

## 국내 분리 다제내성 폐렴 구균의 페니실린 결합단백 2B 유전자 변이 양상의 분석

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 감염내과, 임상병리과<sup>§</sup>  
동아대학교 의과대학<sup>†</sup>, 아태 감염연구소\*, 아시아 태평양 감염연구재단<sup>‡</sup>

송재훈 · 양지원<sup>\*,†</sup> · 진정화<sup>\*,†</sup> · 강수정<sup>\*,†</sup> · 홍현승<sup>\*,†</sup>  
김신우 · 이 혁<sup>‡</sup> · 김춘관 · 백경란 · 김성민 · 이남용<sup>§</sup>

### Unique Alterations in Penicillin-binding Protein 2B of Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Korea

Jae-Hoon Song, M.D., Ji-Won Yang,<sup>\*,†</sup> Joung Hwa Jin<sup>\*,†</sup>, Su Jung Kang<sup>\*,†</sup>  
Hyun-Seung Hong<sup>\*,†</sup>, Shin Woo Kim, M.D. Hyuck Lee, M.D.<sup>‡</sup>, Choon Kwan Kim, M.D.  
Kyong Ran Peck, M.D., Sungmin Kim, M.D. and Nam Yong Lee, M.D.<sup>§</sup>

Division of Infectious Diseases and Department of Clinical Pathology<sup>§</sup>, Samsung Medical Center,  
Sungkyunkwan University School of Medicine, Division of Infectious Diseases,  
Dong-A University College of Medicine<sup>†</sup>, Infectious Disease Research Institute\*,  
Asian-Pacific Research Foundation for Infectious Diseases<sup>‡</sup>

**Background :** Pneumococcal resistance became a global issue during the past decades. Korea is reported to be the hottest spot in the world with regard to the prevalence of penicillin- and multidrug resistance. Previous molecular epidemiologic studies strongly suggested that antibiotic-resistant pneumococci from Korea are genetically related. To investigate the molecular characteristics of multidrug-resistant (MDR) pneumococcal isolates in Korea, we performed the DNA sequencing of the gene encoding penicillin-binding protein (PBP) 2B.

**Methods :** A total of 9 invasive MDR strains which were collected from 1990 to 1995 in various parts of Korea and one internationally epidemic Spanish 23F clone were analyzed. The 1.5 kb transpeptidase-encoding region (TER) of PBP 2B gene was amplified and directly sequenced using ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer). Sequence data were compared with that of a penicillin-susceptible R6 strain.

**Results :** Alterations in nucleotide sequence (5.4 ~

7.8%) and amino acids (3.0~4.3%) of the PBP 2B gene were relatively uniform among 9 Korean MDR strains. Most alterations in nucleotides (86~94%) and amino acids (86~100%) were noted in the hypervariable region between 408 and 993 bp. All 9 strains possessed 14 common alterations in amino acids, among which Asn-276→Lys, Arg-285→Cys and Ser-305→Phe substitutions were unique to Korean MDR strains.

**Conclusion :** Sequence analysis of invasive MDR strains showed that a limited number of amino acid substitutions were noted in the wild-type Korean MDR strains in the transpeptidase domain of the PBP 2B gene. Data strongly suggest the possibility of the spread of a few epidemic clones of resistant pneumococci within Korea, which could partly explain the rapid increase of pneumococcal resistance. (Korean J Infect Dis 32:108~114, 2000)

**Key Words :** Pneumococcus, Multidrug-resistance, Penicillin-binding protein 2B, DNA sequencing

\*본 연구는 삼성생명과학 연구소 연구비(C-95-061-3) 및 삼성의료원 임상연구비의 지원으로 이루어졌음.

