

MLST 유전형 분석에 따른 국내 분리 마이코플라스마 폐렴균 현황, 2006~2019년

질병관리청 감염병진단분석국 세균분석과 김소현, 김동혁, 전정훈, 황규잠*
경남권질병대응센터 진단분석과 정상운

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

초 록

마이코플라스마 폐렴균은 상기도 및 하기도 감염증을 일으키는 병원체로 지역사회획득 폐렴의 약 20~40%를 유발한다. 마이코플라스마 폐렴균 감염증은 3~4년을 주기로 유행하는 양상을 보이며, 학동기 아동에게서 주로 유행하고 있다. 또한, 마크로라이드계열 항생제 내성관련 유전자 변이를 가지는 균주의 비율이 증가하고 있어 공중보건학적인 문제를 야기하고 있다.

본 원고에서는 2006년부터 2019년까지 급성호흡기감시사업으로 수집한 검체에서 분리된 국내 마이코플라스마 폐렴균 127주를 대상으로 마이코플라스마 폐렴균 감염증 유행 양상 및 항생제 내성과 분자역학적 연관성을 확인하기 위하여 multilocus sequence typing(MLST) 분석법을 사용하여 결과를 확인하였다. 분석 균주의 연령별 분포는 0~9세 연령층(76주, 59.8%)과 10~19세 연령층(22주, 17.3%)에서 가장 높은 비율로 확인되었다.

국내 분리주의 주요 sequence type(ST)은 ST3(53.5%)와 ST14(31.5%)로 확인되었고, 다음으로 ST2, ST7, ST20, ST33 유형들이 각각 6.3%, 2.4%, 3.1%, 2.4% 순서로 분포하였다. 특히, 2018년에는 기존에 보고되지 않은 새로운 유형(NT)이 확인되었고 2019년에 ST33 유형이 처음 확인되기도 하였다. 항생제 내성과 MLST ST 유형과의 연관성을 확인하기 위하여 마크로라이드계열 항생제 내성 유전자 변이(23S domain V, A2063G)가 확인된 균주 27주(21.3%)에 대해 ST 유형을 비교한 결과, ST3(18주, 66.7%), ST14(3주, 11.1%), ST20(3주, 11.1%), ST7(1주, 3.7%), ST33(1주, 3.7%), NT(1주, 3.7%) 유형의 빈도로 확인되었다. 이번 결과를 통해 국내 마이코플라스마 폐렴균의 ST유형 및 유전형 분포가 변화되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 국내 마이코플라스마 폐렴균 감염증의 유행 양상과 균의 변이 추세를 확인하고 관리하기 위해서는 지속적인 호흡기감염증(마이코플라스마 폐렴균감염증)감시가 요구되고, 마크로라이드계열 외 항생제 내성 및 새로운 유형(NT)이 확인된 균주에 대한 추가적인 특성 분석을 통해 축적된 분자역학적 DB 환류가 필요할 것으로 사료된다.

주요 검색어 : 마이코플라스마 폐렴균, MLST, 유전형, 마크로라이드, 항생제내성 유전자변이, NGS

들어가는 말

마이코플라스마 폐렴균은 밀접접촉 시, 비말감염에 의해 지역사회 내로 전파되는 비정형폐렴의 흔한 원인균으로 전 연령층에서 발견되며, 특히 5세~14세 학동기(소아청소년기) 연령층에서 주로 유행하는 것으로 알려져 있다[1]. 마이코플라스마 폐렴균은 지역사회획득 폐렴 원인균 중 4~8% 비중을 차지하는데,

대규모 유행시기에는 20~40%가 이 균에 의해 유발되는 것으로 보고되기도 한다[2,3].

마이코플라스마 폐렴균 감염증은 3~4년 주기로 유행하는 특성을 가지고 있으며, 어린이집, 학교 등 집단시설에서 집단발생의 가능성이 높다. 또한, 2000년 이후 마이코플라스마 폐렴균 감염증의 1차 선택 항생제인 마크로라이드계열 항생제에 대해 내성을 나타내는 균주가 증가하고 있다. 마이코플라스마

폐렴균의 분자역학적 특성 분석은 유행균주의 유형, 내성균주의 출현감시 및 질병의 유행양상을 파악할 수 있어 중요하다. 이러한 마이코플라스마 폐렴균의 유형 분석을 위해서는 PCR-restriction length polymorphism(PCR-RFLP)법, multilocus variable-number tandem-repeat analysis(MLVA), multilocus sequence typing(MLST) 등이 활용되고 있다[4-6].

