

임상분리 호흡기 감염증 원인 균주에서의 Macrolide계 항생물질의 내성

윤은정 · 하장범* · 최웅칠[#] · 심미자*^{*,#}

서울대학교 약학대학 · 종합 약학 연구소, *서울시립대학교 생명과학과

(Received November 9, 2004; Revised November 26, 2004)

The Prevalence of Macrolide Antibiotics Resistance in the Clinical Isolates of Common Respiratory Pathogens

Eun-Jeong Yoon, Jang-Bum Ha*, Eung-Chil Choi[#] and Mi-Ja Shim*^{*,#}

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

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

Abstract — The prevalence of resistance to a range of macrolides was determined for clinical isolates of common respiratory pathogens using NCCLS testing methods and interpretative criteria. 71.4% of *Streptococcus pneumoniae*, 62.3% of *Staphylococcus aureus*, 50.8% of coagulase-negative staphylococci and 4.4% of *Streptococcus pyogenes* were erythromycin resistant. Also, the rates of resistance to other macrolides and clindamycin in these clinical isolates were as high as to erythromycin. Almost all of the macrolide-resistant isolates were positive for *erm* of the methylase gene, or *mef* of the efflux gene.

Keywords □ macrolide resistance, *S. aureus*, CNS, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*

호흡기 감염증은 흔하게 발병하는 질환으로, 바이러스나 다양한 세균에 의해 일어난다.¹⁾ 특히 세균 감염에 의한 호흡기 감염증은 뇌수막염이나 패혈증으로도 발전할 수 있기 때문에 세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있다.^{1,2)} 그러나 호흡기 감염증에서 분리되는 세균의 기존 항생물질에 대한 내성이 지속적으로 증가하고 있어 큰 문제가 되고 있다.³⁻⁵⁾ 특히 우리나라에서 임상적으로 분리되는 세균의 내성율은 다른 나라와 비교해 보았을 때, 매우 높은 편에 속하여, 지속적인 관리가 필요한 상태이다.^{2-5, 6-9)}

Penicillin G를 대표로 하는 β -lactam계 항생물질은, 호흡기 감염증의 1차 선택 치료제로 권해지는 약물이다.²⁾ 그러나 penicillin의 경우, allergy의 위험이 있고 그 내성율이 매우 높아, 그 사용이 제한적일 수 밖에 없다.²⁾ 그로인해, 2차 선택약물로서 macrolide-lincosamide-streptogramin(MLS)계 항생물질과 quinolone계 항생물질의 이용률이 높아지고 있다.^{1,2,10)} Erythromycin으로 대

표되는 macrolide계 항생물질과, clindamycin으로 대표되는 lincosamide계 항생물질은 비교적 부작용이 적고 호흡기계 감염증의 치료에 효과도 인정되는 항생물질이다. 그러나 우리나라의 경우 이들 항생물질에 대한 내성 빈도가 높은 편이어서, 최신의 임상균주를 이용해 효과를 기대할 수 있는지 여부를 검토하는 것이 항상 필요하다.^{2,9,11,12)}

이에 본 연구에서는, 호흡기 감염증의 대표 원인균종인, staphylococci류와, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, 그리고, *Moraxella catarrhalis* 중 최근에 수집된 임상 균주에 대해 주요 macrolide계 및 lincosamide계 항생물질의 내성 빈도를 최소 억제 농도 (MIC, minimal inhibitory concentration)의 측정을 통하여 검토하고, 그 내성 기전을 규명함으로써 현재 우리나라에서 사용되고 있는 이들 항생물질이 임상적으로 계속 유효한가를 예측하였다.

실험 방법

항생물질

14환 macrolide계 항생물질인 erythromycin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), clarithromycin(Abbott Laboratories,

[#]본 논문에 관한 문헌은 저자에게로
(전화) 02-2210-2490 (팩스) 02-2210-2490
(E-mail) mjshim@uos.ac.kr
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802
(E-mail) ecchoi@snu.ac.kr

Abbott Park, IL, USA), 15환 macrolide계 항생물질인 azithromycin(Pfizer Inc., New York, NY, USA), 16환 macrolide계 항생물질인 josamycin(ICN Biomedical, Costa Mesa, CA, USA), lincosamide계 항생물질인 clindamycin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 비교 약물로는, penicillin G (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 ampicillin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하였다.

세균균주

서울의 연세대학교 세브란스 병원과 녹십자 의료원, 부산의 고신대학교 병원, 충남의 건양대학교 병원에서 2003년에 임상적으로 분리된 *Staphylococcus aureus* 175주, coagulase-negative staphylococci(CNS) 64주를 사용하였다. *S. pyogenes* 45주, *S. pneumoniae* 28주와 *H. influenzae* 29주, *M. catarrhalis* 30주는, 서울의 연세대학교 세브란스 병원에서 2003년과 2004년에 걸쳐 임상적으로 분리된 것을 이용하였다.

