

국내에서 분리된 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균의 분자역학적 분석에 따른 유행 현황, 2016~2018년

질병관리청 감염병분석국 세균분석과 주성제, 고은별, 황규잠*
질병관리청 충청권질병대응센터 진단분석과 유재일

*교신저자 : kyuhwang61@korea.kr, 043-719-8110

초 록

반코마이신은 메티실린 내성 황색포도알균(MRSA) 감염증에 사용되는 대표적인 치료제 중 하나이다. 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균(VISA)은 1996년 일본에서 처음 보고되었고, 2002년 미국에서 반코마이신 내성 황색포도알균(VRSA)이 발견되면서부터 반코마이신 중등도 내성 및 내성에 여러 나라들의 관심이 높아지게 되었다. 본 원고는 국내에서 분리된 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균의 병원성 인자 및 분자역학적 특성을 파악하고자 하였다.

2016년에서 2018년까지 질병관리본부 감시체계에서 확보된 황색포도알균 80주의 반코마이신 항생제 감수성시험 결과, 9주가 반코마이신 중등도($4 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) 내성주임을 확인하였다. 반코마이신에 중등도 내성인 황색포도알균의 다제내성을 확인하고자 반코마이신 이외 20종의 항생제에 대한 내성패턴과 내성유전자 및 병원성인자를 확인하기 위해 이동성 유전자(SCCmec)형, 장독소(Staphylococcal enterotoxin) 유전자 9종과 발열, 혈압저하, 발적 등의 Staphylococcal Toxin Shock Syndrome (TSS)을 일으키는 독성 쇼크 증후군 독소(Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1), 면역세포에 구멍을 내어 세포를 파괴시키는 독소인 백혈구파괴독소(Panton-valentine leukocidin, PVL), 균체외독소 중 하나인 포도알균 열상 피부증후군(Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)의 원인물질인 표피박탈독소(Exfoliative toxin) 3종의 독소 유전자를 확인하였고 분자역학적 특성을 파악하기 위해 PFGE, MLST, SPA typing을 실시하였다.

실험결과 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균은 베타락탐계열 항생제에 모두 내성을 보였고, 비베타락탐계열인 퀴놀론계와 테트라사이클린계 항생제에도 내성을 보여 9주 모두 다제내성균으로 확인되었다. 장독소 유전자인 *sec*, *seg*, *sei*를 모두 가지는 균은 8주였으며, 독성 쇼크 증후군 독소(Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1)도 8주에서 검출되었다. 그러나 표피박탈독소와 백혈구파괴독소는 모두 검출되지 않았다. 이동성 유전자 SCCmec II형을 가진 ST5(SCCmec II-ST5-t2460)도 7주에서 확인되었다. 또한 PFGE 분석결과 4개의 유형이 확인되었고, 93.2%의 유사 범주로 연관성을 나타내었다.

국내 분리 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균의 9주는 모두 다제내성 균임을 확인하였고, 국내에서 주를 이루고 있는 SCCmec II형을 가진 ST5(SCCmec II-ST5-t2460)라는 기존 보고와 동일한 유형이었다. 국내에서 VRSA 출현이 아직 확인되지 않았으나 반코마이신 내성 황색포도알균의 지속적인 감시와 특성 분석이 필요시 된다.

주요 검색어 : 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균(VISA), PFGE, MLST, SCCmec

들어가는 말

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 피부염, 균혈증, 폐렴, 식중독 등 다양한 감염증을 일으키는 병원체로서 의료관련감염의 주요 원인균으로 보고되고 있다[1]. 1940년도에 페니실린(Penicillin)이 임상에서 처음 도입되어 황색포도알균 감염 치료에 사용되었으나 1950년대에 페니실린 내성 황색포도알균이 60% 이상으로 증가했다. 이를 치료하기 위하여 여러 항균제가 개발되었으며, 1960년대 초반부터 메티실린(Methicillin)이 1960년에 도입되었으나, 항생제의 빈번한 사용과 노출로 인하여 그 다음해인 1961년에 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)이 출현하기 시작했다[2]. MRSA의 출현으로 인한 MRSA 감염증 치료에 반코마이신(Vancomycin)이 사용되었으나 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균(Vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA)이 1996년에 일본에서 처음 분리되었다[2]. 이 후 미국, 독일, 인도를 비롯하여 전 세계적으로 분리 보고되었으며[3], 한국에서는 2000년에 처음 보고되었다[4]. 2002년 미국 미시간(Michigan)에서 반코마이신 내성 황색포도알균(Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)이 최초로 분리된 이후 2014년에 미국 13번째 사례가 보고되었다[7].

