

국내 환자 분리 임균의 항균제
내성 현황과 분자역학적 특성

연세대학교 대학원

의과학과

김 효 진

국내 환자 분리 임균의 항균제 내성 현황과 분자역학적 특성

지도교수 이 경 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

김 효 진

김효진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2013년 12월

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 관심과 사랑으로 지도해주신 존경하는 이경원 교수님과 이혁민 교수님, 윤상선 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 아낌없는 조언으로 격려해 주신 용동은 교수님, 이양순 선생님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 연구에 전념할 수 있도록 많은 시간을 할애하고, 실험을 도와주신 서영희 선생님, 김완희 선생님과 같은 공간에서 함께 실험하며 지낸 종소리 선생님, 김인혜 선생님, Roshan에게 고마움을 전합니다. 석사 기간 동안 함께 수업을 들으며 학교생활에 적응 할 수 있도록 도움을 주신 전종수 선생님께 감사의 말씀을 전합니다.

항상 곁에서 힘이 되어준 가족에게 감사의 말을 전하며 마지막으로 비슷한 기간에 석사를 하며 고민을 나누기도 하고 학교 생활에 활력을 준 김미선, 김민애, 방수현 그리고 다른 친구들에게도 고마움을 전합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I . 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 균주 수집 및 동정	7
2. 항균제 감수성 시험	7
가. 디스크 확산법	7
나. 한천 희석법	8
다. β -lactamase 생성시험	9
3. Cephalosporin제에 대한 내성기전 규명	9
가. <i>penA</i> 유전자 염기서열 분석	9
나. <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> 및 <i>pilQ</i> 유전자 염기서열분석	10
4. 내성균의 분자역학적 성상규명	11
가. <i>N. gonorrhoeae</i> multi-antigen sequence type (NG-MAST)	11
나. Multilocus sequence typing (MLST)	11
III. 결과	13
1. 항균제 감수성	13
가. 디스크 확산법	13
나. 한천 희석법	15
2. Cephalosporin 내성 기전	18
가. <i>penA</i> 유전자 염기서열	18

나. <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> 및 <i>pilQ</i> 유전자 분석	21
3. NG-MAST	24
IV. 고찰	27
V. 결론	31
참고문헌	32
영문요약	37

그림 차례

그림 1. Distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) of ceftriaxone and cefixime among <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolates in 2011- 2012	17
그림 2. Susceptibility rates for ceftriaxone and cefixime by CLSI, EUCAST and CDS	17
그림 3. Amino acid substitutions identified in PBP2 of the <i>N. gonorrhoeae</i> strains	19

표 차례

표 1. Primers used for PCR amplification and sequencing	10
표 2. Oligonucleotide primers used in the <i>N. gonorrhoeae</i> MLST	12
표 3. Antimicrobial resistance rate of <i>N. gonorrhoeae</i> by Disk diffusion method	14
표 4. Antimicrobial resistance rate of <i>N. gonorrhoeae</i> by agar dilution method	16
표 5. Minimum inhibitory concentrations (MICs) distributions of cephalosporins for 77 <i>N. gonorrhoeae</i> isolates according to <i>penA</i> genotypes	20
표 6. Characteristics of cephalosporin decreased susceptibility for 48 <i>N. gonorrhoeae</i> isolates	22
표 7. NG-MAST summary of <i>N. gonorrhoeae</i> isolated from 2011-2012	25

<국문 요약>

국내 환자 분리 임균의 항균제 내성 현황과 분자역학적 특성

근래 다제 내성 임균의 증가로 cephalosporin 항균제 사용이 증가하였고 이로 인해 cephalosporin 항균제에 감수성이 저하된 균주들이 보고되기 시작하였다. Cephalosporin 항균제 사용이 증가한 국내의 환경을 고려하면 임균의 cephalosporin 내성에 대한 감시가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 전국 주요 지역에서 2011년부터 2012년까지 특수직업 여성 및 일반 환자로부터 배양한 임균을 수집하여 총 151주의 항균제 감수성을 디스크 확산법과 한천희석법으로 시험하였다. Penicillin G, tetracycline 및 ciprofloxacin에 내성인 균주의 비율은 각각 34%, 51% 및 93%로 높았으나, azithromycin에 내성 균주의 비율은 5%로 낮았고, spectinomycin에는 모두 감수성이었다. Cefixime 비감수성인 1주를 제외하고, ceftriaxone 과 cefixime 에 모두 감수성이었다.

감수성 시험 균주 중 cephalosporin계 항균제에 대하여 감수성이 저하된 균주 48주와 감수성 균주 29주를 대상으로 *penA*, *mtrR*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자의 염기서열을 분석하였다. Penicillin binding protein 2 (PBP 2)유전자인 *penA* 분석을 통해 PBP 2 아미노산 서열 형 8가지를 관찰하였다. 감수성 균주의 *penA* type은 IV, V, XIII, XVI, XVII, XVIII형이 보였고, 감수성 저하 균주의 *penA* type 은 V, X, XII, XIII, XVII, XVIII형이 보였다. 그 중 IV형과 XVI형은 감수성 균주에서만 나타났다. XIII형이 가장 흔하였고, 이들 대부분은 ceftriaxone 과 cefixime 또는 cefpodoxime의 MIC 값이 높았다. 모자이크 형 X형 한

주는 cefixime (MIC 0.25 µg/mL), cefpodoxime (MIC 2 µg/mL)로 높았다. *mtrR*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자의 변이는 감수성 여하에 관계없이 관찰되었다. 국내에서 분리된 임균의 sequence type (ST)은 *porB*의 차이에 의해 다양한 ST을 보이나, *tbpB*는 *tbpB21*와 *tbpB33*이 각각 49주와 39주로 유전적 연관성이 있을 것으로 생각되었다. 2011-2012년에 분리된 균주 중 *tbpB21*을 가진 균주의 대부분이 cephalosporin에 감수성이 저하되었으며 *tbpB110*와 *tbpB620*을 가진 균주도 cephalosporin 감수성 저하를 보였다. 반면, *tbpB33*을 가진 균주는 cephalosporin에 감수성이었다.

결론적으로 국내에서 분리된 임균의 대부분은 cephalosporin에 대한 감수성이었으나, 일부 균주는 감수성이 저하된 균주이었다. 모자이크형을 가진 한 주가 전세계적으로 cephalosporin 치료 실패와 관련 있는 MLST ST1901을 가지며, 일본에서 발생한 ceftriaxone 고도 내성 임균과 유사한 *penA* 모자이크형을 가지므로, *N. gonorrhoeae*의 cephalosporin 내성 출현을 모니터링 하기 위한 지속적인 감시 시스템이 필요하다고 판단된다.