본 글에서는 MLST기법을 이용하여 2006년부터 2019년까지 급성호흡기감시사업을 통해 수집된 인후염 및 지역사회획득 폐렴 환자에서 분리된 균주를 대상으로 국내에서 유행한 마이코플라스마 폐렴균의 유전형 파악 및 결과공유를 하고자 하였다.

목 말

급성호흡기감시사업(2006년~2019년)을 통해 수집된 호흡기 검체에서 분리된 마이코플라스마 폐렴균 균주 127주를 대상으로 MLST 분석을 실시하였다. 균주의 연령별 분포는 0~9세 연령층에서 분리된 균주가 76주(59.8%)로 가장 많았고, 다음으로 10~19세(22주, 17.3%), 20~29세(7주, 5.5%), 30~39세(6주, 4.7%), 40~49세(9주, 7.1%), 50~59세(2주, 1.6%), 60~69세(1, 0.8%), 70세 이상(2주,

1.6%), 모름(2주, 1.6%) 순으로 분포하였다(그림 1). MLST는 8종의 housekeeping gene인 *adk*, *arcC*, *atpA*, *glyA*, *gmk*, *gyrB*, *pgm*, *ppa* 유전자를 대상으로 각 유전자별 PCR primer와 반응조건에 따라 표적 영역을 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다. 균주별 allele type profile은 MLST database(<http://pubmlst.org/mpneumoniae>)를 활용해 sequence type(ST)을 분석하였다.

현재까지 global MLST 유형 및 유전형 조합은 총 40개 유형이 알려져 있다. 본 결과에서 확인된 마이코플라스마 폐렴균의 MLST 유형은 ST2, ST3, ST7, ST14, ST20, ST33, 새로운 유형(new type, NT) 등 7개 유형으로 확인되었다.

분리주의 유형을 확인한 결과, ST3 형과 ST14 형이 각각 53.5%(68주), 31.5%(40주)를 차지하여 주요 유형인 것으로 확인되었고, ST2(8주, 6.3%), ST20(4주, 3.1%), ST7(3주, 2.4%), ST33(3주, 2.4%)의 순으로 나타났다. 또한 기존에 global MLST 유형에 속하지 않는 새로운 유형(NT)이 1주(0.8%) 확인되었다(그림 2).

ST3와 ST14 유형은 2006년부터 지속적으로 확인되는 유형이고, ST2, ST7은 2006년~2008년, 2019년 일시적으로 확인된 유형이었다. 그리고 ST20과 ST33 유형은 2018년과 2019년에 국내에서 처음 확인된 유형이었다(그림 3).

