SCC*mec*, Methicillin resistant, *Staphylococcus aureus*

서 론

지역사회획득 및 병원감염을 일으키는 황색포도알균은 피부 및 연조직 감염, 균혈증 심내막염 등 다양한 감염증을 유발한다. 황색포도알균 감염증 치료에 항생제 사용이

Submitted 15 October, 2007, Accepted 15 February, 2008

Correspondence : Yeong Seon Lee

Division of Antimicrobial Resistance, Center for Infectious Disease, National Institute of Health, Korea CDC, 194. Tongui Lo, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-701

Tel : 82-2-380-2121, Fax : 82-2-380-1550

E-mail : ysllee07@nih.go.kr

증가하면서 다제내성을 가진 메티실린 내성균주가 증가하고 최근 반코마이신에도 감수성이 저하된 균주가 보고되고 있다. 일반적으로 황색포도알균 감염증에는 β -lactam이나 glycopeptide나 aminoglycoside의 병합치료가 효과적인 것으로 알려져 있다. 현재 높은 내성률을 나타내는 aminoglycoside 내성 양상이나 내성기작을 파악하는 것은 MRSA 감염증을 효과적으로 치료하는데 매우 중요하다(1).

Aminoglycoside는 다양한 내성기작에 의해 내성이 야기되지만 주요 내성기작은 aminoglycoside의 불활성화이다. Aminoglycoside modifying enzymes (AMEs)에는 aminoglycoside adenylation (ANT 또는 AAD), acetylation (AAC), phosphorylation (APH) 등이 있다(2). 주로 검출되는 내성유전자는 *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa* 등이 있으며 이들은 다양한 기질을 이용하여 내성을 일으킨다. Acetylation과 phosphorylation의 기작을 동시에 일으키는 *aac(6')-aph(2'')*는 gentamicin, tobramycin, kanamycin에 내성을 부여하고 *ant(4')-Ia*는 adenylation으로 neomycin, kanamycin, tobramycin, amikacin에, *aph(3')-IIIa*는 phosphorylation으로 neomycin과 kanamycin에 내성을 나타내는 것으로 알려져 왔다(3, 4).

이들 AME 효소 유전자는 염색체나 plasmid상으로 전달되거나 transposon이나 cassette에 삽입되어 전달되는 것으로 알려져 있다. AME 효소 중 *aac(6')-aph(2'')*는 plasmid DNA의 Tn4001에 삽입되어있고, *aph(3')-IIIa*는 Tn5405에 위치하며(5, 6), *ant(4')-Ia*는 tobramycin과 kanamycin 내성을 유발하고 bleomycin 내성유전자와 함께 pUB110 상에 위치하고 있으며 MRSA의 staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) 내에서 *mecA* 유전자 downstream에 삽입되어있어 이로 인하여 MRSA 율을 높이는 데 일부 기여하는 것으로 알려져 있다(7, 8). SCC*mec*은 *ccr* type과 *mecA* complex type에 따라 type I에서 VI까지 알려져 있으며 이들 transposon이나 plasmid가 SCC*mec* 내에 삽입되어 다양한 subtype으로 분류되고 있다.

따라서 본 연구에서는 1, 2차 의료기관에서 분리한 황색포도알균에서 MRSA의 분리율, SCC*mec* 유형에 따른 AME 효소 유전자의 분포 및 연관성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 수집 및 보관

2004년 1월부터 6월까지 2개의 임상센터를 통하여 1, 2차 의료기관의 환자로부터 분리된 황색포도알균을 대상으로 하였다. 임상센터에서 혈액 배지에 배양된 후 본 실험실로 운송되면, 먼저 Mannitol Salt Agar에서 배양하여 황색을 띠는 단일 콜로니를 Staphylex와 3% H₂O₂로 coagulase와 catalase를 검사한 결과 각각에서 양성 반응을 나타내는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Brain Heart Infusion Agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 생장시킨 후 균을 수확하여 20% glycerol이 첨가된 BHI 액체배지에 용해하여 -20°C에 보관하였다.