핵심되는 말: 임균, *penA*, *mtrR*, *ponA*, *pilQ*, 모자이크 형 변이, *tbpB*, cephalosporin, 감수성 저하

국내 환자 분리 임균의 항균제 내성 현황과 분자역학적 특성

<지도교수 이경원>

연세대학교 대학원 의과학과

김 효 진

I. 서론

임질은 주요 성매개 감염 (sexually transmitted diseases, STDs)으로, 세균에 의한 성매개 감염질환 중 두 번째로 흔하다¹. 임균은 대부분의 남성에서 요도염 등의 비뇨생식기 감염을 일으키며, 여성에서는 무증상 보균자로부터 골반의 염증성 질환 및 불임 등 다양한 감염과 합병증을 유발한다¹. 또한 에이즈의 원인인 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 감염 가능성을 높이고, 불임과 같은 심각한 합병증을 초래 할 수 있다¹. 임균 감염은 사회경제적인 변화에 따라 대부분의 선진국에서 감소하고 있으나, 아직 적지 않은 환자가 발생하고 있으며, 개발도상국에서는 여전히 많은 환자가 발생하고 있다¹.

건강보험심사평가원 자료에 의하면 국내의 임균 감염은 2012 년에 16,962 명의 환자로부터 40,038 일의 내원 일수를 보여, 여전히 흔하였으며 최근 개방된 성문화의 등장으로 인해 그 예방 및 관리의 중요성은 더욱 부각되고 있다. 특히 2004 년 발표된 성매매 금지법으로 성매매 감염병에 대한 관리가 어려운 상황을 고려하면, 국내에서도 임균 감염 발생에 대한 주의가 필요하다. 임질은 세균 및 감염자의 특수한 상황에 의해 대부분이 1 차 의료 기관에서 경험적으로 치료된다. 적절한 경험적 치료를 위해서는 항균제 내성 현황에 대한 지속적이고 효과적인 감시가 필요하다¹.

국내에서 분리되는 임균은 과거 임질 치료에 사용하였던 penicillin G 와 tetracycline 에 거의 내성이고^{2,4}, fluoroquinolone 역시 높아진 내성률^{5,6}로 사용이 금지됨에 따라, 근래에는 cephalosporin 항균제의 사용이 증가하였다⁷. Cephalosporin 항균제 중에서는 ceftriaxone 과 cefixime 등이 주로 사용되는데, 사용 증가에 따른 항균제 선택 압력으로 인해 cephalosporin 항균제에 대한 감수성이 저하된 균주들이 전세계적으로 보고되고 있다⁸⁻¹¹. 경구용 cephalosporin 인 cefixime 에 대한 내성은 2002 년에 일본에서 처음 보고된 이후로 세계 각국에서 흔하게 보고되고 있으며, 임질 치료의 마지막 보루로 생각되던 ceftriaxone 에 대한 고도내성 임균도 2011 년과 2012 년에

일본과 유럽에서 4 주가 보고되었다⁸⁻¹¹. 임균의 cephalosporin 내성에 관여하는 유전자는 *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB1b*, *pilQ* 등이 있다¹²⁻¹³. Cephalosporin 항균제의 작용 대상인 페니실린 결합 단백 (penicillin binding protein, PBP2)를 생성하는 *penA* 는 모자이크 구조나 501 번째 아미노산인 adenine 변이가 항균제 내성과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며, *mtrR*, *ponA*, *porB1b* 및 *pilQ* 유전자의 변이도 cephalosporin 항균제 내성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

심사평가원 자료에 의하면 국내에서도 임질 감염 치료를 위한 cephalosporin 항균제의 처방률이 2002년의 10%에서 2010년에는 30%로 증가하였다. 따라서 국내에서 분리되는 임균에서도 이들 약제에 대한 내성 균의 출현 가능성이 적지 않으므로 주요 다제 내성 임균의 확산을 감시하고, 산발적으로 발생할 것이 우려되는 cephalosporin 비감수성 임균의 역학적 특성을 분석함으로써, 내성 세균 발생 시 확산을 조기에 차단하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 특히, ceftriaxone 내성 임균이 처음 보고된 일본은 한국과 지리학적으로 매우 가까울 뿐만 아니라 인적 교류가 매우 활발하다는 점에서 일본에 발생한 ceftriaxone 내성 임균이 국내에 유입될 가능성 또한 적지 않다. 본 연구에서는 국내에서 최근 분리된 임균을 대상으로 cephalosporin 항균제를 포함한 주요 항균제에 대한 내성 양상, 주요 내성 기전 및 분자역

학적 성상을 규명하여 임균 감염증의 치료와 내성균의 확산을 막기
위한 대책 수립에 중요한 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 수집 및 동정

2011년 1월부터 2012년 12월까지 전국 각 지역에 위치한 의료기관과 특수직업여성 밀집 지역에 위치한 보건소에 내원한 환자로부터 임균 감염이 의심되는 균주 또는 검체를 수집하였다. 검체는 임균이 죽지 않도록 Transgrow 배지(BBL, Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA)에 넣어 운반하였으며, modified Thayer-Martin 배지(BBL)에 접종하여 35℃에서 24시간 배양하였다. 균종 동정은 그람 염색, 전통적인 생화학적 검사와 Vitek System (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)으로 실시하였다. 동정된 균주는 -70℃ 이하의 냉동고에 보관하였다.

2. 항균제 감수성 시험

가. 디스크 확산법

시험 균주를 증류수에 현탁하여 McFarland제 0.5관 탁도에 맞춘 후, 세균 부유액을 GC agar base (BBL)에 1% hemoglobin과 1% IsoVitalEx (BBL)을 첨가하여 만든 한천에 접종하였다. Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA)사의 penicillin G (10 U), ceftriaxone (5 µg, 30 µg),

cefixime (5 µg), cefpodoxime (10 µg), cefotaxime (30 µg), spectinomycin (100 µg), tetracycline (30 µg), azithromycin (15 µg), ciprofloxacin (5 µg) 및 nalidixic acid (30 µg) 디스크를 놓은 후 5% CO₂ 항온기에 35℃에서, 24 시간 배양 후 판독하였다. Penicillin G, ceftriaxone (30 µg), cefixime, cefpodoxime, cefotaxime, spectinomycin, tetracycline 및 ciprofloxacin은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 기준¹⁴에 따라 그리고 ceftriaxone (0.5 µg), azithromycin 및 nalidixic acid는 Australian criteria (CDS) 기준¹⁵에 따라 판독하였다.