MIC의 측정

실험 대상 균주에 대한 항생물질의 최소 억제 농도 측정은, National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS; U.S.A)의 고체배지 희석법에 의하여 실시하였다.¹³⁾ *S. aureus*와 CNS는 Mueller Hinton agar(Difco) 배지에, *S. pyogenes*는 최종 5%(v/v)의 horse serum을 포함하는 Brain-Heart Infusion(BHI; Difco)에 각각 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 측정하였다. *S. pneumoniae*와 *M. catarrhalis*는 최종 5%(v/v)의 sheep blood를 포함하는 BHI agar 배지를 이용하였고, GasPak System (BD, NJ, USA)에서 5% CO₂ 상태가 유지되도록 하여 37°C에서 23시간 배양하였다. *H. influenzae*는 Haemophilus Testing Media(HTM)에 접종하여 GasPak System에서 5% CO₂ 상태가 유지되도록 하여 37°C에서 23시간 배양하였다. 항생물질은 최고 농도를 64 µg/ml가 되도록 하여, 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최저 농도 0.06 µg/ml가 되도록 항생물질 희석계열을 만들었다. 각 항생물질의 농도는, NCCLS에서 권장하는 ATCC

Table I – Primer sequences used in the PCR for detection of *erm* gene¹⁴⁾

Name	Primer sequence	Product size (base pairs)
<i>erm</i> (A)	5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3' ^a 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3' ^b	421
<i>erm</i> (B)	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3' ^a 5'-ATGAACGGTACTTAAATGTTTAC-3' ^b	639
<i>erm</i> (C)	5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3' ^a 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3' ^b	572
<i>mef</i> (A)	5'-AGTATCATTAACTACTAGTATGC-3' ^a 5'-TTCTTCTGGTACAAAAGTGG-3' ^b	348

^aUpper primer.

^bLower primer.

균주를 이용하여 quality control하였다. 여기에 전배양한 균액을 희석하여 최종 균액 농도가 10⁵ CFU/ml이 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 NCCLS의 breakpoint를 따랐다 (Table II).¹³⁾

내성 유전자의 검색

INtRON Biotechnology사의 genomic DNA extraction kit를 이용하여, macrolide계 항생물질에 내성인 균주의 genomic DNA를 얻었다. 이 genomic DNA와 Table I의 sequence에 해당하는 3쌍의 *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) primer를 이용하여 multiple polymerase chain reaction(PCR)을 한 뒤에, 전기 영동을 통하여 어떤 gene을 가지고 있는지 확인하였다. *mef*(A)에 해당하는 1쌍의 primer를 이용하여 PCR로 *mef*(A) 유전자도 확인하였다.¹⁴⁾ Primer는 Bioneer사에서 합성한 것을 이용하였으며, PCR은 Peltier thermocycler(MJ Research, MA, USA)을 이용하였다.

실험결과 및 고찰

각 균주에 대한 항생물질 별 최소 및 최고 MIC와, MIC₅₀,

Table II – Breakpoints of each antibiotics^a

Species	Staphylococci		<i>S. pyogenes</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>M. catarrhalis</i>	
Antibiotics	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Erythromycin	≤0.5	≥8	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1				
Clarithromycin	≤2	≥8	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1	≤8	≥32	≤8	≥32
Azithromycin	≤2	≥8	≤0.25	≥1	≤0.5	≥2	≤4	≥8	≤4	≥8
Josamycin	≤2	≥8	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1				
Clindamycin	≤0.5	≥4	≤0.25	≥1	≤0.25	≥1				
Ampicillin					≤0.06	≥2	≤1	≥4	≤1	≥4
Penicillin G					≤0.06	≥2				

^aAll breakpoints given are NCCLS, with the exception of josamycin.

S : Susceptible.

R : Resistant.

Table III – Antibacterial activities of antibiotics

Antimicrobial agent	<i>Staphylococcus aureus</i> (175) ^a				Coagulase-negative staphylococci (64) ^a				<i>Streptococcus pyogenes</i> (45) ^a			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)
Erythromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	62.3	≤0.06-≥64	32	≥64	50.8	≤0.06-≥64	≤0.06	≤0.06	4.4
Clarithromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	62.3	≤0.06-≥64	16	≥64	48.4	≤0.06-≥64	≤0.06	≤0.06	4.4
Azithromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	64.6	≤0.06-≥64	≥64	≥64	50	≤0.06-≥64	≤0.06	0.12	4.4
Josamycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	54	≤0.06-≥64	4	≥64	40.6	≤0.06-≥64	0.12	0.25	4.4
Clindamycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	52.9	≤0.06-≥64	0.5	≥64	35.2	≤0.06-≥64	≤0.06	≤0.06	4.4