2. 동정 및 내성유전자의 검출

동정 및 내성유전자의 검출은 multiplex PCR 방법을 이용하였고 primer의 염기서열과 PCR 반응은 Table 1과 같다. 동정을 위한 유전자로 *femB*, methicillin 내성유전자는 *mecA*로 확인하였다(9). AME 효소 유전자 *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*은 Vannhoof 등의 (9) multiplex PCR 방법을 이용하였다(Table 1).

3. 항생제 감수성 시험

황색포도알균의 항생제 감수성 시험은 oxacillin과 aminoglycoside계를 포함하여 15개의 항생제에 대하여 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)의 방법에 따라 실시하였다(10). 혈액배지에 배양한 균을 생리식염수로 0.5 McFarland로 균액의 탁도를 맞추고 멸균된 면봉에 충분히 적신 후 균액이 적혀진 면봉으로 Muller-Hinton 고체배지(MHA)에 고루 접종하여 항생제 디스크를 올려 놓고 35°C에서 18-20시간 동안 배양 후 억제대를 측정하였다.

Oxacillin의 최소억제농도를 측정하기 위해 CLSI의 지침에 따라 한천배지 희석법으로 시험하였다. 시험 배지로는 2% NaCl이 함유된 MHA 배지(Cation-adjusted Mueller-Hinton agar)를 사용하였으며, 배양균을 0.5 McFarland로 맞춘 후 10배 희석하여, oxacillin (0-256 μ g/mL)이 함유된 CAMHA에 1-2 μ L를 배지표면에 접종하여 35°C에서 24시간 배양 후 균이 성장한 결과를 판독하였다.

Table 1. Primer Sequences for Detection of Resistant Genes

Primer names	Sequences (5'→3')	Size (bps)	Reaction condition
<i>femB</i>	tta cag agt taa ctg tta cc ata caa atc cag cac gct ct	651	1 cycle 94°C for 5 min; 10 cycles at 94°C for 30 s, 64°C for 30 s, 72°C for 45 s; 25 cycles 94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C 1 min; 1 cycle 72°C for 10 min
<i>mecA</i>	gta gaa atg act gaa cgt ccg ata a cca att cca cat tgt ttc ggt cta a	310	1 cycle 94°C for 5 min; 10 cycles at 94°C for 30 s, 64°C for 30 s, 72°C for 45 s; 25 cycles 94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C 1 min; 1 cycle 72°C for 10 min
<i>aph(3')-IIIa</i>	gcc gat gtg gat tgc gaa aa gct tga toc cca gta agt ca	292	1 cycle 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; 1 cycle 72°C for 10 min
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	cca aga gca ata agg gca ta cac tat cat aac cac tac cg	221	1 cycle 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; 1 cycle 72°C for 10 min
<i>ant(4')-Ia</i>	gca agg acc gac aac att tc tgg cac aga tgg tca taa ag	166	1 cycle 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; 1 cycle 72°C for 10 min

4. SCCmec typing

SCCmec typing은 Oliveira 등의 방법(11)에 따라 수행하였으며 특징적인 유전자의 검출에 따라 유형을 구분하였다. *pls*는 type I에서 볼 수 있는 특징이며, *kdp*는 type II, *mecI*는 type II와 type III에서 확인되나 type I과 type IV에서는 확인되지 않는다. *dcs*는 type I, type II, type IV, pI258과 transposon Tn554의 사이 크기는 RIF5와 RIF4는 type III, type IV는 *mecI*가 없는 것으로 정하였다. 변종은 이런 특징을 기초로 분류하였다.