국내에서는 항생제 내성균 감시체계인 국가 항균제 내성 조사 연보(Koran antimicrobial resistance monitoring system, KARMS)에서 지속적인 감시와 현재 법정감염병 2급으로 분류되어 전수조사를 통한 진단분석을 하고 있다. 다행히도 현재까지 국내에서 VRSA가 보고된 적은 없으나 2000년 첫 VISA 증례가 보고된 이후 지속적으로 분리되고 있어 본 연구에서는 2016~2018년 국내 표본감시 및 전수감시 통해 분리된 VISA의 특성을 확인하고자 하였다.

몸 말

2016년부터 표본감시를 수행하였고 2017년 6월 3일 이후 전수감시로 전환되었다. 2016년~2018년 표본감시 및 전수조사 결과 VRSA로 의심되어 확인동정 시험이 의뢰된 분리주는 총 80주였고, 의뢰된 분리주를 확인동정한 후 단일집락을 증균하여 반코마이신에 대한 항생제 최소 억제 농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 액체배지 미량희석법(Broth microdilution method) 시험법으로 확인하였다. Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) 지침에 따라 액체배지 미량희석법으로 반코마이신 MIC $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ 이면 감수성, $4 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 는 중등도 내성, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 는 내성으로 판정하였고, 표준균주도 함께 실험하여 MIC 결과가 허용범위 내에 있는지 확인하였다. 반코마이신 외 20종의 항균제에 대해서도 함께 실험하였다. 실험결과 VRSA로 판정되는 경우는 없었으며 반코마이신 감수성 결과값이 $4 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 으로 중등도 내성으로 판정된 것은 9주가 확인되었다(표 1).

추가적으로 20가지 항균제에 대한 감수성 시험결과 β -lactam 계열의 항균제인 ampicillin, penicillin, oxacillin, ceftriaxone, cefoxitin에서는 모두 내성으로 확인되었다. Non- β -lactam 계열의 항균제 중 erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, clindamycin에서는 모두 내성으로 확인되었고 gentamicin에서는 7주, rifampicin에서는 4주가 내성으로 확인되어 Macrolides계, Tetracyclines계, Fluoroquinolones계 등 여러 계열의 항생제에 다제내성임이 확인되었다. Nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazole, linezolid, quinupristin/dalfopristin에서는 모두 감수성으로 확인되었다(표 2).

황색포도알균의 메티실린 내성을 확인하는 *mecA* 유전자는 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*)이라는

표 1. 2016~2018년 국내 분리 VISA 균주의 반코마이신 항생제 감수성 테스트 결과

항생제 감수성 테스트 방법	반코마이신 항생제 최소 억제 농도($\mu\text{g/ml}$)					해석
	1	2	4	8	16	
액체배지 미량 희석법	16	56	9	-	-	감수성(72) / 중등도 내성(9)

표 2. 2016~2018년 국내 분리 VISA 9균주의 항생제 감수성 테스트 결과

항생제 계열	항생제	분리주(%)		
		감수성	중등도 내성	내성
β-lactams	Ampicillin	0	0	9 (100)
	Penicillin	0	0	9 (100)
	Oxacillin	0	0	9 (100)
	Ceftriaxone	0	0	9 (100)
	Cefoxitin	0	0	9 (100)
Non-β-lactams	Daptomycin*	7 (77.8)	–	–
	Gentamicin	2 (22.2)	0	7 (77.8)
	Erythromycin	0	0	9 (100)
	Tetracycline	0	0	9 (100)
	Ciprofloxacin	0	0	9 (100)
	Moxifloxacin	0	0	9 (100)
	Gatifloxacin	0	0	9 (100)
	Levofloxacin	0	0	9 (100)
	Nitrofurantoin	9 (100)	0	0
	Clindamycin	0	0	9 (100)
	Trimethoprim/sulfamethoxazole	9 (100)	0	0
	Chloramphenicol	6 (66.7)	3 (33.3)	0
	Rifampin	5 (55.6)	0	4 (44.4)
	Quinupristin/dalfopristin	9 (100)	0	0
	Linezolid	9 (100)	0	0

*Daptomycin 구획점은 감수성에 대해서만 정의됨.