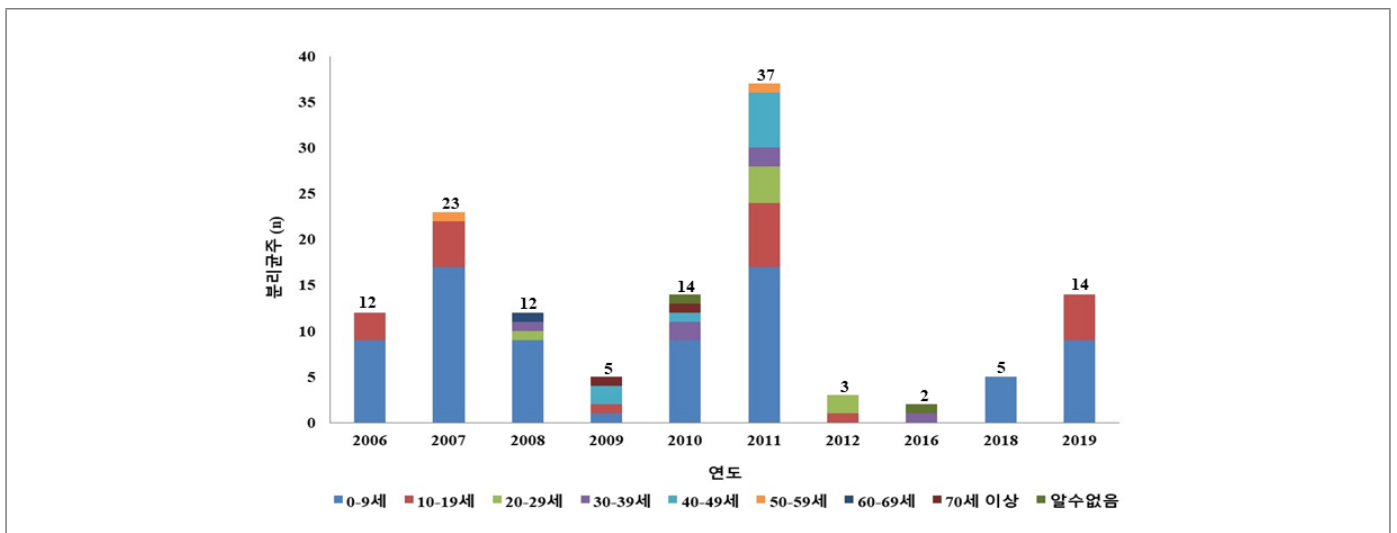


그림 1. 연도별 국내 마이코플라스마 폐렴균 분리주 현황, 2006~2019년

*2013~2015년, 2017년: 분리균주 없음

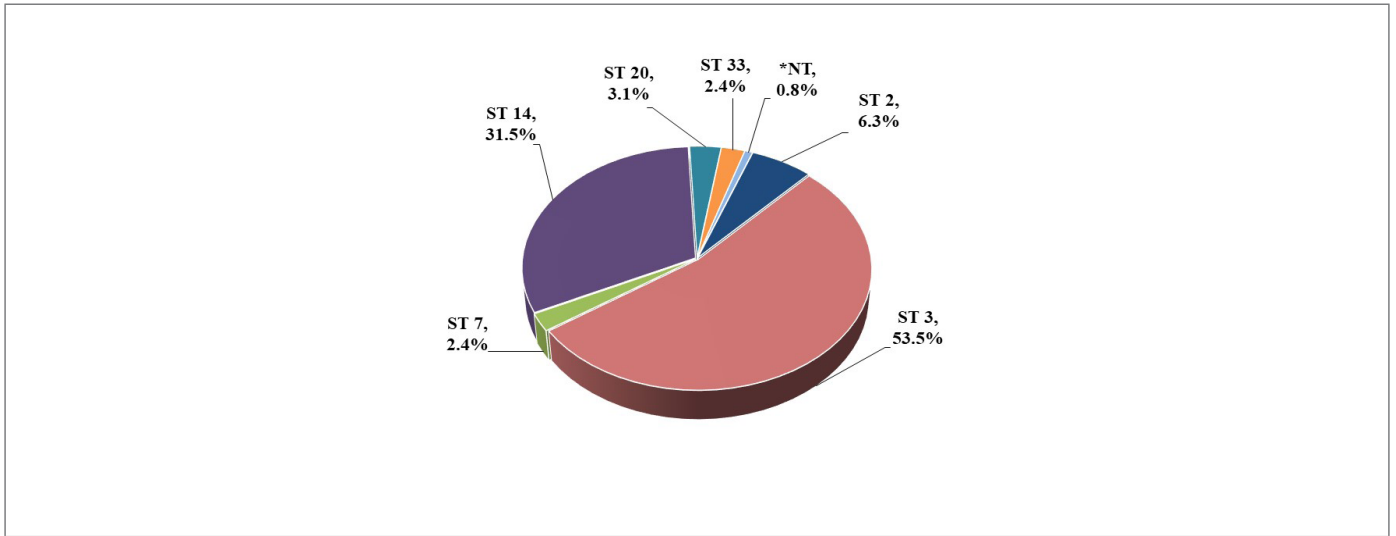


그림 2. 국내 마이코플라스마 페렴균 분리주 MLST 유형별 분포현황, 2006~2019년

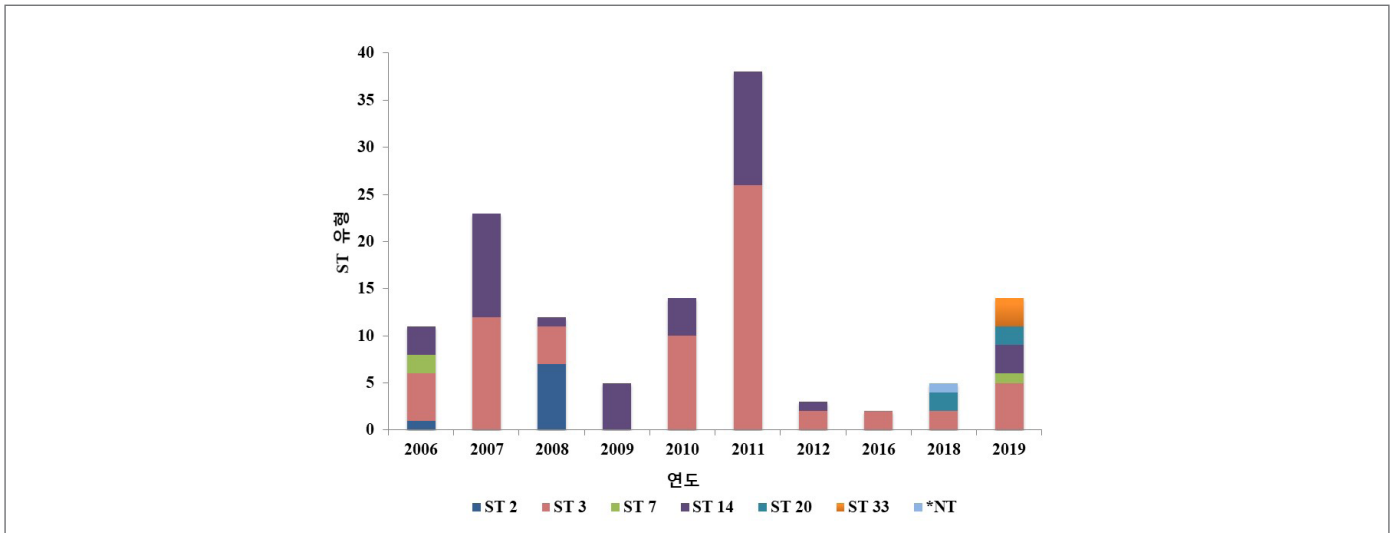


그림 3. 연도별 국내 마이코플라스마페렴균 분리주의 MLST 유형, 2006~2019년

마크로라이드계열 항생제 내성 유전형 변이는 내성과 관련이 있는 것으로 알려진 23S 리보솜 리보핵산(rRNA) V영역 유전자를 대상으로 염기서열분석을 통해 유전자 2063과 2064 위치에 각각 아데닌(Adenine, A)에서 구아닌(Guanine, G)으로 치환되는 점 돌연변이를 확인하는 방법으로 분석하였다. 항생제 내성 유전형 변이(23S domain V, A2063G)가 확인된 균주와 MLST ST 유형과의 연관성을 확인하고자 비교해본 결과, 총 27주 중 18주(66.7%)에서 ST3 유형이 확인되었고, ST14(3주, 11.1%), ST20(3주, 11.1%), ST7(1주,

3.7%), ST33(1주, 3.7%), N21(1주, 3.7%) 순으로 확인되었다(그림 4). 일부 연구에서 마크로라이드계열 항생제 내성형과 감수성 균주간의 MLST 유형을 비교한 결과, 내성형 균주에서는 ST3(74.6%), ST19(11.4%), ST14(4.9%) 형 순으로 확인되었고, 감수성 균주에서는 ST3(52.6%), ST14(28.4%), ST7(6.9%) 형 순으로 확인되어 내성형 균주에서 ST3 유형이 높은 빈도로 나타나는 것을 확인하였다[7]. 국내 분리주에서도 항생제 내성 유전자 변이가 확인된 균주는 ST3 유형의 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었다.