접수: 2000년 2월 10일, 승인: 2000년 3월 15일

교신저자: 송재훈, 성균관의대 삼성서울병원 감염내과

Tel : 02)3410-0320, Fax : 02)3410-0328 E-mail : jhsong@smc.samsung.co.kr

## 서론

폐렴구균의 항균제 내성은 1967년에 최초로 페니실린에 대한 중등도 내성을 가지는 균이 발견된 이후<sup>1)</sup>, 지난 30여년간 세계 각지에서 내성율이 급증하여 항균제 내성의 새로운 문제가 되었다<sup>2, 3)</sup>. 폐렴구균의 페니실린 내성은 한국의 70~80%를 선두로 하여 아시아 및 동유럽 국가 등에서 50% 이상의 내성율을 보이고 있으며<sup>4, 7)</sup>, 3가지 이상의 약제에 동시 내성을 보이는 다제 내성 균주의 빈도 역시 증가하고 있다<sup>8)</sup>. 이러한 역학적 현상은 정도의 차이는 있으나 세계의 여러 나라에서 공통적으로 발생하고 있으며, 내성의 전파라는 현상이 중요한 기여를 하고 있다. 폐렴구균의 항균제 내성은 한 지역 내에서는 물론 국가간 혹은 대륙 간에도 전파됨이 이미 잘 알려져 있으며<sup>9, 10)</sup>, 스페인에서 유래한 혈청형 23F 균주의 경우 전 세계적으로 전파되었음도 확인되고 있다. 저자 등은 기존에 보고한 분자 역학 연구에서 국내에서 분리된 다제 내성 폐렴구균이 상호 간에 유전적 상관성을 가지고 있음을 입증하여 내성의 전파가 있을 것임을 시사한 바 있다. 즉, 국내의 다제내성 균주는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)<sup>11)</sup>, penicillin-binding protein (PBP) profile<sup>11)</sup>, ribotyping<sup>12)</sup> 및 PBP gene의 fingerprinting 분석<sup>13)</sup>에서도 동일한 양상을 보임으로써 상호간의 유전적 상관성이 있음이 확인되었으며, 이러한 결과는 외국의 보고와 일치하는 것이었다.

폐렴 구균이 페니실린을 비롯한 베타락탐 제제에 내성을 가지는 기전은 페니실린 결합단백(penicillin-binding protein, PBP)의 변화 때문으로 알려져 있다. 기존의 연구에 의하면 페니실린 내성은 주로 PBP 2B 유전자의 변화 때문이며<sup>14)</sup>, cephalosporin 제제에 대한 내성은 PBP 1A와 2X 유전자의 변화 때문이다<sup>15)</sup>. 따라서 폐렴구균의 PBP 구조를 분석하는 것은 내성 균주 간의 유전적 상관성을 PBP 구조의 변화를 비교함으로써 직접적으로 확인하는 분자 역학 자료를 얻을 수 있을 뿐 아니라, 항균제 내성의 기전을 규명하는 기초적인 자료가 될 수 있다. PBP 구조의 분석은 H<sup>3</sup>-benzylpenicillin을 이용하여 PBP 친화도의 변화 양상을 보는 PBP profile, 제한효소를 이용하여 절편 양상을 비교하는 fingerprinting analysis 및 염기서열을 직접적으로 확인하는 DNA sequencing 등을 통하여 가능하다.

이에 저자 등은 국내분리 다제내성 폐렴구균을 대상으로 페니실린 내성의 주된 원인이 되는 PBP 2B 유전자의 핵산 구조를 직접 분석하는 DNA sequencing을 시행하여 내성 균주에서 PBP 유전자의 구조를 검색하고 내성 균주간의 유전

자의 구조 변화 여부를 비교 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 균주

본 실험의 대상이 된 10균주 중 9균주는 1990년부터 1995년까지 삼성의료원과 서울중앙병원에서 분리된 폐렴구균 균주들 중 일부였으며, 모든 균주가 실제 폐렴구균 감염증을 일으킨 침습성 균주로서 전국 각지에서 서로 다른 시기에 내원한 환자로부터 채취된 균주였으므로 역학적으로 무관한 균주들이었다. 국내 균주와 함께 전 세계적으로 전파된 스페인 23F 균주를 함께 분석하였고, 내성 균주들의 유전자 구조 변화 여부를 판별하기 위한 표준 균주로 페니실린 감수성 균주인 R6를 이용하였다.