이동성 유전자 부위에 위치하는데, 대부분의 SCCmec은 I~IV형에 속한다. 독성유전자는 장독소(Staphylococcal enterotoxin) 유전자 9종(*sea-see*, *seg-sej*)과 발열, 혈압저하, 발적 등의 Staphylococcal Toxin Shock Syndrome(TSS)을 일으키는 독성 쇼크 증후군 독소(Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1), 면역세포에 구멍을 내어 세포를 파괴시키는 독소인 백혈구파괴독소(Panton-valentine leukocidin, PVL), 균체외독소 중 하나인 포도알균열상성피부증후군(Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)의 원인물질인 표피박탈독소(Exfoliative toxin) 유전자 등이 보고되고 있다[8,11]. 따라서 VISA 분리주의 분자생물학적 특성을 확인하기 위해 SCCmec 형, 장독소 9종(*sea-see*, *seg-sej*), TSST-

1, PVL, 표피박탈독소(*eta-eto*) 유전자를 각각 multiplex PCR을 실시하여 확인하였다. 분자역학적 유연관계를 확인하고자 7개의 House keeping gene(*arcc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*)를 이용한 Multilocus Sequence Type(MLST)을 분류하였으며 추가로 SPA(*Staphylococcus* protein A) typing 및 PFGE(Pulsed field gel electrophoresis)를 통해 패턴을 비교분석하였다.

분리된 9주의 VISA 유전자 분석 결과 9주 모두 SCCmec II형으로 확인되었고 독성쇼크증후군독소(TSST-1) 유전자는 8주에서 검출되었다. 장독소 유전자인 *sec*, *seg*, *sei* 유전자는 8주, *seg*, *sei* 유전자는 1주가 확인되었고 백혈구파괴독소와 표피박탈독소는 9주 모두 유전자를 갖고 있지 않는 것으로 확인 되었다. MLST

표 3. 2016~2018년 국내 분리 VISA 9균주의 분자생물학적 특성

MLST (ST 유형)	SPA 유형	SCCmec	TSST-1	장독소	표피박탈독소	백혈구 파괴독소	분리수	분리연도
5	t2460	II	양성	<i>sec, seg, sei</i>	음성	음성	6	2017~2018
5	t264	II	양성	<i>sec, seg, sei</i>	음성	음성	1	2016
5	t2460	II	음성	<i>seg, sei</i>	음성	음성	1	2018
미상	t2460	II	양성	<i>sec, seg, sei</i>	음성	음성	1	2016