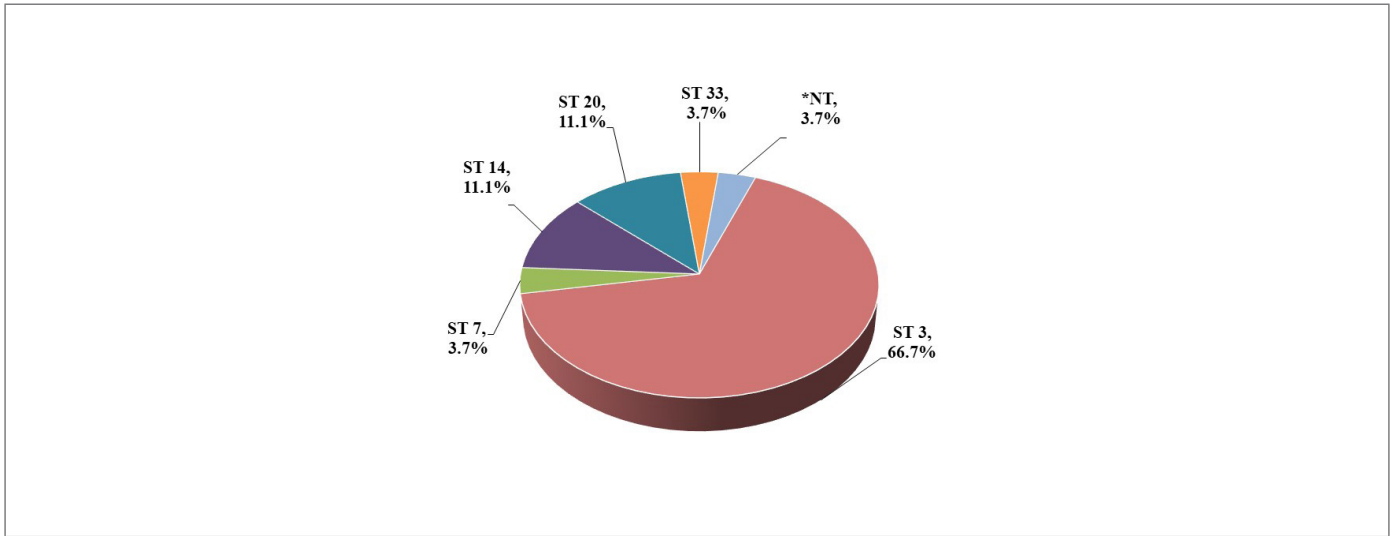


그림 4. 마크로라이드계열 항생제 내성(23S domain V, A2063G) 유전자변이 균주의 MLST 유형별 분포

맺는 말

마이코플라스마 폐렴균에 의한 호흡기 질환은 전 연령층에서 발병 가능한 상기도 및 하기도 감염증의 원인균 중 하나이다. 특히 소아 연령층에서 주기적으로 유행하며 어린이집, 학교, 요양원 등 집단시설에서 대규모 발생의 가능성이 존재한다. 최근 1차 치료약제인 마크로라이드 계열 항생제 저항성을 나타내는 내성균주의 유행가능성이 높아 집단 발생 시 유행균주 특성 및 내성형 균주의 특성에 대한 자료 확보는 집단발병 및 유행가능성을 조기에 파악하는데 매우 효과적이다.

이에 질병관리청 세균분석과에서는 2006년부터 급성호흡기 감시망사업을 통해 수집된 호흡기 검체에서 분리된 마이코플라스마 폐렴균 분리주에 대한 특성을 지속적으로 분석하였다. 그 결과, 국내 분리 마이코플라스마 폐렴균에 대한 분자역학 DB 구축을 위한 기초 자료를 확보할 수 있었다.

본 연구를 통해 국내 분리 마이코플라스마폐렴균의 MLST 유형 중 ST3과 ST14 형이 주된 유형으로 분포하고 있음을 확인하였고, ST2, ST7, ST20, ST33 유형도 확인할 수 있었다. 그리고 낮은 빈도지만 기존에 알려진 유전형과 다른 새로운 유형(NT)도 확인되었다. 2018년과 2019년 분리주에서 확인된 ST20, ST33 유형은 8종의 housekeeping 유전자 중 adk, gmk 2종의 유전자

allele type 종류가 다양하게 나타남을 확인하였다(자료 미제공). ST 유형뿐 아니라 각 유전자별로도 변화양상이 확인되어 국내 마이코플라스마 폐렴균의 유전형 분포가 변화되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 국내 마이코플라스마 폐렴균 감염증의 유행 양상과 균의 변이 추세를 확인하고 관리하기 위해서는 지속적인 감시가 필요하고, 마크로라이드계열 외 추가 항생제 내성에 대한 분석과 NGS법 등 보다 변별력이 높은 유전형 분석법의 적용도 필요하다고 사료된다.

① 이전에 알려진 내용은?

마이코플라스마 폐렴균에 의한 호흡기 질환은 전 연령층에서 발병 가능한 상기도 및 하기도 감염증의 원인 균 중 하나로 학동기 연령층에서 주기적으로 유행하며 집단 발생의 가능성이 높다. 최근 국내외 마크로라이드계열 항생제 저항성을 나타내는 내성균주의 유행 가능성이 높다.

② 새로이 알게 된 내용은?

급성호흡기 감시사업을 통해 분리된 마이코플라스마 폐렴균주의 MLST 분자유전학적 분석 결과, 국내 분리 마이코플라스마 폐렴균의 ST 유형은 총 7개(ST2, ST3, ST7, ST14, ST20, ST33, new type)유형으로 확인되었고, ST3(53.5%)와 ST14(31.5%)유형이 주요 분포 유형인 것으로 확인되었다.

③ 시사점은?

급성호흡기감시망 구축을 통해 확보된 국내 분리 마이코플라스마 폐렴균의 분자유전학적 유형 분석을 통해 주요 유전형 종류 및 분포양상 등을 확인할 수 있었고, 향후 항생제 감수성 시험 및 NGS 등 추가적인 분석을 통해 마이코플라스마 폐렴균주 유행과 변이 추세를 예측하고 관리하는데 유용한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다. 그러므로 마이코플라스마폐렴균 감염증의 유행과 균 변이 양상을 확인하고 관리하기 위해 지속적인 마이코플라스마 폐렴균에 대한 감시가 필요하다.

analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 2009;47:914–923.