국내 균주는 항균제 감수성 검사의 결과를 토대로 3종류 이상의 항균제에 동시 내성을 보이는 균주 중 무작위로 선택하였다. 각 균주의 항균제 감수성 검사는 1 µg oxacillin 디스크(Beckton Dickinson Microbiology Systems)를 이용하여 디스크 확산법으로 페니실린에 대한 내성 여부를 검색하였으며, 이 균주들을 대상으로 penicillin, ampicillin, cefuroxime, cefaclor, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol의 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 한천 희석법을 이용하여 구하였다<sup>16)</sup>. 항균제 내성의 해석은 1999년 NCCLS breakpoint를 기준으로 하였다<sup>17)</sup>. 항균제 감수성 검사의 표준 균주로 *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. aureus* ATCC 29213을 사용하였다. 폐렴구균의 혈청형은 group-specific antisera (Statens Seruminstitut, Denmark)를 이용한 Quellung 반응으로 검사하였다. 대상 균주의 항균제 감수성 결과, 혈청형, 분리 검체 및 분리 년도는 Table 1과 같다.

### 2. 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 이용한 PBP 2B 유전자의 증폭

고식적인 방법으로 폐렴구균의 염색체 핵산을 분리 추출한 후, 아래의 primer를 이용하여 PCR로 PBP 2B 유전자의 1.5 Kb의 transpeptidase-encoding region (TER)을 증폭하였다<sup>18)</sup>. PCR을 위한 primer는 5'-GAT CCT CTA AAT GAT TCT CAG GTG GCT GTT-3' (upstream)과 5'-CA ATT AGC TTA GCA ATA GGT GTT GG-3' (downstream)이었다. 이 primer를 이용하여 template DNA 1 µg, Primer 20 pmol (each), dNTP 200 µM, Taq polymerase (Takara, Japan) 5 U, 10X Taq buffer 10 µL, D.W를 혼합하여 총 100 µL가

**Table 1. Antimicrobial Susceptibility and Serogroups of 9 Isolates of MDR *S. pneumoniae* from Korea**

Strain No.	Isolation Year	Specimen source	Serogroup	Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )									
				PC*	CTX	CTR	CLO	CFX	AM	IMP	TC	EM	CM
R6				$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 1$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	0.5	$\leq 0.06$	4
Sp23F	1989		23	2	1	1	128	8	2	0.5	16	$\leq 0.06$	32
1	1990	Blood	23	4	2	2	128	8	4	0.5	8	0.25	8
2	1991	Blood	23	4	2	2	128	8	4	0.5	0.5	2	8
3	1992	Blood	6	4	2	2	128	8	4	0.5	8	1	8
4	1992	Blood	23	4	2	2	128	8	4	0.5	1	0.25	8
5	1993	Blood	19	4	2	2	128	8	8	0.5	4	0.25	16
6	1994	Blood	19	4	2	2	128	4	4	0.5	2	16	16
7	1995	Sputum	23	2	4	2	128	8	4	0.5	8	8	8
8	1995	Sputum	19	2	4	2	128	8	4	0.5	16	32	4
9	1995	Sputum	23	2	4	2	128	8	4	0.5	32	32	4

\* PC : penicillin, CTX : cefotaxime, CTR : ceftriaxone, CLO : cefaclor, CFX : cefuroxime, AM : ampicillin, IMP : imipenem, TC : tetracycline, EM : erythromycin, CM : chloramphenicol.

되도록 하였다. PCR은 DNA Thermal cycler 480 (Perkin Elmer, New Jersey, U.S.A.)을 이용하여 denaturation을 95℃에서 1분, annealing 53℃에서 2분, polymerization 72℃에서 2분간 시행하는 조건으로 30 cycle을 시행하였다.

### 3. 증폭 산물의 DNA sequencing

PCR에 의한 증폭 산물은 PCR primer와 internal primer 5'-ATT CCT TGG GAA CGG TAA CC-3' (1347~1366 bp), 5'-CGA GGA GCC ACA CGA ACA CC-3' (1844~1863 bp)를 사용하여 ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer)로 핵산 구조를 직접 분석하였다.