나. 한천 희석법

동결 보관 균주를 초콜릿 한천에 접종한 후 양초단지에 넣어 35℃, 24시간 배양한 후, 증류수에 현탁하여 10⁴ CFU/mL으로 희석하였다. GC agar base (BBL)에 1% hemoglobin과 1% IsoVitaleX (BBL)을 첨가하고, 규정된 희석액으로 녹인 항균제를 넣어 2배수 단계 희석된 농도가 되도록 평판을 만들었다. 세균부유액을 Steers' replicator (Craft Machine Inc., Woodline, PA, USA)로 배지에 접종하고 5% CO₂ 항온기에 35℃에서 24 시간 배양 후 판독하였다. Penicillin G, ceftriaxone, cefixime, cefpodoxime, spectinomycin, tetracycline 및 ciprofloxacin 감수성 결과는 CLSI 기준¹⁴에 따라 해석하였고, azithromycin은 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)기준¹⁶에 따라 해석하였다. Breakpoint가

결정되지 않은 gentamicin은 별도의 해석을 하지 않고, MIC₅₀과 MIC₉₀만 정리하였다. 정도 관리를 위해 *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213와 WHO 임균 정도 관리 균주인 WHO A, WHO C, WHO G, WHO K, WHO L 및 WHO P 균주를 같이 시험하였다.

다. β -lactamase 생성시험

Chromogenic cephalosporin 법인 cefinase 디스크 (BBL)로 시험하여, 노란색이 분홍색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

3. Cephalosporin제에 대한 내성기전 규명

가. *penA* 유전자 염기서열 분석

균 집락을 멸균증류수에 부유시킨 후 10분간 끓여서 2분간 13,000 rpm으로 원심 분리한 상층액 1 μ L를 template로 사용하였다. 추출한 DNA는 PBP 2의 mosaicism을 분석하기 위해 *penA* 유전자 전체를 3부분으로 나누어 각각의 primer set를 사용하여 PCR을 시행하였다 (표 1). PCR 산물은 전기영동 한 후 각 primer set에 적합한 크기의 PCR 산물을 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 추출한 후 염기서열을 분석하였다¹⁷. *penA* 서열은 penicillin과 cephalosporin 감수성 균주인 *N. gonorrhoeae* LM306 (GeneBank accession

no. M32091)와 비교하였고(그림 2), 유전형은 Ito¹⁷ 등과 Whiley¹⁸ 등이 이전에 보고한 분류에 따랐다.

나. *mtrR*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자 염기서열분석

Cephalosporin 항균제의 감수성에 영향을 미치는 유전자 다형성을 규명하기 위해 각각의 유전자에 대한 염기서열분석을 시행하였다. Template로 사용한 DNA는 위와 동일하였다. 추출한 DNA는 각각의 유전자의 promotor 부위와 유전자 부위를 분석하기 위해 각각의 primer set를 사용하여 PCR을 시행하였다 (표 1). PCR 산물은 전기영동한 후 각 primer set에 적합한 크기의 PCR 산물을 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 추출한 후 염기서열을 분석하였다¹⁷.

표 1. Primers used for PCR amplification and sequencing

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Nucleotide positions
PenA-A1	CGGGCAATACCTTTATGGTGGAAC	8-31
PenA-B1	AACCTTCCTGACCTTTGCCGTC	655-676
PenA-A2	AAAACGCCATTACCCGATGGG	597-617
PenA-B2	TAATGCCGCGCACATCCAAAG	1157-1177
PenA-A3	GCCGTAACCGATATGATCGA	1003-1022
PenA-B3	CGTTGATACTCGGATTAAGACG	1844-1865
mtrR-F	GCCAATCAACAGGCATTCTTA	2210-2191
mtrR-R	GTTGGAACAACGCGTCAAAC	190-171

ponA-F	GAGAAAATGGGGGAGGACCG	1171-1190
ponA-R	GGCTGCCGCATTGCCTGAAC	1395-1376
pilQ-F	CGTTACGCCGAACATCACG	1833-1851
pilQ-R	TGACCGAAACTGAACGGACTG	2358-2338

4. 내성균의 분자역학적 성상 규명

가. *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence type (NG-MAST)

유전자 변이가 심한 단일 유전자의 염기 서열 분석을 통해 역학적 관계를 규명하였다. *porB* 유전자 (F-CAAGAAGACCTCGGCAA; R-CCGACAACCACTTGGT) 와 *tbpB* 유전자 (F-CGTTGTCGGCAGCGC GAAAAC; R-TTCATCGGTGCGCCGCTTG)를 PCR로 증폭하고, 증폭한 산물을 전기영동 한 후, QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 DNA를 추출하였다. Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기 서열을 분석한 후에, www.ng-mast.org에 접속하여 역학적 관계를 규명하였다.

나. Multilocus sequence typing (MLST)

임균의 세포내 대사에 관여하는 7개의 주요 유전자 (Housekeeping gene)를 대상으로 염기서열 분석을 시행하였다. 인터넷을 통하여 MLST database (<http://www.mlst.net>)에 자료를 입력하여 분석하였다 (표 2)¹⁹.

2. Oligonucleotide primers used in the *N. gonorrhoeae* MLST

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Function
abcZ-P1	AATCGTTTATGTACCGCAGG	Amplification and sequencing
abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA	Amplification and sequencing
adk-P1	ATGGCAGTTTGTGCAGTTGG	Amplification
adk-P2	GATTTAAACAGCGATTGCCC	Amplification
adk-S1	AGGCTGGCACGCCCTTGG	Sequencing
adk-S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG	Sequencing
aroE-P1	ACGCATTTGCGCCGACATC	Amplification and sequencing
aroE-P2	ATCAGGGCTTTTTTCAGGTT	Amplification
aroE-S2	ATGATGTTGCCGTACACATA	Sequencing
fumC-P1	CACCGAACACGACACGATGG	Amplification
fumC-P2	ACGACCAGTTCGTCAAATC	Amplification
fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG	Sequencing
fumC-S2	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC	Sequencing
gdh-P1	ATCAATACCGCTGTGGCGCGT	Amplification
gdh-P2	GGTTTTCATCTGCGTATAGAG	Amplification and sequencing
gdh-S3	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	Sequencing
pdhC-P1	GGTTTCCAACGTATCGGCGAC	Amplification
pdhC-P2	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT	Amplification and sequencing
pdhC-S1	TATACTACATCACCTGATG	Sequencing
pgm-S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	Amplification and sequencing
pgm-S2	GGTGATGATTTTCGGTTGCGCC	Amplification and sequencing