6. Cousin–Allery A, Charron A, De Barbeyrac B *et al*. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR–based methods and pulse–field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol. Infect. 2000;124(1):103–111.
7. Mariko Ando, Miyuki Morozumi, Yoko Adachi, Kimiko Ubukata, Satoshi Iwata, Multilocus Sequence Typing of *Mycoplasma pneumoniae*, Japan, 2002–2016. Emerging Infectious Diseases. 2018;24(10):1898–1901

참고문헌

1. Waites, K.B. and Talkington, D.F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2004;17(4):697–729.
2. Jacobs E, Ehrhardt I, Dymke R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. Int J Med Microbiol. 2015;305:705–708.
3. Loens K, Goossens H, Leven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29:1055–1069.
4. Brown RJ, Holden MTG, Spiller OB, Chalker VJ. Development of a multilocus sequence typing scheme for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2015;53:3195–203.
5. Degrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bebear C, *et al*. Development of multiple –locus variable–number tandem–repeat

Abstract

Multilocus sequence typing analysis of *Mycoplasma pneumoniae* strains isolates in Korea, 2006-2019

Kim Sohyeon, Kim Donghyeok, Chun Jeong-Hoon, Hwang Kyujam

Division of Bacterial Diseases, Bureau of Infectious Disease Diagnosis Control, Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA)

Jung Sangoun

Gyeongnam Regional Center for Disease Control and Prevention, RCDC

It is generally accepted that *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) induces both upper and lower respiratory infections and is responsible for about 20-40% of community-acquired pneumonia. *M. pneumoniae* infection occurs endemically, with epidemic peaks every three to four years, mostly in children over five years of age. Recent studies indicated that a critical issue is the emergence of antibiotic resistant strains and an increase in the ratio of distribution strains. Therefore, this study hypothesized that a genotype analysis of strains would be useful to determine and monitor the cause and the epidemic patterns of an outbreak.

Multilocus sequence typing (MLST) is routinely performed for strain differentiation in many genera of bacteria, and is useful for strain differentiation of *M. pneumoniae*. This article determined that MLST method was used to confirm the molecular epidemiologic relationship between epidemic patterns and antibiotic resistance in 127 *M. pneumoniae* strains isolated in Korea from 2006 to 2019. This study found that the age distribution of the strains was highest among children aged 0 to 9 years (59.8%, 76 cases) and 10 to 19 years (17.3%, 22 cases).

The major MLST genotypes detected in the housekeeping genes were ST3 (53.5%), ST14 (31.5%) and 4 minor genotypes were also detected (ST2, ST7, ST20, ST33). Moreover, a new sequence type(ST) was observed in 2018 as 0.8% of frequency and ST33 was also observed in 2019 as 2.4% of frequency. According to this article's comparison of the STs of *M. pneumoniae* strains identified with macrolide-resistance gene mutation (23S domain V, A2063G), the frequency of ST3 (18, 66.7%), ST14 (3, 11.1%), ST20 (3, 11.1%), ST7 (1, 3.7%), ST33 (1, 3.7%), and NT(1, 3.7%) was confirmed. This study confirmed that the distribution of STs and the genotype of *M. pneumoniae* in Korea are changing.

Therefore, continuous respiratory infection monitoring is necessary to predict and control the prevalence and strains characteristics of *M. pneumoniae* in Korea. This study further recommended the use of antibiotic sensitivity tests and additional characterization analyses of strains and new ST type identification methods.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, MLST, Genotype, Macrolide, Antibiotic resistance gene mutation, NGS