## 결 과

1990년부터 1995년까지 한국에서 분리된 폐렴구균 9균주의 혈청형은 23, 19, 6이었고, 환자의 혈액과 객담에서 분리되었으며, 베타락탐제를 포함 3개 이상의 항균제에 내성을 보였다. 국내 분리 다제 내성 폐렴구균 9 균주의 PBP 2B 유전자의 TER 구조는 5.4~7.8%의 nucleotide와 3.0~4.3%의 아미노산이 변이되어 일정 범위 내에서 비교적 균일한 양상을 보였다(Table 2). 유전자의 변이는 TER의 특정 지역에 집중되어, nucleotide 구조의 변이 중 86~93.7%와 아미노산 변이 중 85.7~100%는 1219~1804 bp 내의 고변이 구역(hypervariable region)에서 발견되었다. Figure 1에서 보이는 바와 같이 국내 분리 내성 균주들의 유전자 구조는 1,463 bp (codon 218)과 1,726 bp (codon 305) 사이에서는 동일하였다.

**Table 2. Percentage of Sequence Variations of the Nucleotides and Amino Acid of the PBP 2B Gene in Korean MDR Strains Compared with a Penicillin-susceptible R6 Strain**

Strain No. (Year of isolation)	% Sequence variations of the PBP 2B gene	
	Nucleotide alterations	Amino acid alterations
1 (1990)	5.4 (93.7)*	3.0 (100.0)*
2 (1991)	5.4 (93.7)*	3.0 (100.0)*
3 (1992)	5.6 (91.4)*	3.0 ( 88.2)*
4 (1992)	5.4 (93.7)*	3.0 (100.0)*
5 (1993)	5.6 (91.4)*	3.0 (100.0)*
6 (1994)	5.4 (93.7)*	3.0 ( 93.3)*
7 (1995)	5.6 (92.6)*	3.4 ( 94.1)*
8 (1995)	6.8 (86.0)*	3.4 (100.0)*
9 (1995)	7.8 (91.2)*	4.3 ( 85.7)*

\* Figures with asterisk are the percentage of the alterations in the hypervariable region between 408 and 993 bp out of a total alterations of nucleotides or amino acids.

전체적으로 보아 폐렴구균 PBP 2B 유전자의 TER에서는 9 균주에서 총 30개의 아미노산이 변이되었으며, 이 중 14개의 변이는 모든 균주에 공통적인 변이였다. 공통 변이는 Ser-218→Pro, Asn-228→Tyr, Thr-232→Lys, Gln-233→Leu, Gln-244→Glu, Thr-252→Ala, Leu-261→Ile, Asn-276→Lys, Ser-279→Thr, Glu-282→Gly, Arg-285→Cys, Ser-286→Ala, Thr-295→Ala, Ser-305→Phe였다. 스페인 혈청형 23F 균주는 국내 균주의 아미노산 공통 변이 14개 중 Asn-276→Lys, Arg-285→Cys, Ser-305→Phe의 변이가 없었으나, 나머지 11개의 아미노산 변이는 국내 내성 균주와 동일하였다. 표준 균주로 사