결 과

1. 항생제 내성률 및 내성유전형 확인

2004년 2개 임상센터를 통하여 전국의 1, 2차 의료기관에서 분리된 황색포도알균 640주의 지역별 분포를 보면 서울 125주, 강원도 15주, 경기도 126주, 충청도 74주, 경상도 175주, 전라도 63주, 제주도 15주, 기타 지역에서 47주가 수집되었다. 의원급에 따른 분포는 종합병원에서 90주, 병원에서 338주, 의원에서 190주, 기타로는 22주였다. 640주 중 메티실린 내성주는 254주(39.7%)였으며 종합병원에서는 54.4%, 병원은 38.5%이었으며 의원급에서는 35.3%인 것으로 나타났으며 모든 MRSA는 *mecA* 유전자를 지니고 있었다. 640주의 황색포도알균에 대한 내성률은 penicillin에서 93.3%이었으며 rifampin, netilmicin, trimethoprim/sulfamethoxazole (T/S)는 2% 정도로 대부분 감수성이었고, vancomycin에는 모두 감수성이었다(Table 2). MRSA는 penicillin 100%, rifampin, T/S, netilmicin의 내성률은 6% 이하였으며 cefazolin, erythromycin, gentamicin, tobramycin, kanamycin 등의 내성률은 70% 이상이었다. MSSA에서 penicillin의 내성률은 89.0%이었으나 나머지 항생제에는 0-30%로 대부분 감수성인 것으

로 나타났다(Table 2).

254주의 MRSA 중 임의로 214주를 선별하여 AME 효소 유전자인 *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*에 대하여 확인하였으며 *aph(3')-IIIa* 28주(13.1%), *aac(6')-aph(2'')* 165주(77.1%), *ant(4')-Ia* 114주(53.3%), 5주에서는 유전자형이 검출되지 않았다(Table 3). 또한 *aac(6')-aph(2'')*만 검출되는 율(31.3%)보다는 *ant(4')-Ia* (33.2%)나 *aph(3')-IIIa* (12.6%)와 같이 검출되는 율(45.7%)이 더 많았다. *ant(4')-Ia* 유전자는 43주에서 검출되었고, *aph(3')-IIIa* 유전자는 1주에서 검출되었다(Table 3).

4주를 제외한 210주의 황색포도알균이 kanamycin과 tobramycin에 내성을 나타내었으나 kanamycin과 tobramycin에 감수성을 보이는 4주는 netilmicin, gentamicin, amikacin 모두에 감수성을 보였고 이들 중 2주에서는 *aac(6')-aph(2'')* 유전자가 검출되었다. *aac(6')-aph(2'')* 유전자를 갖는 분리주의 86.7% (143주/165주)가 gentamicin에 내성을 나타내었고 37.6% (62주/165주)는 amikacin에 내성을 나타내었다. *ant(4')-Ia* 유전자를 가지는 분리주 중 netilmicin 내성을 나타내는 것은 없었고 50% (57주/114주)만이 gentamicin에 내성을 나타내었으며 gentamicin에 감수성인 분리주 중 *ant(4')-Ia* 유전자는 84.2% (48주/57주)에서 검출되었다. *aph(3')-IIIa*는 대부분 *aac(6')-aph(2'')*와 동시에 검출되었고 gentamicin에 내성을 나타내었으며 amikacin에는 60.7% (17주/28주)의 내성을 나타내었다. *aac(6')-aph(2'')* 유전자형을 지니는 균주는 모두 gentamicin에 내성을 나타내었으나 gentamicin에 감수성을 나타내는 균주에서도 *aac(6')-aph(2'')* 유전자가 검출되었다(Table 3).