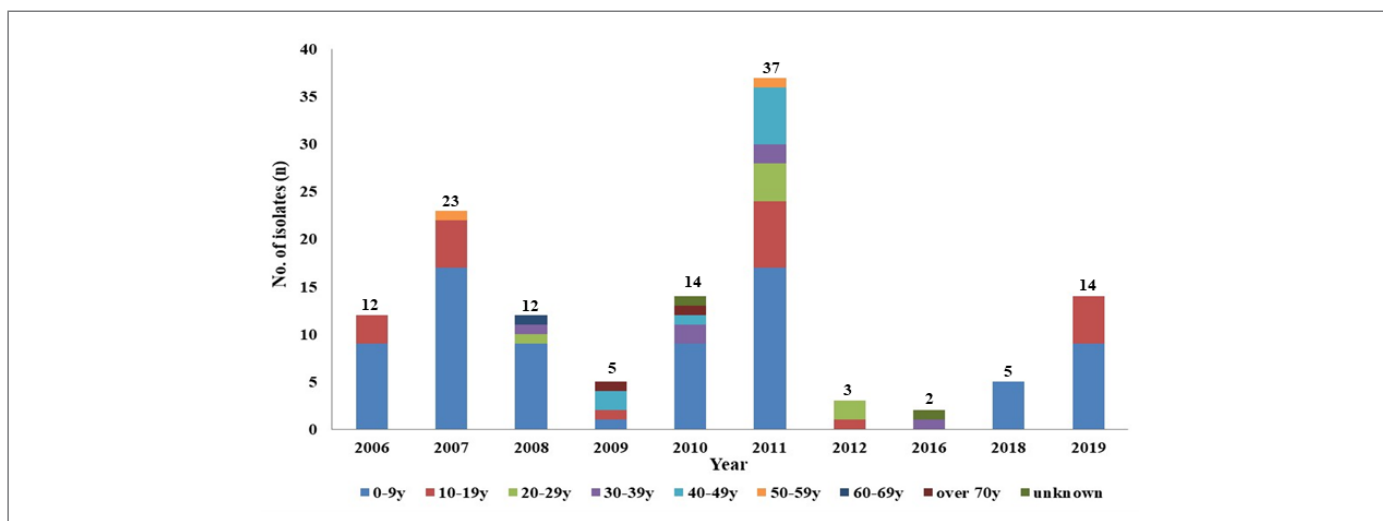


Figure 1. Annual incidences of *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) isolates between 2006–2019

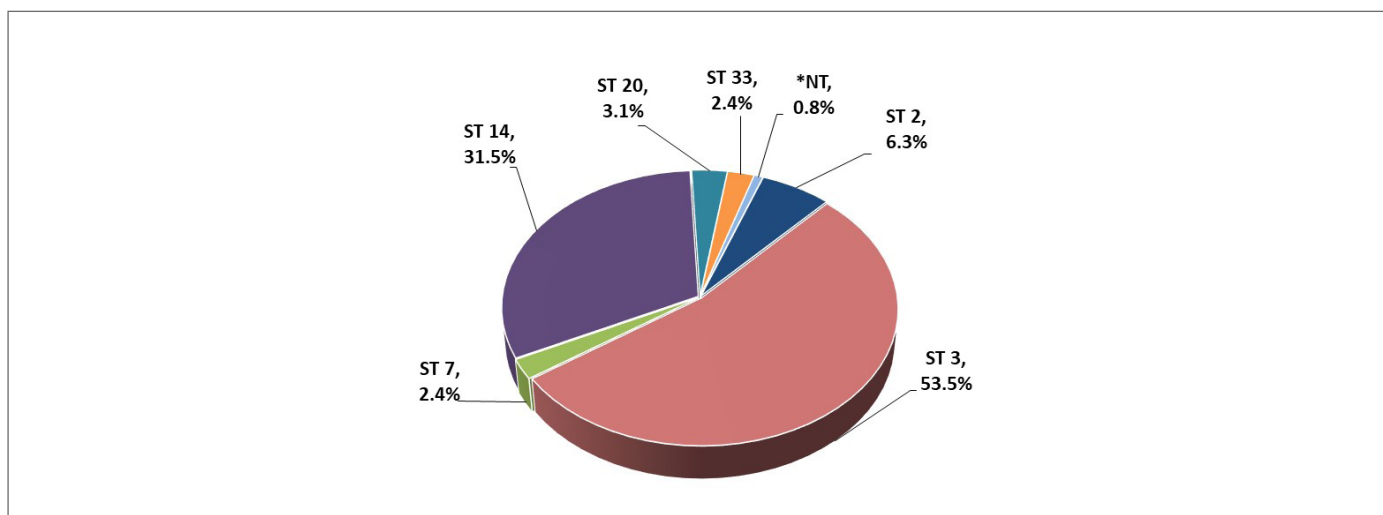


Figure 2. Distribution of multilocus sequence typing (MLST) sequence types (STs) for *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) isolates between 2006–2019