	000000000 00000001111111 1111111111 111111 11 11 1 1 111111
CODON	123333445 55666780023333 44444444555 5556666 66 67 7 7 7777788 991235014 67279241396789 12345678234 5670123 67 90 1 2 3578901
SITE	11133333233133333333333123333333333133333313313313131333333313
R6	CAGGTCGCAAGCCACACTATGAGATACGTTACCCCTCAAGTGTGATTGCTGAAGGGTTCTG
SP	-C---A---T---T---CGC---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
1	-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
2	-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
3	-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
4	-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
5	A-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---C---C---T---
6	-C---A-----T---C-C---G---GG---C-T---ACC---C---T---
7	-C---A---T---T---C-C---G---TA-----T-A-C---CC---C---T---
8	--ACTATGTAATTT-GT-C---GG---GTTTGTGTC-----C---C---C-T---
9	-CA---A-----TG---ATAC---TTACA-TA---TTGTA-GAA-ACATCAG-ACAACACT
	*
	111111122222222222 222222 2 222222222222 22222 22 2222222 22
CODON	8899999900000111111 122223 3 3333344444455 55555 66 6667777 77 2912346705678124678 906782 3 4567802345602 35789 01 3482367 89
SITE	33333333333333333331333331231233333333131313333313313333333313313
R6	ATTGTCGGCTACGCGGCTCTCCCACTCATCTACCGCTCAACTCACTATCTGACCCTCAGTT
SP	-C---T---TTA-AAT-CT-T-TAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATA-TGAAA
1	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
2	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
3	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
4	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
5	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
6	-C---CT---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
7	-C---T---TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTCGTCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
8	-CGGATCT-TTA-AAT-CT-TATTAATTATATTTTGGCTTGCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
9	TAAACT-TTCG-T-TACAC-ATTAATTATATTTTGGCTTGCTCTCTAACCAGATAG-GAAA
	* *
CODON	2 222 22233333333344444 8 888 99901223333400135 2 456 45759021489401323
SITE	23311331323313333112123
R6	AGGCTATAACTTGG-AAACCGGC
SP	GAT-GGGGC-CCTC-----
1	GATTGGGGCTCCTC-----
2	GATTGGGGCTCCTC-----
3	GATTGGGGCTCCTC---C-T-
4	GATTGGGGCTCCTC-----
5	GATTGGGGCTCCTC---T---
6	GATTGGGGCTCCTC---G----
7	GATTGGGGCTCCTC---A---
8	GATTGGGGCTCCTC-----
9	GATTGGGGCTCCTC-CAGG--C-T

**Figure 1.** Sequence variation in the PBP 2B genes of MDR pneumococcal isolates from Korea listed in Table 1 and the Spanish 23F clone. Each of the sites where the sequence of one or more of the PBP 2B genes differs from that of a strain R6 are shown. Sites where all of the 11 sequences are identical are not shown. Sites 1, 2 or 3 indicate the first, second or third nucleotide in the codon, respectively. Shaded areas indicate the common alterations in amino acids among Korean strains; Ser-218→Pro, Asn-228→Tyr, Thr-232→Lys, Gln-233→Leu, Gln-244→Glu, Thr-252→Ala, Leu-261→Ile, Asn-276→Lys, Ser-279→Thr, Glu-282→Gly, Arg-285→Cys, Ser-286→Ala, Thr-295→Ala, and Ser-305→Phe. Codons with asterisk (\*) indicate the common and unique alterations in amino acids among Korean MDR strains. SP is the Spanish 23F clone. Amino acid alterations in the penicillin-susceptible strains are not shown.

용된 페니실린 감수성 R6의 유전자 구조는 EMBL, GenBank, DDBJ nucleotide sequence data library에서 X 16022로 확인할 수 있으며, 본 연구에서 분석된 국내 내성 균주들의 유전자 구조는 GenBank accession No. AF 180878부터 AF 180886에서 확인할 수 있다.

## 고 찰

페렴구균의 항균제 내성은 지난 30여 년간 세계 각지에서 문제가 되어 왔으나, 국내에서 본격적으로 주목을 받게 된 것은 1995년도에 일련의 연구들이 공통적으로 70% 이상의 페니실린 내성율을 보고하면서 부터이다. 정 등의 보고에서 밝혀진 바와 같이 국내의 페니실린 내성율은 1988년의 29%에서 1993년에 77%로 증가되어 5년 사이에 2~3배의 급증을 보였다<sup>5)</sup>. 또한 국내 역학 연구에서 페니실린 내성 뿐 아니라 3가지 이상의 항균제에 동시 내성을 보이는 다제 내성 균주의 비율도 30%를 넘어 역시 세계 최고 수준을 보이고 있음이 확인되었다<sup>6)</sup>. 저자 등이 1996~1997년에 시행한 ANSORP (Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens)의 다국가 공동 연구에서 아시아 국가에서의 페렴구균의 페니실린 내성율은 한국(서울)의 80%를 필두로, 일본(나가사키) 65%, 태국(방콕) 58%, 베트남(호치민시) 60%로 아시아 국가들에서의 페렴구균 내성 문제가 심각함을 확인할 수 있었다<sup>7)</sup>. 특히 이 연구에서 시행한 PFGE와 PBP 유전자의 fingerprinting 분석 결과 아시아 국가들에서 분리된 페니실린 내성 균주는 상호 간에 유전적 상관성을 가지고 있으며, PFGE pattern이 스페인 혈청형 23F 균주와 동일한 것이 확인되어 전 세계적으로 유행하는 이 균주가 아시아 국가에도 도입되었음을 확인하였다. 이러한 국내 및 아시아 지역의 역학 상황은 기존의 보고에서 가장 높은 내성율을 보이는 지역으로 알려진 헝가리<sup>19)</sup>, 스페인<sup>20)</sup>, 남아공화국<sup>21)</sup> 등보다 훨씬 높은 내성율을 보이는 것으로 세계적인 주목을 받고 있다. 국내의 페렴구균 내성율이 급증하는 현상은 기본적으로 항균제의 오남용으로 인한 선택적 압력이나 혈청형 19F와 23F의 광범위한 분포 외에 내성 균주 혹은 유전자의 전파가 단기간에 내성율을 증폭시키는 중요한 원인으로 작용하였을 가능성이 있다.