III. 결과

1. 항균제 감수성

가. 디스크 확산법

2011년 1월에서 2012년 12월까지 수집한 임균은 총 151주이며, Penicillin, tetracycline 및 ciprofloxacin에 감수성인 균주의 비율은 0-4%이고 내성 균주의 비율은 57%, 90% 및 93%이었다. Penicillinase 생성 임균 (Penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*, PPNG)는 10주 (7%)가, tetracycline 고도 내성 임균 (Tetracycline-resistant *N. gonorrhoeae*, TRNG)는 36주 (24%)가 분리되었다. Spectinomycin과 azithromycin에 대해서는 모든 균주가 감수성이었다. Cephalosporin 항균제인 ceftriaxone (0.5 µg/30 µg), cefixime, cefpodoxime 및 cefotaxime에 비감수성인 균주 비율은 각각 53%/ 24%, 26%, 57% 및 25%이었다 (표 3).

3. Antimicrobial resistance rate of *N. gonorrhoeae* by Disk diffusion method

Antimicrobial agents (potency)	% of isolates with (N = 151)			
	Susceptible	Intermediate	NS [†]	Resistant
Penicillin G (10 U) [‡]	0	43	0	57
Ceftriaxone (0.5 µg) [*]	47	0	53	0
Ceftriaxone (30 µg)	76	0	24	0
Cefixime (5 µg)	74	0	26	0
Cefpodoxime (10 µg)	43	0	57	0
Cefotaxime (30 µg)	75	0	25	0
Spectinomycin (100 µg)	100	0	0	0
Tetracycline (30 µg) [§]	1	9	0	90
Ciprofloxacin (5 µg)	4	3	0	93
Nalidixic Acid (30 µg) [*]	6	0	94	0
Azithromycin (15 µg) [*]	100	0	0	0

^{*} Australian criteria (CDS) were applied.

[†] Not susceptible

[‡] PPNG, 7% (10/151)

[§] TRNG, 24% (36/151)

나. 한천 희석법(Agar dilution method)

한천희석법은 penicillin G, ceftriaxone, cefixime, cefpodoxime, spectinomycin, gentamicin, tetracyclin, ciprofloxacin 및 azithromycin에 대해 시행하였다 (표 4). Penicillin G, tetracycline 및 ciprofloxacin에 감수성인 균주의 비율은 0-5%이었으며, 내성인 균주의 비율은 각각 34%, 51% 및 93%로 높았다. Cefixime 비감수성인 1주 (MIC 0.5 µg/mL)를 제외하고, 모두 ceftriaxone 과 cefixime 에 감수성이었으며, MIC₉₀은 각각 0.12 µg/mL 및 0.25 µg/mL이었다. Cefpodoxime 감수성 균주의 비율은 91%로 cefixime 및 ceftriaxone 보다 낮았다. Ceftriaxone과 cefixime에 감수성이 저하된 균주 (MIC ≥ 0.12 µg/mL) 비율은 각각 25% 및 28%이었다 (그림 1). 해석 기준에 따른 ceftriaxone 및 cefixime 감수성 균주의 비율은 각각 100% 및 99% (CLSI), 97% 및 88% (EUCAST), 57% 및 56% (CDS)이었다 (그림 2). Spectinomycin에는 모든 균주가 감수성이었으며, gentamicin의 MIC₅₀과 MIC₉₀은 모두 8 µg/mL 였다. EUCAST 기준으로 판독한 결과 azithromycin 감수성인 균주는 54%이었으며, 5%는 내성이었다.

4. Antimicrobial resistance rate of *N. gonorrhoeae* by agar dilution method

Antimicrobial agents	MIC(μ g/mL)			% of isolates with (N = 151)		
	Range	50%	90%	S	I	R
Penicillin G	0.12-256	1	4	0	66	34
Ceftriaxone	≤ 0.008 -0.25	0.03	0.12	100	0 [†]	
Cefixime	≤ 0.008 -0.25	0.03	0.25	99	1 [†]	
Cefpodoxime	≤ 0.008 -2	0.12	0.5	91	9 [†]	
Spectinomycin	≤ 8 -32	32	32	100	0	0
Gentamicin	≤ 0.5 -16	8	8	NA	NA	NA
Tetracycline	≤ 0.12 -64	2	32	5	44	51
Ciprofloxacin	≤ 0.008 -64	4	16	5	2	93
Azithromycin [*]	≤ 0.06 -1	0.25	0.5	54	41	5

Abbreviation: S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; NA, not applicable

^{*}EUCAST breakpoints were applied.

[†]Not susceptible

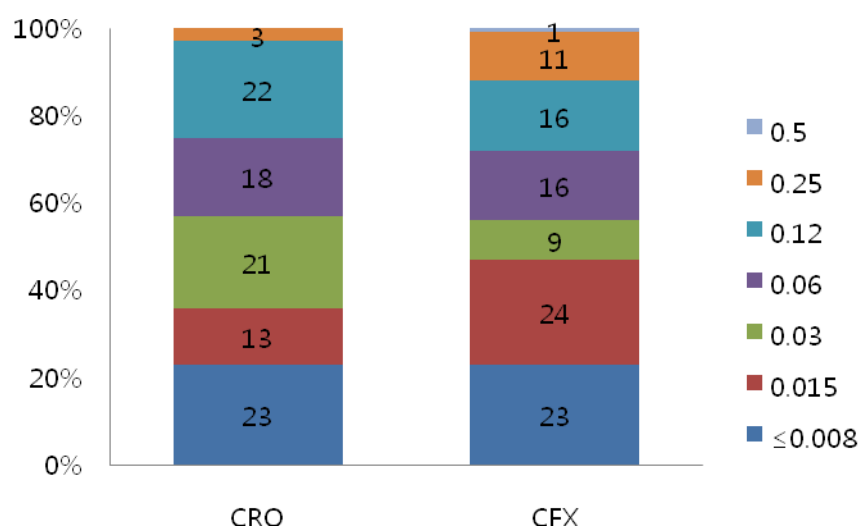


그림 1. Distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) of ceftriaxone and cefixime among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in 2011- 2012