Antimicrobial agent	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (28) ^a				<i>Moraxella catarrhalis</i> (30) ^a				<i>Haemophilus influenzae</i> (29) ^a			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance rate (%)
Erythromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	71.4	≤0.06-0.5	≤0.06	≤0.06	-	0.5-16	8	16	-
Clarithromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	85.7	≤0.06-≥64	≤0.06	≤0.06	3.3	0.5-32	8	16	3.4
Azithromycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	78.6	≤0.06-0.12	≤0.06	≤0.06	0	≤0.06-1	0.25	0.5	0
Josamycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	75.0	0.5-≥64	1	2	-	4-32	8	16	-
Clindamycin	≤0.06-≥64	≥64	≥64	71.4	4-≥64	4	4	-	4-≥64	8	32	-
Ampicillin	≤0.06-≥64	8	32	71.4	4-≥64	≥64	≥64	100	0.25-≥64	32	≥64	75.9
Penicillin G	8-≥64	≥64	≥64	100								

^aNumber of isolates.

MIC₉₀, 내성율을 Table III에 나타내었다. Macrolide계 항생물질 중 azithromycin과 clarithromycin에만 활성을 가지는 것으로 알려져 있는 그람 음성 간균인 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*의 경우는 물론이고,¹⁵⁾ 그람 양성 구균에서도, erythromycin을 포함하는 macrolide계 항생물질에 대한 내성율이 매우 높았다. Erythromycin에 대하여, *S. aureus*가 62.3%의 내성율을 보였으며, CNS는 50.8%, *S. pneumoniae*는 71.4%의 내성율을 보였다. Josamycin은 *S. aureus*, CNS, *S. pneumoniae* 각 54, 40.6, 75%의 내성율을 나타내었다. *S. aureus*에서 62.3%, CNS는 48.4%, *S. pneumoniae*는 85.7%의 내성율을 보인 clarithromycin에 대해서는, 그람 음성 세균인 *M. catarrhalis*와 *H. influenzae*가, 각 3.3, 3.4%의 내성율을 보였다. *M. catarrhalis*와 *H. influenzae*의 경우, azithromycin에 대해서는 모두 감수성의 결과를 보였으나, *S. aureus*, CNS, *S. pneumoniae*는 각 64.6, 50.0, 78.6%의 내성율을 보였다. 이러한 내성율은 1999년부터 2000년까지의 임상 균주에 대한 내성율보다는 조금 낮아진 것이다.^{2,3,14)} 다만 이 감

소추세가 지속적인 것인지에 대해서는 계속되는 내성율 연구를 통한 추적 조사가 필요하다.

*S. pyogenes*의 경우, 그 활성을 조사했던 macrolide계 항생물질 전반 및 lincosamide계 항생물질 모두에 대해 4.4%의 매우 낮은 내성율을 보였다. 이러한 내성율은, 어 등의 보고에서 발표된 내성율보다 많이 떨어지는 것이다¹⁰⁾ 본 연구의 결과만으로는, *S. pyogenes*의 내성율이 실제 감소 추세에 있는 것인지, 병원 별 지역 별 차이에 기인한 것인지, 아니면 실험적이거나 통계적인 오차에 의한 것인지에 대해서는 알 수가 없으며, 이에 좀 더 다각적이고 종합적인 검토가 필요하다.

Erythromycin에 내성을 보이는 균주를 대상으로 *erm* gene 및 *mef* gene을 확인해본 결과, erythromycin 내성 *S. aureus*의 78%, CNS의 54%, *S. pyogenes* 100%, 그리고 *S. pneumoniae*의 74%가 *erm* gene을 가지고 있었으며, CNS의 12%, *S. pneumoniae*의 79%는 *mef* gene을 가지고 있었다. *erm* gene과 *mef* gene을 모두 가지고 있는 *S. pneumoniae*도 58%에 달했다.

Table IV – Distribution of *erm* genes and *mef* gene among macrolide-resistant isolates

Gene	<i>Staphylococcus aureus</i>		Coagulase-negative staphylococci		<i>Streptococcus pyogenes</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%
<i>erm</i> (A)	65	70	1	3				
<i>erm</i> (B)					2	100	3	16
<i>erm</i> (C)	5	5	20	51				
<i>mef</i> (A)			5	12			4	21
<i>erm</i> (A)+ <i>erm</i> (B)								
<i>erm</i> (A)+ <i>erm</i> (C)	1	1						
<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)							11	58
Not detected	23	24	14	35			1	5
Total	94	100	40	100	2	100	19	100