내성의 전파는 1991년에 Munoz 등이 스페인의 혈청형 23F 내성 균주가 미국 오하이오 주의 보육원에서 발견된 것을 입증함으로써 대륙 간 전파를 처음으로 확인한 이래<sup>9)</sup>, 지역 내<sup>22)</sup>, 대륙간 혹은 국가간 전파에 대한 보고가 이어져 전 세계적으로 페렴구균의 항균제 내성을 증폭시키는 주요 원인

임은 이미 확인된 바 있다. 저자 등도 기존에 보고한 일련의 분자 역학 연구들에서 국내분리 다제내성 페렴구균 간에 유전적 상관성이 있어 국내에서의 내성 전파가 있음을 강력히 시사한 바 있다. 이러한 기존의 분자 역학 연구 방법들은 그 자체로도 변별력이 우수하여 널리 시행되는 방법들이다. 그러나 본 연구는 PBP 유전자의 DNA sequencing을 시행하여 다제내성 페렴구균의 내성이 발현하는 기전이 되는 PBP 유전자의 구조적인 변화 양상을 직접 비교 분석함으로써 내성 균주 간의 유전적 상관성을 재확인함은 물론 내성 발생의 분자 기전을 연구하기 위한 기본적인 토대를 마련하고자 하였다.

본 연구의 결과 국내 분리 다제내성 균주의 PBP 2B 유전자의 구조는 매우 유사함을 확인하였다. Nucleotide 변이의 60% 이상은 아미노산 변이를 동반하지 않았으며, 모든 균주에서 일정한 범위 내에서 아미노산 변이가 관찰되었다. 기존의 보고에서와 마찬가지로 PBP 2B 유전자의 TER 중심부 전후 600 bp 내에서 대부분의 변이가 발생하여 고변이 구역을 형성하고 있었다. 국내 분리 다제 내성 9균주에 발견된 공통적인 14개의 아미노산 변이는 감수성 균주에서는 발견되지 않았으며, 이 중 Ser-218→Pro, Asn-228→Tyr, Thr-232→Lys, Gln-233→Leu, Gln-244→Glu, Leu-261→Ile, Ser-279→Thr, Ser-286→Ala, Thr-295→Ala는 기존의 외국 보고에서 대상 균주 중 일부에서 이미 확인된 변이들이었다. 또한 Klugman 등이 남아공화국의 내성 균주에서 공통적으로 발견된다고 보고한<sup>23)</sup> Thr-252→Ala과 Glu-282→Gly의 변이는 국내 균주와 스페인 균주에서도 공통적으로 발견됨으로써, 이 변이가 PBP 2B의 페니실린에 대한 친화도를 감소시키는 역할을 하고 있을 가능성을 재확인하였다. 그러나 본 연구에서는 추가적인 변이 양상을 관찰할 수 있었다. 국내 균주에 공통적인 또 다른 변이로 Asn-276→Lys, Arg-285→Cys, Ser-305→Phe 등은 그 동안 외국 균주에서는 보고된 바 없는 국내 내성 균주 고유의 변화인 것으로 확인되었다. 이 3가지 변이는 페니실린 감수성 R6, 국내 분리 감수성 균주, 스페인 균주 및 기존의 외국 보고에서는 발견되지 않는 특이한 변이로서 국내 균주에서 처음으로 발견되었다. 이 변이 역시 Thr-252→Ala과 Glu-282→Gly와 함께 국내 균주에서의 내성 발현에 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추정된다. 일본에서 분리되는 균주에는 active-site serine (residue 385)과 Ser-X-Asn (residue 442-444) 사이에서 TGGTATACT의 특이 핵산 구조의 반복 서열이 규명된 바 있으나<sup>24)</sup>, 국내 균주에서는 이러한 변이 양상은 찾을 수 없었다. PBP 2B 유전자의 변이 양상을 분류할 경우 균주 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7은 class B 변이