1, 2차 의료기관의 종합병원, 병원, 의원급에 따라 AME 효소 유전자의 검출률을 비교한 결과, 종합병원 분리주에서는 *aac(6')-aph(2'')*가 71.8%로 가장 많이 검출되었고

Table 2. Antimicrobial Resistant Rates of *Staphylococcus aureus*, Against Several Antibiotics from 146 Non-tertiary Hospitals

Antibiotics	Resistant rates (%)		
	Total (640 isolates)	MRSA (254 isolates)	MSSA (386 isolates)
Penicillin	93.3	100	89.0
Cefazolin	36.6	90.2	1.0
Ofloxacin	28.0	65.7	2.9
Tetracycline	29.8	60.6	9.4
Rifampin	2.2	4.7	0.5
Erythromycin	43.9	84.3	17.0
Clindamycin	23.3	56.3	1.6
Trimethoprim/sulfamethoxazol	2.3	5.9	0.0
Vancomycin	0.0	0.0	0.0
Amikacin	13.3	31.4	1.3
Gentamicin	42.7	71.4	23.6
Tobramycin	53.6	97.3	24.1
Kanamycin	58.4	97.6	31.9
Netilmicin	1.9	3.5	0.8

Table 3. Distribution of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes, Antimicrobial Resistant Rate Against Aminogly-Coside in 214 MRSA Isolates

Aminoglycoside resistant genes			No of isolates	Resistance (%)				
<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>ant(4')-Ia</i>		AM	Gm	Net	Km	NN
+	-	-	1	1.5	0.7	0.0	0.5	0.5
+	+	-	27	24.2	17.0	66.7	12.9	12.9
-	+	+	71	16.7	37.4	0.0	33.8	33.8
-	+	-	67	53.0	42.9	33.3	30.9	30.9
-	-	+	43	4.5	1.4	0.0	20.5	20.5
-	-	-	5	0.0	0.7	0.0	1.4	1.4
Total			214	66	147	6	210	210

Abbreviations : AM, amikacin; Gm, gentamicin; Net, netilmicin; Km, kanamycin; NN, tobramycin

Table 4. Distribution of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes According to the Hospitals

Genotyping	No. of isolates (%)		
	Clinics	Hospitals	General hospitals
<i>aph(3')-IIIa</i>	0.0	0.9	0.0
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	10.8	29.1	71.8
<i>ant(4')-Ia</i>	23.1	22.7	7.7
<i>aph(3')-IIIa/aac(6')-aph(2'')</i>	20.0	9.1	10.3
<i>aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia</i>	44.6	34.5	10.3
None	1.5	3.6	0.0

병원급에서는 *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*가 각각 29.1%, 22.7%, 34.5%로 나타났으며, 의원급에서는 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*가 44.6%로 의료기관 종별에 따라 내성유전자의 분포가 다르게 나타났다(Table 4).

2. SCCmec type에 따른 AME 효소 유전자의 분포

SCCmec type을 Oliveira 등의 방법(12)에 따라 확인한 결과 SCCmec type I은 1주도 없었으며 type II, type III, type IV가 각각 109주(50.9%), 35주(16.4%), 70주(32.7%)이었다. Oxacillin에 대한 MIC값은 SCCmec type II와 type III의 MIC₅₀과 MIC₉₀이 모두 $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ 이었으며, type IV에서는 MIC₅₀과 MIC₉₀이 각각 $32 \mu\text{g/mL}$ 와 $64 \mu\text{g/mL}$ 인 것으로 나타났다(Table 5).

SCCmec type에 따라 항생제 내성률은 netilmicin 내성률은 SCCmec type III에서는 11.4%이었으나 type II와 IV에서는 1% 내외였으며, gentamicin은 type II와 type III에서 88.1%와 100%로 높게 나타났고 amikacin은 type II와 IV에 비해 type III에서 내성률이 높게 나타났다. SCCmec type IV에서는 tobramycin과 kanamycin을 제외하고는 내성률이 25% 이하인 것으로 나타났다(Table 6).