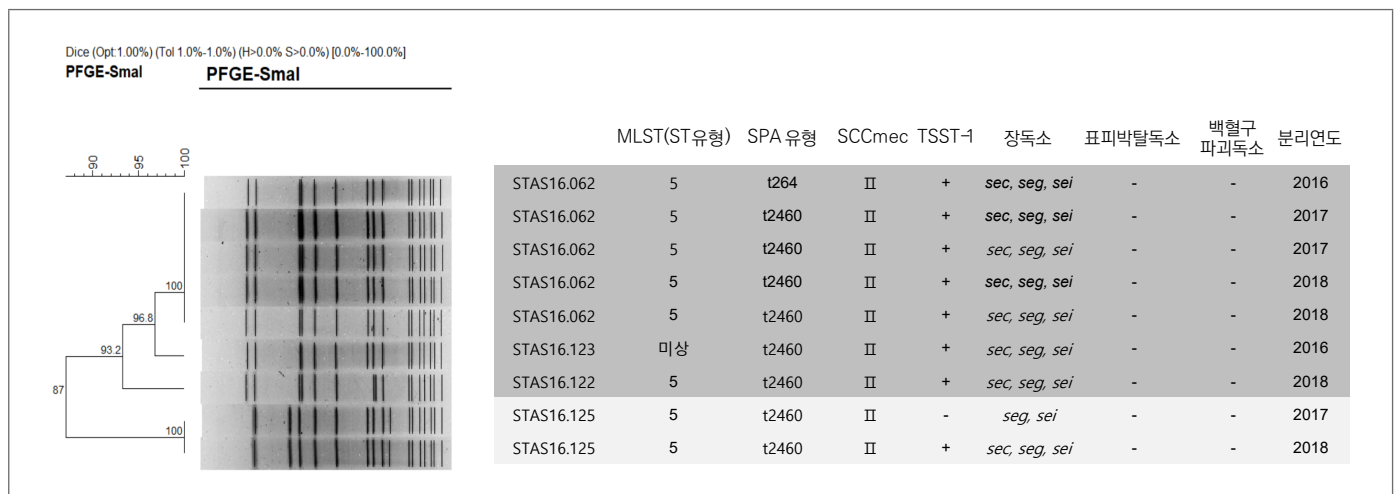


그림 1. 2016~2018년 국내 분리 VISA 9균주의 PFGE 계통도 및 특성

분석 결과에서도 8주가 ST5로 확인되었고 1주가 ST5와 유사하지만 기존에 보고되어 있지 않는 미분류로 확인되어 추가 검증이 필요하다. SPA typing에서도 8주가 t2460으로 확인되었고 1주만 t264로 확인되었다(표 3).

9주의 VISA 분리주로 분자역학적 연관성을 분석하기 위하여 PFGE를 통해 유사성을 분석한 결과, 4가지 유형으로 확인 되었으며 STAS16.125 유형을 제외한 나머지 유형에서 93.2% 유사범주를 보여 3유형간의 연관성을 보여 주었다(그림 1).

및 Non- β -lactam 계열의 항균제들에서 대부분 내성을 보이는 다제내성균이며 ST5, SCCmec II형, t2460이 주를 이루고 PFGE 분석에서도 3그룹의 유형이 연관성이 확인되었다. 이는 국내에서 분리되는 MRSA가 대부분 SCCmec II형을 가진 ST5주(ST5-SCCmec II)라는 기존 보고와도 일치하였다[9]. 따라서 국내에서도 VRSA 출현을 사전에 예방하고, 발생 시 신속히 조치하기 위해서는 VISA에 대한 지속적인 감시와 특성 분석이 필요하다.

맺는 말

VRSA는 현재 국내에서 분리되지 않았으나 VISA는 지속적으로 분리되고 있다[9]. 2016~2018년에 분리된 VISA 9주를 대상으로 특성을 조사한 결과 모든 VISA 분리주 모두 β -lactam 계열의 항균제

① 이전에 알려진 내용은?

국내에서는 VRSA 발생이 되지는 않았지만 VISA 출현이 문제가 되고 있는 것은 이미 알려진 사실이다. 그러나 집단발생의 위험이 있는 VISA/VRSA 전파 관리를 위하여 정확한 유행형 파악이 필요하다.

② 새로이 알게 된 내용은?

2016~2018년에도 국내에서 주로 분리되는 ST5-SCCmec II-2460 타입은 기존 보고와도 일치하는 것으로 국내 VISA의 첫 출현 이후 지속적으로 같은 유형의 유행함을 알 수 있었으며 분석 중에 아직 보고된 적이 없어 MLST 타입으로 분류가 되지 않는 1주에 대해서 추가 검증이 필요하다.

③ 시사점은?

전국 의료기관에서 분리된 VISA를 대상으로 국내 반코마이신 중등도 내성 황색포도알균의 분리 현황 및 주요 유전형질을 확인하여 향후 특정 내성균 유행에 관한 과학적 근거를 마련하는데 의의가 있다.