양상이었으며, 균주 8과 9는 class A나 B에 속하지 않는 양상이었다. 국내 균주에서는 class A는 관찰되지 않았다. 일본 균주를 대상으로 한 보고에서도 class B 변이가 70%, class A 변이가 1.8%, A도 B도 아닌 양상이 28%로서 국내 균주의 변이 양상과 유사하다<sup>24)</sup>. 본 연구의 결과는 국내의 다제내성 균주들이 PBP 2B 유전자의 transpeptidase domain 내에서 매우 제한적인 아미노산 변이만을 보이고, 공통된 변이가 많다는 점을 처음 확인하는 것이다. 본 연구에서 유전자 구조를 확인한 대상 균주의 수는 적으나 각 균주들이 역학적으로 연관되어 있지 않은 환자에서 지난 6년간 분리된 균주임을 감안하면, 그 동안 보고되었던 분자역학 연구의 자료와 함께 국내분리 다제 내성균주 간의 유전적 상관성을 재입증하는 자료라고 할 수 있다. 본 연구의 대상 균주는 혈청형이 23, 19, 6으로 분포하고 있었으며, 서로 다른 혈청형에서 거의 동일한 PBP 유전자 구조를 가지고 있음은 내성 유전자의 전파 후 자연계에서 혈청형의 교체 현상이 있었음을 시사하는 소견이라 할 수 있다.

결론적으로 국내분리 다제내성 폐렴구균의 PBP 2B 유전자 구조를 분석한 결과 국내 균주에서 처음 발견되는 아미노산의 특이 변이를 확인하고, 내성 균주 간의 유전자 구조가 상당히 유사함을 확인함으로써 내성 균주 간의 유전적 상관성을 입증함과 동시에 국내에서 내성의 전파가 있었음을 확인하였다. 이는 최근 수 년간 국내에서 폐렴구균의 내성이 급증하는 데 결정적인 기여를 하였을 것으로 판단된다.

## 요 약

**목 적 :** 폐렴구균의 항균제 내성은 최근 전 세계적인 문제가 되고 있으며, 특히 한국은 세계에서 가장 높은 페니실린 내성율을 보이고 있다. 기존에 보고한 분자 역학 연구에서 국내 분리 다제내성 폐렴구균은 유전적 상관성이 있음이 확인된 바 있다. 이에 국내에서 분리되는 다제내성 균주의 분자유전학적 특성을 규명하고자 페니실린 내성 폐렴구균의 주된 변화 부위인 페니실린 결합단백(penicillin-binding protein, PBP) 2B 유전자의 DNA sequencing을 시행하였다.

**방 법 :** 1990년부터 1995년까지 국내 각지에서 내원한 환자로부터 분리된 다제내성 균주 9주와 세계적으로 전파된 스페인 혈청형 23F 균주를 대상으로 하였다. PBP 2B 유전자의 1.5 Kb transpeptidase-encoding region (TER)을 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭한 후, 증폭산물의 유전자 구조를 ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing kit을 이용하여 직접 분석하였다.

**결 과 :** 국내 9균주의 PBP 2B 유전자의 구조는 비교적 균일하였으며, nucleotide는 5.4~7.8%, 아미노산은 3.0~4.3%의 변이를 보였다. TER의 중심부위인 고변이 구역(408~993 bp)에서 nucleotide 변이의 86~94%와 아미노산 변이의 86~100%가 변이되고 있었다. 국내 9균주에 공통적인 아미노산 변이는 총 14개였으며, 이 중 Asn-276 → Lys, Arg-285 → Cys, Ser-305 → Phe는 그동안 외국 균주에서는 발견된 적이 없는 새로운 변이였다.