SCCmec의 type에 따른 AME 효소 유전자의 분포는

Table 5. SCCmec Types and MICs for Oxacillin in MRSA Isolates from Non-tertiary Hospitals

SCCmec types	SCCmec subtypes	No of isolates	MICs (μg/mL)								
			8	16	32	64	128	256	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
II	II	61	1	0	2	6	22	30	8-256	256	256
	IIa	44	1	0	0	2	7	34			
	IIb	4	0	0	0	1	1	2			
III	III	7	0	0	0	1	1	5	8-256	256	256
	IIIA	27	1	0	0	3	9	14			
	IIIV	1	0	0	0	0	0	1			
IV	IV	1	0	1	0	0	0	0	8-256	32	64
	IVa	69	3	7	40	12	3	4			
Total		214	6	8	42	25	43	90	8-256	128	256

Table 6. Antimicrobial Resistant Rates of 214 MRSA by SCCmec Types

Antibiotics	Resistant rates (%) in SCCmec types		
	II (No.=109)	III (No.=34)	IV (No.=70)
Amikacin	34.9	62.9	8.6
Gentamicin	88.1	100	22.9
Tobramycin	96.3	100	100
Kanamycin	96.3	100	100
Netilmicin	0.9	11.4	1.4

Table 7. Distribution of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes by SCCmec Types

Resistant genes	No. of isolates	SCCmec types		
		II	III	IV
<i>aph(3')-IIIa</i>	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (2.9)	0 (0.0)
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	67 (31.3)	54 (49.5)	11 (31.4)	2 (2.9)
<i>ant(4')-Ia</i>	43 (20.1)	8 (7.3)	0 (0.0)	35 (50.0)
<i>aph(3')-IIIa/aac(6')-aph(2'')</i>	27 (12.6)	4 (3.7)	21 (60.0)	2 (2.9)
<i>aac(6')-aph(2'')/ant(4')</i>	71 (33.2)	40 (37.6)	2 (5.7)	29 (41.4)
None	5 (2.3)	3 (2.8)	0 (0.0)	2 (2.9)
Total	214	109	35	70

SCCmec type II에서는 *aac(6')-aph(2'')*와 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*가 각각 49.5%, 36.7%에서 검출되었고, type III에서는 *aph(3')-IIIa/aac(6')-aph(2'')*가 60%, *aac(6')-aph(2'')*가 31.4%를 차지하였다. SCCmec type IV에서는 *ant(4')-Ia*와 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*가 각각 50.0%, 41.4%로 나타났다(Table 7).

고찰

2004년 1, 2차 의료기관에서 분리된 MRSA 율은 39.7%이었으며 254주의 MRSA 중 aminoglycoside계 항균제

내성률은 netilmicin, amikacin에서는 각각 3.5%, 31.4%였고 gentamicin에는 71.4%, tobramycin과 kanamycin에는 97%로 높은 내성률을 나타내었다. 국내의 대학병원이나 3차 병원에서 분리된 MRSA 율은 70%를 상회하고 gentamicin, amikacin, tobramycin에 대한 내성률은 모두 90% 이상이었다(12-14).

214주의 MRSA에 대한 AME 효소 유전자의 분포는 *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*이 각각 77.1%, 13.1%, 53.3%로 대부분 *aac(6')-aph(2'')*를 가지는 것으로 나타났다. 이는 2000년 대학병원 MRSA 분리주를 대상으로 보고한 *aac(6')-aph(2'')* 83%, *aph(3')-IIIa* 21%, *ant(4')-Ia* 42%와 유사하게 나타났다(15). 유럽에서는 12개 국가에서 분리된 포도알균을 대상으로 *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa* 유전자는 각각 68%, 48%, 14%로 보고되었다. AME 효소 유전자는 *aac(6')-aph(2'')*가 가장 많이 보고되지만 나라에 따라 차이가 있는 것으로 보고되었다(9, 16-18). 일본에서는 *ant(4')-Ia*가 84.5%, *aac(6')-aph(2'')*와 *aph(3')-IIIa*가 각각 61.7%와 8.9%로(19) 우리나라와는 다른 양상을 나타내었다.