7. Limbago BM, Kallen AJ, Zhu W, Eggers P, McDougal LK, Albrecht VS. Report of the 13th vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United States. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):998–1002.
8. Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes. Korean J Lab Med 2007;27:118–123.
9. Chung G, Cha J, Han S, Jang H, Lee K, Yoo J, Yoo J, Kim H, Eun S, Kim B, Park O, Lee Y. Nationwide surveillance study of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* strains in Korean hospitals from 2001 to 2006. J Microbiol Biotechnol 2010;20:637–642.
10. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet. 2013;382:9888.
11. Michal Bukowski, Benedykt Wladyka, Grzegorz Dubin. Exfoliative toxin of *Staphylococcus aureus*, Toxins 2010,2, 1148–16165;doi10.3390/toxins2051148

참고문헌

1. National Institute of Health, Korea Center for Disease Control and Prevention. Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) Annual Report, 2014. p10.
2. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997;40:135–6
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—Illinois, 1999. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;48:1165–1167.
4. Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. J Clin Microbiol 2000;38:3879–81.
5. Song JH. Antimicrobial resistance in gram-positive cocci: Past 50 Years, present and future. Infect Chemother 2011;43:443–449.
6. Zhu X, Liu C, Gao S, Lu Y, Chen Z, Sun Z. Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*(VISA) isolated from a patient who never received vancomycin treatment. Int J Infect Dis. 2015 Apr;33:185–90.

Abstract

Characteristics of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) isolates in Korea, 2016-2018

Joo Seong-Jae, Go Eunbyul, Hwang kyu Jam

Division of Bacterial Diseases, Bureau of infectious Disease Diagnosis Control, KDCA

Yoo Jaeil

Chungcheong Regional Center for Disease Control and Prevention, RCDC

Vancomycin an antibiotic used to treat a number of bacterial infections, is used for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Since the first isolate of vancomycin-intermediate *staphylococcus aureus* (VISA) from Japan in 1996, and the discovery of the isolate of the vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in the United States in 2002, a major concern for many countries with vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *staphylococcus aureus*. This study aimed to identify the characteristics of VISA isolates in Korea from 2016 to 2018.

As a result of study, the antimicrobial susceptibility test of 80 strains of *Staphylococcus aureus* obtained through sentinel surveillance and a thorough investigation from 2016 to 2018, 9 strains of vancomycin-intermediate resistant (4-8 µg/ml) strains were identified. Vancomycin intermediate *S. aureus* confirmed the characteristics of the vancomycin intermediate *S. aureus*, a resistance pattern to 20 antibiotics other than vancomycin. In addition, mobility gene (SCCmec) types and 9 types of Staphylococcal enterotoxin genes and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), which causes staphylococcal toxic shock syndrome (TSS) such as fever, blood pressure reduction, redness, etc... and panton-valentine leukocidin (PVL), a toxin that destroys cells by puncturing immune cells and among extracellular toxins three types of exfoliative toxin, which causes Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) were identified. In addition, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), and staphylococcal preotein A (SPA) Typing were confirmed for molecular epidemiological characteristics.

This study's results indicated that vancomycin intermediate resistant *S. aureus* was resistant to all beta-lactam antibiotics and resistant to non-betalactam-series quinolone and tetracycline antibiotics, and all 9 strains were identified as multidrug resistant bacteria. Enterotoxin genes *sec*, *seg* and *sei* were found in 8 strains, and TSST-1 were also detected in 8 strains. However exfoliative, panton-valentine leukocidin genes were not detected. ST5 (SCCmec II-ST5-t2460) with type SCCmec II was identified in 7 strains. As a result of the PFGE analysis of 9 strains of vancomycin intermediate *S. aureus*, 4 types were identified, and the 3 types showed a similarity category of 93.2%.

In this study, the characteristics of vancomycin intermediate *S. aureus* showed multidrug resistant in all 9 strains, and was consistent with previous reports of ST5 (SCCmec II-ST5-t2460) with SCCmec type II, which is dominant in Korea. Therefore, in order to prevent the emergence of VRSA in Korea and to promptly take action when it occurs, continuous monitoring and characteristic analysis of VRSA is required.

Keywords: Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), PFGE, MLST, SCCmec

Table 1. Antimicrobial susceptibility results of 9 vancomycin–intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) isolates in Korea, 2016–2018

Methods for antimicrobial susceptibility testing	MICs (μg/ml) of vancomycin					Interpretation
	1	2	4	8	16	
Broth microdilution method	16	56	9	–	–	S (72) / I (9)