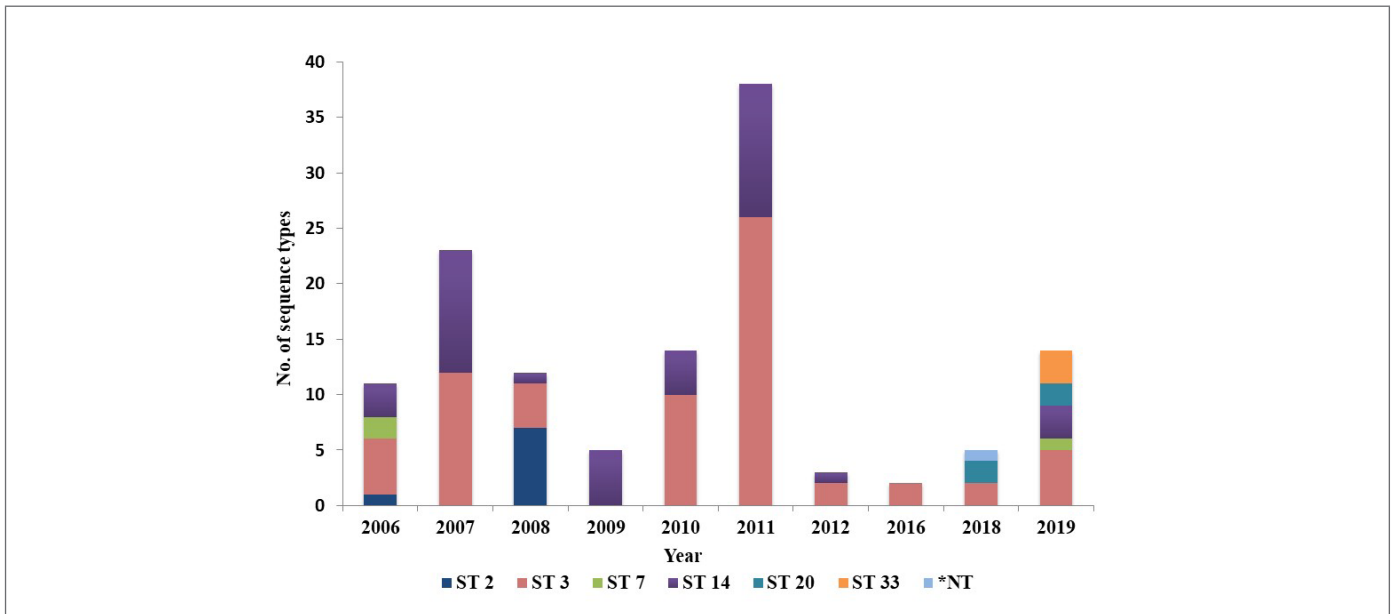


Figure 3. Sequence types (STs) of housekeeping genes in clinical isolates, 2006–2019

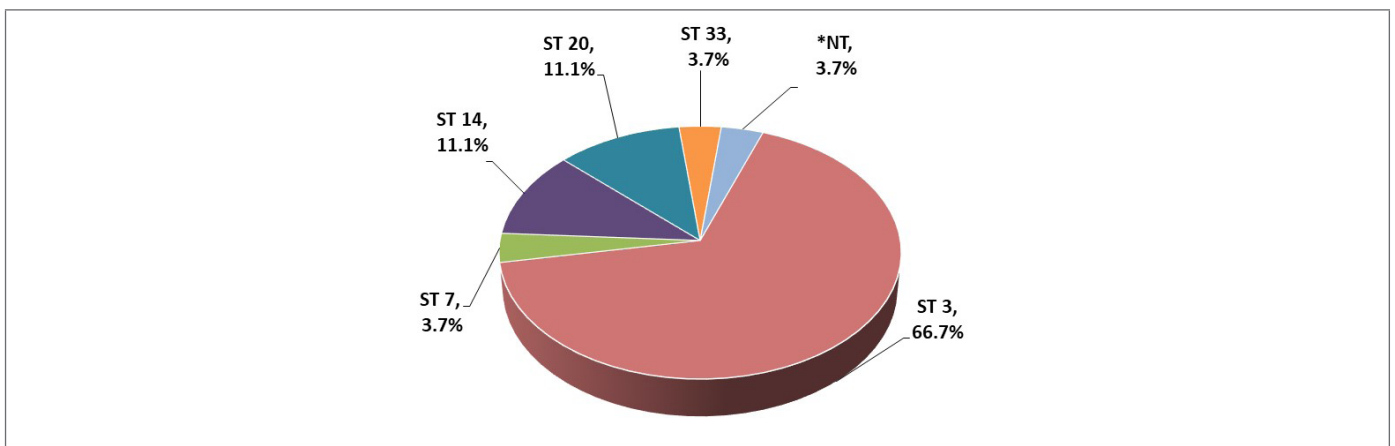


Figure 4. Distribution of multilocus sequence typing (MLST) sequence types (STs) for *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) for Macrolide resistance (23S domain V, A2063G) *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) isolates between 2006–2019