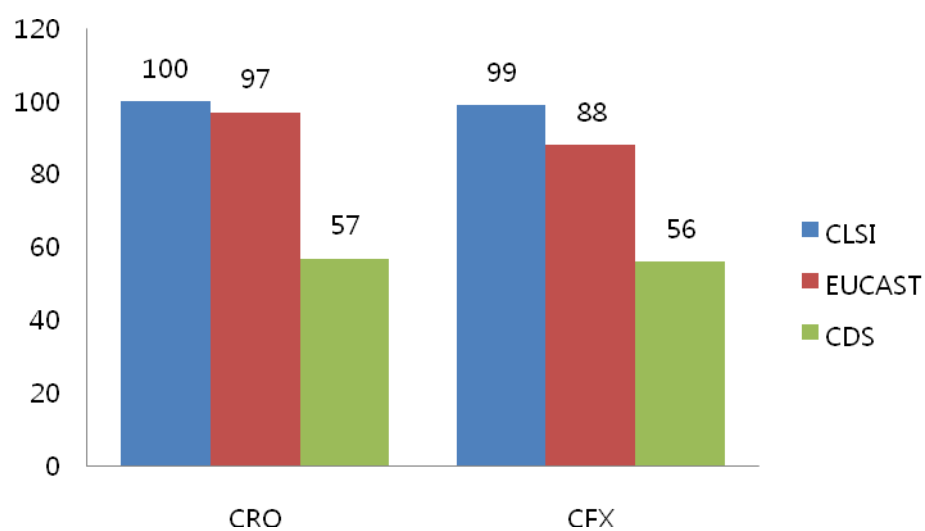


그림 2. Susceptibility rates for ceftriaxone and cefixime by CLSI, EUCAST and CDS

2. Cephalosporin 내성 기전

가. *penA* 유전자 염기서열

Cephalosporin 에 비감수성이거나 감수성이 저하된 48 균주와 감수성인 29 균주를 대상으로 *penA* 염기서열을 분석하였다. 모두 9 개의 *penA* 유전형이 관찰되었으며, XIII 형이 45 주(60%)로 가장 많았다. 다음으로는 V 형이 11 주(13%), XVIII 형이 9 주(12%) 순이었고, 1 주에서는 모자이크 형인 X 형이 관찰되었으며, 2 개의 새로운 유전형이 발견되었다. 새롭게 발견된 2 개의 새로운 유전형 중 한 개는 X 형의 101-350 번 째 모자이크 형 아미노산 변이를 가지고 있는 것으로 보이며, 다른 한 개는 503 번 아미노산을 제외한 나머지 변이 부위가 XIII 형과 동일한 유형이었다 (그림 3).

XIII 형에 속하는 대부분의 균주가 ceftriaxone, cefixime 또는 cefpodoxime 의 MIC 가 높았으며, 2011 년도에 분리된 cefixime 비감수성 1 주와 cefpodoxime 비감수성 12 주 중 11 주가 XIII 형에 속했다 (표 5). 모자이크 형인 X 형을 가진 균주는 ceftriaxone 과 cefixime 및 cefpodoxime MIC 가 각각 0.06 µg/mL 과 0.25 µg/mL 및 2 µg/mL 이었다. 반면에 IV, V 및 XVI 형 균주는 대부분 cefixime 과 ceftriaxone 의 MIC 가 낮았다. 가장 흔한 XIII 형 균주의 경우 원주를 제외한 모든 지역에 분포하였으며, 분리지역에 따른 *penA* 형의 차이는 보이지 않았다.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
M32091	MIKSEYKPMIFKEQVKKPMSNGRISFVLMNAVLFACIIARGGIYQTVTNFKGCGNRVITQALPATGTSVDNAGVALIASPTESI FAVPKDNKMSAQLERLSLVDVFDVWLNKLEQKGSFINKQIDPVAEE															
IV	(8)															
V	(10)															
X	(1)															
XII	(1)															
XIII	(45)															
XVII	(1)															
XVII	(2)															
XVII	(9)															
NEW1	(1)															
NEW2	(1)															
		160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
M32091	VKALGLENFVFEKELHEHYMGNLFPHVIGFTIIDGQGGELSLEDVSGEDGSEVWLDQGNVLSIDSPNKAFQNGKDIIISLDRIQTIAVEELNKAVEHQKAGTVVLDARTGELIALANTEAYDNRGGRADSEQRNR															
IV	(8)															
V	(10)															
X	(1)															
XII	(1)															
XIII	(45)															
XVI	(1)															
XVII	(2)															
XVII	(9)															
NEW1	(1)															
NEW2	(1)															
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450
M32091	AVTDMIEPGSAIKPFVIAKADACKTDLNRLNTQPKIGSPVR-DTHVPSLDVGRIMQKSNVGTSKLSARFGAEEDFYHELIGVYRHHSGFPGETACLLNWRMRPIEQATMSFGYQLSLQLARAYALTHDGVLPLSE															
IV	(8)															
V	(10)															
X	(1)															
XII	(1)															
XIII	(45)															
XVI	(1)															
XVII	(2)															
XVII	(9)															
NEW1	(1)															
NEW2	(1)															
		460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580		
M32091	EKQAVAPQGRIRIFKESTAREVNMTSVTEPGGTGATGVDGFGAKTGTAHFYNGRYADNKKHVAFIGFAPAKNPRVIVATIDEPTAHGYGCVAGPFPKKGSLNIGISPTKPII-AAAVKTPS															
IV	(8)															
V	(10)															
X	(1)															
XII	(1)															
XIII	(45)															
XVI	(1)															
XVII	(2)															
XVII	(9)															
NEW1	(1)															
NEW2	(1)															

그림 3. Amino acid substitutions identified in PBP 2 of the *N. gonorrhoeae* strains

ㄨ 5. Minimum inhibitory concentrations (MICs) distributions of cephalosporins for 77 *N. gonorrhoeae* isolates according to *penA* genotypes

Amb	<i>penA</i> type	Number of isolates with MIC (μg/mL) of								
		≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	≥1
CRO	IV			2	5	1				
	V	6		1	3		1			
	X					1				
	XII						1			
	XIII		1	1	4	12	23	4		
	XVI	1								
	XVII					1	1			
	XVIII	1			3		5			
CFX	IV			7		1				
	V	4		3	1	1	1	1		
	X							1		
	XII						1			
	XIII	1			1	9	20	13	1	
	XVI	1								
	XVII				1	1				
	XVIII			1	3	4	1			
CPD	IV					1	6	1		
	V				6	2	3			
	X									1
	XII								1	
	XIII				1		3	10	20	11
	XVI				1					
	XVII							1	1	
	XVIII				1	1	2	4	1	