**결 론 :** 국내분리 다제내성 폐렴구균의 PBP 2B 유전자의 구조를 DNA sequencing을 통하여 분석한 결과 매우 제한적인 아미노산 변이만이 모든 균주에서 공통적으로 관찰되어, 국내 내성 균주 간의 유전적 상관성을 확인할 수 있었으며, 국내 균주에 특이적인 변이 양상도 확인하였다. 이러한 결과는 기존에 보고되었던 분자역학 연구의 결과들과 함께 국내에서 폐렴구균 내성의 전파를 증명하는 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Hansman D, Bullen MM: A resistant pneumococcus. *Lancet* 2:264-265, 1967
- 2) Appelbaum PC: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview. *Clin Infect Dis* 15:77-83, 1992
- 3) Schutze GE, Kaplan SL, Jacobs RF: Resistant pneumococcus: A worldwide problem. *Infection* 22:233-237, 1994
- 4) Lee HJ, Park JY, Jang SH, Kim JH, Kim EC, Choi KW: High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea. *Clin Infect Dis* 20:826-835, 1995
- 5) Chong Y, Lee K, Kwon OH, Henrichsen J: Capsular types and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:528-531, 1995
- 6) Song JH, Yang JW, Peck KR, Kim S, Lee NY, Jacobs MR, et al.: Spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Clin Infect Dis* 25: 747-749, 1997
- 7) Song JH, Lee NY, Ichiyama S, Yoshida R, Hirakata Y, Fu W, et al.: Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Clin Infect Dis* 28:1206-1211, 1999
- 8) Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM,

- Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al.: Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 299:735-740, 1978
- 9) Munoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J, et al.: Intercontinental spread of a multi-resistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164:302-306, 1991
- 10) Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A: Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B-*Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis* 168:158-163, 1993
- 11) 송재훈, 양지원, 이남용, 백경란, 김성민, 배직현: 국내 분리 폐렴 구균의 항균제 내성 현황 및 분자 역학 조사를 통한 내성 전파의 규명. *감염* 28:393-404, 1996
- 12) 송재훈, 양지원, 진정화, 백경란, 김성민, 이혁, 이남용: Ribotyping을 이용한 다제 내성 폐렴구균의 유전적 상관성 규명. *감염* 29:469-476, 1997
- 13) 송재훈, 양지원, 진정화, 김성민, 백경란, 이혁, 이남용: PCR fingerprinting을 이용한 국내분리 다제 내성 폐렴구균의 페니실린 결합단백 유전자의 구조 분석. *감염* 30:117-125, 1998
- 14) Laible G, Hakenbeck R: Penicillin-binding proteins in  $\beta$ -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1:355-363, 1987
- 15) Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG: Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1306-1313, 1995
- 16) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-fourth edition; approved standard*. NCCLS document M7-A4. Villanova, PA.: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth informational supplement*. NCCLS document M100-S9. Villanova, PA.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999
- 18) Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Zhou J, Martin C, Spratt BG, et al.: Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes and capsular biosynthetic genes in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5:2255-2260, 1991
- 19) Marton A, Gulyaas M, Munoz R, Tomasz A: Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis* 163:542-548, 1991
- 20) Fenoll A, Bourgon CM, Munoz R, Vicioso D, Casal J: Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis* 13:56-60, 1991
- 21) Koornhof HJ, Wasas A, Klugman KP: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: A South African perspective. *Clin Infect Dis* 15:84-94, 1992
- 22) Waltman WD, Talkington DF, Lipinski AE, Crain MJ, Dixon JMS, Briles DE: Evidence for a clonal origin of relative penicillin resistance among type 9L pneumococci in northwestern Canada. *J Infect Dis* 165: 671-675, 1992
- 23) Smith AM, Klugman KP: Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:859-867, 1995
- 24) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, Ubukata K, Konno M: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1257-1259, 1996