Abbreviations: R, Resistant; I, Intermediate; S, Susceptible

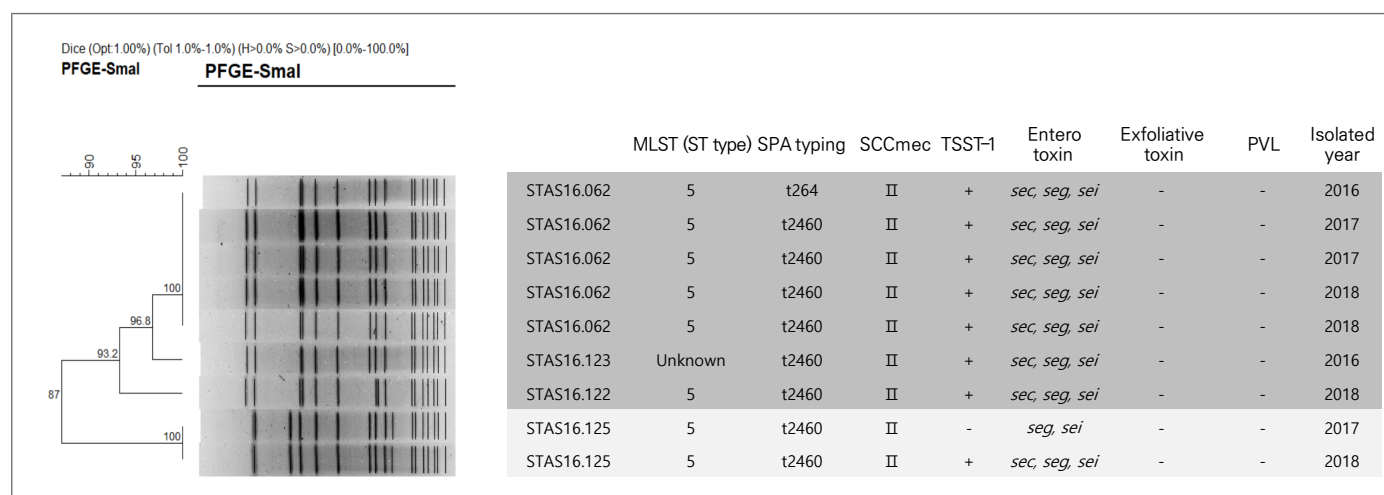
Table 2. Antimicrobial susceptibility pattern of 9 vancomycin–intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) isolates in Korea, 2016–2018

Antimicrobial class	Antimicrobial agents	Number of isolates (%)		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
β-lactams	Ampicillin	0	0	9 (100)
	Penicillin	0	0	9 (100)
	Oxacillin	0	0	9 (100)
	Ceftriaxone	0	0	9 (100)
	Cefoxitin	0	0	9 (100)
Non-β-lactams	Daptomycin*	7 (77.8)	–	–
	Gentamicin	2 (22.2)	0	7 (77.8)
	Erythromycin	0	0	9 (100)
	Tetracycline	0	0	9 (100)
	Ciprofloxacin	0	0	9 (100)
	Moxifloxacin	0	0	9 (100)
	Gatifloxacin	0	0	9 (100)
	Levofloxacin	0	0	9 (100)
	Nitrofurantoin	9 (100)	0	0
	Clindamycin	0	0	9 (100)
	Trimethoprim/sulfamethoxazole	9 (100)	0	0
	Chloramphenicol	6 (66.7)	3 (33.3)	0
	Rifampin	5 (55.6)	0	4 (44.4)
	Quinupristin/dalfopristin	9 (100)	0	0
	Linezolid	9 (100)	0	0

*Daptomycin Breakpoint is only defined for S, Susceptible.

Table 3. Molecular characteristics of 9 vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) isolates in Korea, 2016–2018

MLST (ST type)	SPA typing	SCCmec	TSST-1	Enterotoxin	Exfoliative toxin	PVL	No. of isolates	Isolated year
5	t2460	II	Positive	<i>sec, seg, sei</i>	Negative	Negative	6	2017–2018
5	t264	II	Positive	<i>sec, seg, sei</i>	Negative	Negative	1	2016
5	t2460	II	Negative	<i>seg, sei</i>	Negative	Negative	1	2018
Unknown	t2460	II	Positive	<i>sec, seg, sei</i>	Negative	Negative	1	2016

**Figure 1.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) dendrogram and characteristics of 9 vancomycin-intermediate *staphylococcus aureus* (VISA) isolates in Korea, 2016–2018