Abbreviation: Amb, antimicrobial agent; CRO, ceftriaxone; CFX, cefixime; CPD, cefpodoxime

Bold: Number of non-susceptible isolates

나. *mtrR*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자 분석

Ceftriaxone 또는 cefixime 에 대해 비감수성이거나 감수성이 저하된 48 주 중에서, 오염으로 관찰이 불가능한 2 주를 제외하고 46 주에 대해 *mtrR*, *ponA* 및 *pilQ* 염기서열 분석을 시행하였다. 비감수성 1 균주를 제외하고 모두 *mtrR* promoter 위치에서 하나의 염기쌍 소실을 보였으며, 4 균주에서 *mtrR* ORF 내 아미노산 치환 (Ala39Thr)을 가지고 있었다. 염기쌍 소실을 보이지 않은 1 균주에서는 아미노산 치환 (Ala39Asp)이 다르게 나타났다. *penA* 유전형에서 V 형을 보인 1 균주에서는 *mtrR* promoter 위치에 한 개의 염기 삽입을 보였다. *PonA* 의 경우 1 균주를 제외하고 모든 균주에서 Leu421Pro 의 아미노산 치환을 보였다. *PilQ* 유전자에서는 대부분의 균주에서 변이가 관찰되지 않았지만 4 균주에서 1 개의 아미노산 치환(Asn27Ser) 을 보였다 (표 6).

Cephalosporin 감수성인 29 균주에서도 감수성 저하 균주와 유사한 유전자 돌연변이가 관찰되었다(data not shown). 유전형을 검사한 모든 감수성 균주의 *mtrR* promoter 부위에서 하나의 염기쌍 소실을 보였으며, 5 균주에서는 *mtrR* ORF 내 아미노산 치환 (Ala39Thr)을 가지고 있었다. *PonA* 의 경우 1 균주를 제외하고 모든 균주에서 Leu421Pro 의 아미노산 치환을 보였으며. *PilQ* 의 경우 3 개 균주에서 아미노산 치환(Asn27Ser) 을 보였다.

표 6. Characteristics of cephalosporin decreased susceptibility for 48 *N. gonorrhoeae* isolates

<i>PenA</i> type	NG-MAST			Region	MIC (μg/mL)			Mutations		
	ST	<i>ibpB</i>	<i>porB</i>		CRO	CFX	CPD	<i>mtrR</i> *	<i>ponA</i>	<i>pilQ</i>
V	5687	10	2481	GY	0.12	0.12	0.06	A40D	L421P	N648S
V	8164 [†]	33	4895	SE	0.03	0.25	0.12	Deletion A, Ins T	L421P	WT
X	2958	110	1785	IN	0.06	0.25	2	Deletion A	L421P	WT
XII	5061	1058	2978	SE	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	3968	21	2409	DJ	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	3968	21	2409	DJ	0.12	0.25	0.25	Deletion A	L421P	WT
XIII	3968	21	2409	DJ	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	3968	21	2409	JB	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	4677 [†]	1613	206	IN	0.06	0.12	0.25	Deletion A	L421P	N648S E666K
XIII	4764	21	2874	IN	0.06	0.12	0.25	Deletion A	L421P	WT
XIII	4764	21	2874	SE	0.06	0.12	0.25	Deletion A	L421P	WT
XIII	7069 [†]	21	3989	IN	0.12	0.12	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	7069 [†]	21	3989	JB	0.12	0.06	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7069 [†]	21	3989	JB	0.25	0.25	2	Deletion A	L421P	WT
XIII	7069 [†]	21	3989	JB	0.25	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	7305 [†]	21	1017	DJ	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7548 [†]	21	4530	SE	0.12	0.06	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7548 [†]	21	4530	IN	0.25	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7548 [†]	21	4530	SE	0.25	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	7548 [†]	21	4530	SE	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7684 [†]	21	4618	IN	0.12	0.12	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	7684 [†]	21	4618	SE	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7684 [†]	21	4618	JB	0.12	0.25	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	7686 [†]	21	4620	IN	0.12	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	7688	21	23	JB	0.12	0.25	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8041	21	2125	IN	0.12	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	8044	21	3	SE	0.12	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	8044	21	3	IN	0.12	0.25	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8046 [†]	21	4797	SE	0.12	0.25	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8047 [†]	1484	4798	JB	0.015	0.12	0.25	Deletion A	L421P	N648S
XIII	8052	21	4801	SE	0.12	0.25	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8159 [†]	21	4891	SE	0.06	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8193	21	4917	IN	0.06	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8193	21	4917	DJ	0.06	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	8193	21	4917	IN	0.12	0.25	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	8867 [†]	21	5219	SE	0.12	0.5	4	NA	NA	NA
XIII	8869 [†]	1611	4620	SE	0.12	0.12	1	Deletion A	L421P	WT
XIII	8878 [†]	330	2409	IN	0.12	0.12	0.5	Deletion A	L421P	WT
XIII	9687 [†]	330	5712	WJ	0.03	0.12	0.25	Deletion A	WT	WT
XIII	NA	21	NA	IN	0.06	0.25	0.25	Deletion A	L421P	WT
XVIII	2066	328	1042	SE	0.12	0.06	0.25	Deletion A, A39T	L421P	WT
XVIII	2066	328	1042	GY	0.12	0.06	0.5	Deletion A, A39T	L421P	WT
XVIII	7548	21	4530	IN	0.12	0.06	0.25	Deletion A	L421P	WT
XVIII	8161 [†]	328	4893	SE	0.12	0.06	0.25	Deletion A, A39T	L421P	WT
XVIII	8162 [†]	328	4894	IN	0.12	0.12	0.25	Deletion A, A39T	L421P	WT
NEW1	7687	620	90	IN	0.12	0.25	1	Deletion A	L421P	N648S
NEW2	8165 [†]	862	4896	GY	0.12	0.06	0.5	Deletion A	L421P	WT
NA	7301	4	23	IN	0.03	0.25	0.25	NA	NA	NA

Abbreviation: NA, not applicable; SE, Seoul; IN, Incheon; GY, Gyeonggi; WJ, Wonju; DJ, Daejeon; JB, Junbuk

*Nucleotide (A) deletion within the 13bp inverted repeat located between the -10 and -35 sequences of the *mtrR* promoter.

†New sequence types found in this study.