이는 우리나라 특이적인 현상이라고 보고된 바 있다.¹⁶⁾

Macrolide계 항생물질에 대한 내성율은 매우 높은 편이다. 따라서 임상 시험 결과 없이 경험적으로 그 효과를 기대하기는 어렵고, 이에 따라 임상 검사를 실시해서 감수성 균주인지 여부를 확인한 뒤에 사용하는 것이 바람직하다. 이것이 macrolide계 항생물질의 내성을 더 증가시키지 않고, 그 가치를 지속시킬 수 있는 유일한 방법이라고 여겨진다. 또한 새로운 항생물질의 지속적인 개발 노력이 필요하다. Macrolide계의 변형으로 새로 개발된 ketolide계 항생물질의 경우, 그 감수성이 좋아서 사용시 효과를 기대할 수 있다. 그러나 이 역시 철저한 관리 하에 조심해서 사용할 필요가 있다.^{3,15,17,18)}

결 론

우리 나라에서 macrolide계 항생물질에 대한 호흡기 감염 원인 세균의 내성율은 매우 높은 편이다. 따라서 임상 시험 결과 감수성으로 확인된 균주만을 대상으로 이 계열의 항생물질을 사용하는 것이 바람직하다.

감사의 말씀

이 논문은 서울시립대학교 2003년도 학술연구조성비에 의하여 연구되었습니다. 이에 서울시립대학교에 감사하는 바입니다.

문 헌

- 1) Felmingham, D. : Respiratory pathogens assessing resistance patterns in Europe and the potential role of grepafloxacin as treatment of patients with infections caused by these organisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, Topic T2, 1 (2000).
- 2) Felmingham, D. : Ralf Rene Reinert Yoichi Hirakata and Arne Rodloff: 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).
- 3) Inoue, M., Lee, N. Y., Hong, S. W., Lee, K. and Felmingham, D. : PROTEKT 1999~2000 : a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**, 44 (2004).
- 4) Service, R. F. : Infectious disease: Antibiotics that resist resistance. *Science* **270**, 724 (1995).
- 5) Felmingham, D. : Antibiotic resistance. Do we need new therapeutic approaches? *Chest* **108**, Suppl. S2, 70s (1995).
- 6) Song, J.-H., Jung, S.-I., Ko, K. S., Kim, N. Y., Son, J. S., Chang, H.-H., Ki, H. K., Oh, W. S., Suh, J. Y., Peck, K. R., Lee, N. Y., Yang, Y., Lu, Q., Chongthaleong, A., Kumarasinghe, G., Jamal, F., Kamarulzaman, A., Parasakthi, N., Van, P. H., Carlos, C., So, T., Ng, T. K. and Shibl, A. : High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2101 (2004).
- 7) Kim, H. B., Jang, H.-C., Nam, H. J., Lee, Y. S., Kim, B. S., Park, W. B., Lee, K. D., Choi, Y. J., Park, S. W., Oh, M.-D., Kim, E.-C. and Choe, K. W. : *In vitro* activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a Nationwide survey. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1124 (2004).
- 8) Jacobs, M. R., Felmingham, D., Appelbaum, P. C., Gruneberg, R. N. and the Alexander Project Group : The alexander project 1998~2000 : susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 229 (2003).
- 9) Felmingham, D., Gruneberg, R. N. and the Alexander Project Group : The alexander project 1996~1997 : latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 191 (2000).
- 10) Uh, Y., Jang, I. H., Hwang, G. Y., Lee, M. K., Yoon, K. J. and Kim, H. Y. : Antimicrobial chemotherapy pattern and macrolide resistance genes of β -hemolytic streptococci in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2716 (2004).
- 11) Felmingham, D. : The need for antimicrobial resistance surveillance. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, Suppl. S1, 1 (2002).
- 12) Masterton, R. G. : Surveillance studies: how can they help the management of infection? *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, Topic T2, 53 (2000).
- 13) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Document M7A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 11. NCCLS (2000).
- 14) 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**, 489 (2002).
- 15) Carbon C, Poole MD : The role of newer macrolides in the treatment of community acquired respiratory tract infection. A review of experimental and clinical data. *J. Chemother.* **11**, 107 (1999).

- 16) Farrell, D. J., Morrissey, I., Sarah Bakker Louise Morris, Buckridge, S. and Felmingham, D. : Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm*(B)- and *mef*(A)-mediated macrolide resistance. *J. Clinic. Microb.* **42**, 764 (2004).
- 17) Buxbaum, A., Forsthuber, S., Graninger, W. and Georgopoulos, A. : Comparative activity of telithromycin against typical community-acquired respiratory pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 371 (2003).
- 18) Felmingham, D. : Evolving resistance patterns in community-acquired respiratory tract pathogens: first results from the PROTEKT global surveillance study. Prospective resistant organism tracking and epidemiology for the Ketolide Telithromycin. *J. Infect.* **44**, Suppl. A, 3 (2002).