Wildemaue 등(20)은 Belgium에서 1981-1986년에 분리한 포도알균에서 *aac(6')-aph(2'')/aph(3')-IIIa*가 90%, *aac(6')-aph(2'')*와 *aph(3')-IIIa* 각각 7%와 3%로 나타났으나 1991-1992년 분리주에서는 *aac(6')-aph(2'')/aph(3')-IIIa*는 1%에 불과하고 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia* 52%, *aac(6')-aph(2'')* 26%, *aac(6')-aph(2'')/aph(3')-IIIa/ant(4')-Ia*는 21%로 분리되는 것으로 나타나 지역적으로만 차이나는 것이 아니라 시기에 따른 AME 효소 유전자 분포도의 변화를 보고하였다. 또한 프랑스에서는 gentamicin의 사용이 감소하면서 MRSA에서 gentamicin 감수성을 증가를 보고한 바 있다(21). 이와 같이 항생제 내성률과 AME 효소 유전자의 분포가 지역이나 시기에 따라 차이

가 나는 것은 사용하는 항생제 종류와 사용량과 높은 연관성이 있을 것으로 추정된다.

현재까지 밝혀진 SCCmec type은 type I에서 VI까지 크게 분류되며 내성유전자를 포함하는 plasmid나 transposon 등에 따라 subtype이 매우 다양한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 SCCmec type II, III, IV가 확인되었고, 이중 type II가 50.9%로 가장 많이 분포하였다. 병원급에 따른 분포를 확인하였을 때 의원급에서는 SCCmec type II 26.2%, type III 21.5%, type IV 52.3%이었으며 병원급에서는 SCCmec type II 56.4%, type III 12.7%, type IV 30.9%이었으며, 종합병원에서는 SCCmec type II 76.9%, type III 17.9%, type IV 5.1%이었다. Gentamicin의 내성률은 SCCmec type III에서는 100%, type II에서 88.1%, type IV에서 22.9%였다. 우리나라의 SCCmec type은 본 연구에서 뿐 아니라 대체로 type II가 주를 이루고 있는 것으로 보고되고 있으며(22) 그 중에서도 type IIa가 일본보다 많이 분포하고, gentamicin 내성률도 일본보다 훨씬 높았다(23). 대만의 대학병원에서는 황색포도알균에서 SCCmec type에 따른 내성률을 확인한 결과 gentamicin의 내성률은 SCCmec type II에서 100%이었으나 type III에서 95%, type IV에서 53.3%인 것으로 보고되었다(24).

또한 Chongtrakook 등(25)에 따르면 한국과 일본에서는 CC5 type 2A SCCmec인 균주에서 *mecA*의 downstream에 *ant(4')-Ia*가 각각 53%, 93% 정도 차지한다고 하였으며 본 실험에서도 type II에서는 44%, type IV에서는 91.4%가 *ant(4')-Ia*를 지니고 있는 것으로 확인되었다. *ant(4')-Ia*는 pUB110에 내재되어 있다고 하며(7, 8) *ant(4')-Ia* 유전자를 지니는 균주 중 95.6% (109주/114주)에서 pUB110을 확인하였으며 이들 중 type II가 48주(42.1%), type IV가 64주(56.1%)이었다(Table 7). *ant(4')-Ia* 뿐만 아니라 *aac(6')-aph(2'')*를 포함하는 Tn4001은 plasmid에 위치하기도 하지만(5), 최근 type IV에 위치하는 것으로 보고되고 있다(26, 27). *ant(4')-Ia*와 *aac(6')-aph(2'')*는 pUB110과 Tn4001 상에 위치하여 SCCmec 내에 삽입되고 macrolide 내성유전자 *ermA* 역시 Tn554 상에 위치하여 SCCmec 내로 삽입되는 등 내성유전자가 transposon이나 plasmid 상태로 SCCmec과 함께 전이되어 더욱 다양한 subtype으로 분류되고 있다. 또한 이들 내성유전자 간 높은 연관성으로 상호간 내성률을 더 높이거나 유지시키는 것으로 추정된다.