3. NG-MAST

151 주의 *N. gonorrhoeae*에서 96개의 다양한 sequence type (ST)이 나왔으며, 그 중 56개 ST은 본 연구에서 새롭게 발견되어 NG-MAST 데이터베이스에 등록하였다. ST6734가 11개 군주에서 발견되어 가장 흔한 ST이었고, 다음으로 ST7690 (10 군주)와 ST7548 (7 군주)로 흔하였다. *porB* 유전자는 매우 다양한 유형을 보였지만 *tbpB* 유전자는 *tbpB21*와 *tbpB33*이 각각 32%와 26%로 대부분을 차지했다.

ㄷ 7. NG-MAST summary of *N. gonorrhoeae* isolated from 2011-2012

NG-MAST			No. Isolates	Range of MIC (μg/mL)			
<i>thpB</i>	ST	<i>porB</i>		Penicillin G	Ceftriaxone	Cefixime	Cefpodoxime
4	7301	23	3	0.25-1	≤0.008-0.03	≤0.008-0.25	0.03-0.25
	etc [†]		4	0.25-64	≤0.008-0.06	≤0.008-0.06	0.06-0.25
10	5687	2481	1	0.5	0.12	0.12	0.06
21	3435	1053	3	0.5-≥ 128	≤0.008-0.015	≤0.008-0.015	0.03
	3968	2409	4	2	0.12	0.12-0.25	0.25-0.5
	4764	2874	4	0.25-2	0.03-0.06	0.015-0.12	0.12-0.5
	7069	3989	4	2-4	0.12-0.25	0.06-0.25	0.5-2
	7548	4530	7	2	0.06-0.25	0.06-0.25	0.25-1
	7684	4618	3	1-2	0.12	0.12	0.5-1
	7686	4620	2	1	0.06-0.12	0.06, 0.25	0.5-1
	7688	23	2	1	0.06-0.12	0.06, 0.25	0.25-0.5
	8044	3	2	1	0.12	0.25	0.5-1
	8052	4801	2	1	0.06-0.12	0.06, 0.25	0.25-0.5
	8193	4917	3	1-2	0.06-0.12	0.12-0.25	0.5-1
	8867	5219	1	4	0.12	0.5	4
	etc [†]		13	0.12-4	≤0.008-0.12	≤0.008-0.25	0.015-1
27	228	23	2	0.12	≤0.008	≤0.008	≤0.008-0.06
	etc [†]		3	0.25-4	0.015-0.06	0.015-0.03	0.03-0.25
29		1808	1	0.12	≤0.008	≤0.008	≤0.008
32	8872	206	1	2	0.03	0.015	0.12
33	6734	4016	11	0.25-2	≤0.008-0.03	≤0.008-0.015	≤0.008-0.12
	7658	4619	2	0.5-1	≤0.008-0.015	≤0.008-0.015	0.06
	7690	4383	10	0.25-1	≤0.008-0.03	≤0.008-0.06	0.015-0.06
	8164	4895	1	0.5	0.03	0.25	0.12
	etc [†]		13	0.25-32	≤0.008-0.06	≤0.008-0.06	≤0.008-0.25
60	8166	4897	1	2	0.03	0.015	0.5
98	8174	3989	1	1	0.03	0.015	0.06
107	1493	952	1	0.25	≤0.008	0.015	0.03
110	2958	1785	1	2	0.06	0.25	2
129	7132	4270	1	≥ 128	0.015	0.015	0.06
156	3538	1053	1	1	0.06	0.03	0.25
186	3099	997	1	1	0.03	0.015	0.12
241	6771	4028	1	≤0.06	≤0.008	≤0.008	0.03
294	7691	4621	1	≥ 128	0.06	0.015	0.06
328	2066	1042	5	1-2	0.03-0.12	0.03-0.06	0.12-0.5
	etc [†]		2	2-4	0.12	0.06-0.12	0.25
330	etc [†]		3	0.25, 2	0.03, 0.12	0.06-0.12	0.25-0.5
455	etc [†]		10	≤0.06-2	≤0.008-0.06	≤0.008-0.03	≤0.008-0.25
470	9688	5713	1	1	0.03	0.03	0.12
512	8051	543	1	≥ 128	0.03	0.03	0.12
563	8160	4892	1	0.5	0.03	0.015	0.06
566	8743	2894	1	≥ 128	0.03	0.03	0.06
620	7687	90	1	1	0.12	0.25	1
738	3284	1445	1	≥ 128	0.03	0.015	0.25
862	etc [†]		3	1-2	0.03-0.12	0.03-0.06	0.06-0.5
1058	5061	2978	1	2	0.12	0.12	0.5
Other [*]			11	0.12-≥ 128	≤0.008-0.12	≤0.008-0.12	0.015-1

Abbreviation: NA, not applicable

*New *tbpB* type identified in this study: *tbpB*1398, *tbpB*1399, *tbpB*1484 (N = 2),
*tbpB*1485, *tbpB*1611, *tbpB*1612, *tbpB*1613, *tbpB*1614, *tbpB*1315, *tbpB*1616

†sequence types belong to one isolate

IV. 고찰

국내의 임균감염은 아직도 흔하며 대부분 다제내성 임균이므로 국민건강에 큰 위협이 되고 있다. 임균은 과거 대부분의 항균제에 감수성이었으나 penicillin G 내성을 시작으로 tetracycline 및 quinolone에 내성을 보이는 균주가 출현하고 확산됨에 따라 지금은 cephalosporin 과 spectinomycin만이 효과적인 치료제로 남아있다. 본 연구에서도 대부분의 균주가 penicillin G, tetracycline 및 ciprofloxacin에 내성이었으며, 감수성인 균주의 비율은 0-5%로 매우 낮았다. Penicillin G 고도 내성의 원인인 PPNG의 비율은 2011년에 6%, 2012년에는 8%로 2000년의 64%에 비해 크게 감소하였다². PPNG가 감소한 명확한 이유는 불분명하나 비슷한 현상이 홍콩 등에서도 보고된 바 있다²⁰. 국내에서는 PPNG의 비율이 많이 감소하였으나 동남아 등지에서는 아직 흔하며, 특히 태국에서 TEM-135형을 생성하는 임균이 최근 보고되었다²¹. 대부분의 임균은 제한된 범위의 β -lactam 항균제를 분해하는 TEM-1형 β -lactamase를 생성하지만, TEM 유전자는 변이를 통해 광범위한 β -lactam 항균제를 분해하는 extended spectrum β -lactamase로 진화할 수 있어 이에 대한 주의가 필요하다. 반대로 TRNG는 2004년까지 국내에서 0-4%의 낮은 분리율을 보였으나, 2011-2012년에는 23%로 증가하였다. 증가의 원인은 확실하지 않지만 한국과 일본을 제외한 동남아 국가에서는 TRNG가 흔하므로 근접 국가로부터 유입 가능성이 있으며 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