결과적으로 볼 때, 국내 1, 2차 의료기관에서 분리한 MRSA 분리주에서 AME 효소 유전자는 *aac(6')-aph(2'')*와 *ant(4')-Ia*가 가장 많이 분리되었고 SCCmec type은

type II가 가장 많았고 다음이 type IV로 나타났다. SCCmec type에 따라 AME 효소 유전자 분포도가 다른 양상을 나타냈으며 *ant(4')-Ia*는 SCCmec type IV, *aac(6')-aph(2'')*는 type II와 type III에 많이 분포하였다.

요 약

목 적 : 대부분의 AME 효소 유전자는 transposon이나 plasmid 상태로 전달되며 staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCCmec) 내에도 삽입되어 있다. 최근 MRSA의 SCCmec 유형에 따라 다양한 내성유전자를 가지는 것으로 보고되고 있다. 따라서 1, 2차 의료기관에서 분리된 황색포도알균의 항생제 내성률을 조사하고 MRSA에서 SCCmec type에 따른 AME 효소 유전자의 분포를 확인하였다.

재료 및 방법 : 2004년 1, 2차 의료기관에서 분리된 황색포도알균 640주를 대상으로 methicillin의 내성유전자 *mecA*와 AME 효소 유전자 *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* 등을 multiplex PCR 방법을 이용하여 확인하였다. 항생제 감수성 시험과 MIC 값은 한천배지 희석법으로 확인하였고 SCCmec type도 결정하였다.

결 과 : 640주의 황색포도알균 중 MRSA율은 39.7%였으며 MRSA 분리주 모두 *mecA* 유전자가 검출되었다. Aminoglycoside 중 kanamycin, tobramycin에 대한 내성률은 98.1%이었고, gentamicin 68.7%, amikacin 30.8%, netilmicin 2.8%이었으며 vancomycin에는 모두 감수성이었다. Oxacillin MIC₅₀과 MIC₉₀은 각각 128 µg/mL, 256 µg/mL이었으며 254주의 MRSA 중 214주를 선별하여 AME 효소 유전자를 확인한 결과 *aph(3')-IIIa* 13.1%, *aac(6')-aph(2'')* 77.1%, *ant(4')-Ia* 53.3%이었으며 SCCmec type에 따라서는 type II, type III, type IV가 각각 50.9%, 16.4%, 32.7%였다. SCCmec type에 따른 AME 효소 유전자의 분포는 SCCmec type II에서는 *aac(6')-aph(2'')*와 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*가 각각 49.5%, 36.7%에서 검출되었고 type III에서는 *aph(3')-IIIa/aac(6')-aph(2'')*가 60%, *aac(6')-aph(2'')*가 31.4%, type IV에서는 *aac(6')-aph(2'')/ant(4')-Ia*와 *ant(4')-Ia*가 각각 41.4%, 50%로 나타났다.

결 론 : 1, 2차 의료기관에서 분리한 황색포도알균 분리주의 메티실린 내성률은 39.7%이었다. MRSA 분리주 중 SCCmec type II와 III에서는 *aac(6')-aph(2'')*가, SCCmec type IV에서는 *ant(4')-Ia*가 90% 이상 검출되어 SCCmec type과 AME 효소 유전자 분포와는 연관성이 있는 것

로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 2004년 식약청의 국가 항생제 내성 안전 관리 사업의 일환으로 실시되었음.

참 고 문 헌

- 1) Lowy FD: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-32, 1998
- 2) Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ: *Molecular detection of antimicrobial resistance*. *Clin Microbiol Rev* 14:836-71, 2001
- 3) Matsumura M, Karakura T, Imanaka T, and Aiba S: *Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110*. *J Bacteriol* 160: 413-20, 1984
- 4) Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A, and Konno M: *Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 25:754-9, 1984
- 5) Byrne ME, Rouch DA, and Skurray RA: *Nucleotide sequence analysis of IS256 from the Staphylococcus aureus gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001*. *Gene* 81:361-7, 1989
- 6) Derbise A, Dyke KG, el Solh N: *Characterization of a Staphylococcus aureus transposon, in 5405, located within in 5404 carryubg the aminoglycoside resistance genes, aphA-3 and addE*. *Plasmid* 35:174-88, 1996
- 7) Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H: *Mechanism of methicillin and vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. *Bailliere's Clin Infect Dis* 5:221-42, 1999
- 8) Préz-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mndez-Ivarez S: *Multiplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and detection of methicillin and mupirocin resistance*. *J Clin Microbiol* 39:4037-41, 2001
- 9) Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, and Hannecart-Pokorni E: *Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of epidemic phage types*. *J Med Microbiol* 41:282-90, 1994
- 10) Clinical and Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement*. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA, 2005
- 11) Oliveira DC, de Lencastre H: *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2155-61, 2002
- 12) Lee H, Yong D, Lee K, Hong SG, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, Choi TY, Uh Y, Shin JH, Lee WK, Lee J, Ahn JY, Lee SH, and Woo GJ: *Antimicrobial Resistance of Clinically Important Bacteria Isolated from 12 Hospitals in Korea in 2004*. *Korean J Clin Microbiol* 8:66-73, 2005
- 13) Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC: *Antimicrobial Resistance Profiles of Staphylococcus aureus Isolated in 13 Korean Hospitals*. *Kor J Lab Med* 24:223-9, 2004
- 14) Kim HB, Kim T, Lee B, Kim US, Park SW, Shin J, Oh MD, Kim EC, Lee YS, Kim BS, Choe KW: *Frequency of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics in Staphylococcus aureus Isolated from Tertiary Hospitals*. *Infect Chemother* 34:39-46, 2002
- 15) Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, and Kang MW: *Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among Staphylococcus species*. *J Korean Med Sci* 18:631-6, 2003
- 16) Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf R, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz HP, and Jones ME: *The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals*. *J Antimicrob Chemother* 43:253-9, 1999
- 17) Klingenberg C, Sundsfjord A, Rønnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, and Flægstad T: *Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000*. *J Antimicrob Chemother* 54:889-96, 2004
- 18) Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U: *Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci*. *Microbiol Res* 161:49-54 2006
- 19) Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A and Inoue M: *Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan*. *J Clin Microbiol* 39:3115-21, 2001
- 20) Wildemauwe C, Godard C, Vanhoof R, Bossuyt EV, Hannecart-Pokorni E: *Change in major populations of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Belgium*. *J Hosp Infect* 34:197-203, 1996
- 21) Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier

- A, Soussy CJ, Leclercq R: *Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: roles of an infection control program and of changes in aminoglycoside use. Clin Infect Dis* 25:647-53, 1997
- 22) Ko KS, Kim YS, Song JH, Yeom JS, Lee H, Jung SI, Jeong DR, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Moon C, Oh WS, Peck KR, Lee NY: *Genotypic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Korean hospitals. Antimicrob Agents Chemother* 49:3583-5, 2005
 - 23) Ko KS, Peck KR, Sup OW, Lee NY, Hiramatsu K, Song JH: *Genetic differentiation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Korea and Japan. Microb Drug Resist* 11:279-86, 2005
 - 24) Tai PW, Huang CH, Lin QD, Huang YY: *Molecular pattern and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates at a teaching hospital in Northern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect* 39:225-30, 2006
 - 25) Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K: *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother* 50:1001-12, 2006
 - 26) Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K: *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC Drug Resist Update* 6:41-52, 2003
 - 27) Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC: *Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Ireland. Antimicrob Agents Chemother* 49:2070-83, 2005