2011-2012년 수집 균주 중 1주 (cefixime MIC = 0.5 μ g/mL)를 제외하고 모든 균주가 cefixime과 ceftriaxone에 감수성이었다. Cefixime 또는 ceftriaxone에 감수성이 저하된 (MIC $\geq$ 0.12 μ g/mL) 균주는 48주로 32%

의 비율을 보였다. Ceftriaxone에 대한 감수성 판독 기준은 CLSI $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$, EUCAST $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ 및 CDS $\leq 0.015 \mu\text{g/mL}$ 으로 모두 다르며, 이에 따라 디스크 확산법 결과와 CLSI 기준에 따라 해석한 한천 희석법 결과에 차이가 발생한 것으로 생각된다. Ceftriaxone 최소 억제농도 $0.03 \mu\text{g/mL}$ 및 $0.016 \mu\text{g/mL}$ 인 임균에 의한 인두 감염증 치료에 있어서 ceftriaxone 치료 실패가 보고된 적이 있다²². 그러므로 국내에서는 대부분 CLSI 기준을 적용하고 있으나, 감염 부위에 따라 감수성 판독 기준을 적용하는 데 주의가 필요하겠다. 또한 캐나다에서는 cefixime 최소억제농도가 기존의 감수성 범위인 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 이상인 균주들의 치료 실패율이 25%로 매우 높아 CLSI 기준으로 감수성인 균주 중에서도 치료 실패가 혼함을 보고하였다²³.

임균의 cephalosporin 감수성 저하 또는 내성에 관여하는 유전자는 *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porb1B* 및 *pilQ* 등이 알려져 있다¹²⁻¹³. PBP2를 생성하는 *penA* 유전자가 다른 *Neisseria* 균종으로부터 유전자의 일부를 받아 모자이크 형 구조를 생성하거나 Ala501, Gly542, Pro551 부위의 아미노산에 변이를 획득하면 cephalosporin 항균제에 대한 감수성이 저하될 수 있다. 2004년에 국내에서 분리된 cefixime 비감수성 균주는 전형적인 X형 모자이크 형을 보였으나, 2011년에 분리된 비감수성 균주는 비모자이크 형인 XIII 형이었다. XIII 형은 국내에서 가장 흔하게 관찰되며, 본 연구에서도 cephalosporin 감수성 저하 임균($\text{MIC} \geq 0.12 \mu\text{g/mL}$) 중 XIII 형을 가지고 있는 임균의 비율은 75% 이었다. 따라서 다른 내성기전이 cefixime 내성에 관여하고 있을 것으로 생각되었다. 본 연구에서 XIII 형 외에도 VI, V, X, XII, XVI, XVII 및 XVIII형이 관찰되었고, 그 중 VI형과 XVI형은 감수성 균주에서만 나타났다. X형은 모자이크 형으로 cefpodoxime 비감수성인 1균주 ($\text{MIC } 1\mu\text{g/mL}$)에서 관찰되었으며, ceftriaxone MIC $0.06 \mu\text{g/mL}$ 및 cefixime MIC $0.25 \mu\text{g/mL}$ 로 CLSI

기준으로는 모두 감수성이었으나, EUCAST 기준으로는 cefixime 비감수성이었고, CDS 기준으로는 ceftriaxone과 cefixime에 모두 비감수성이었다. X 형은 NG-MAST 분석에서 ST1407, MLST 분석에서 ST1901로 전세계적인 cefixime 치료 실패와 관련있는 clone에 속하는 것으로 분석되었다^{10-11,23}. 또한 모자이크 X형은 일본에서 처음 분리된 ceftriaxone 고도 내성 균주⁹와 유사한 모자이크 형으로 일본은 한국과 지리학적으로 매우 가까울 뿐만 아니라 인적 교류가 매우 활발하다는 점에서 일본에 발생한 ceftriaxone 내성 임균이 국내에 유입되었을 가능성이 있다고 보여진다. 나머지 12주의 cefpodoxime 비감수성 균주는 모두 비모자이크 형인 XIII형 이었다. Cephalosporin 감수성은 *penA* 유전자의 변이 외에도 여러 유전자에 의해 영향을 받을 수 있다. 특히, 능동적 유출 (active efflux)와 관련이 있는 *mtrR* 유전자는 promoter 또는 ORF 내 변이나 결손에 의해 항균제에 대한 내성을 증가시킬 수 있다. 본 연구의 cephalosporin 감수성 저하 균주에서 *mtrR* promoter 위치의 A-deletion과 T-insertion 그리고 ORF 내 39번 아미노산 돌연변이가 보였다. A-deletion의 경우 cephalosporin 감수성 균주에서도 흔하게 나타났으며, 39번 아미노산 돌연변이 또한 관찰되었다. PBP1을 생성하는 *ponA* 유전자의 421번 아미노산 변이도 cephalosporin 감수성 저하 균주에서 한 주를 제외하고 모두 관찰 되었다. *ponA* 유전자도 *mtrR*과 마찬가지로 cephalosporin 감수성 균주에서 동일한 변이가 나타났다. PilQ는 세포막에 구멍을 형성하는 역할을 하며, 이를 통해 항균제가 세포질 내로 들어오게 된다. 돌연변이로 인하여 PilQ를 통한 항균제의 투과가 저하될 경우, 내성이 증가할 수 있다. *pilQ*는 *mtrR*, *ponA*와 다르게 cephalosporin 감수성 저하 균주에서 변이가 드물게 관찰되나, 감수성 균주에서도 감수성 저하 균주와 같은 변이가 관찰되었다. Cephalosporin 감수성 균주와 감수성 저하 균주에서 *mtrR*, *ponA*, *pilQ*

돌연변이가 유사하게 관찰되므로 cephalosporin 내성의 관계를 설명하기 어려웠다. *pilQ*는 한 주에서 이전에 보고된 *pilQ* gene Glu666Lys (*pilQ2*) 변이²⁴가 발견되었으며 *ponA*, *mtrR* 돌연변이 또한 가진다. *PilQ2* 균주의 경우 모자이크 형 *penA* 돌연변이를 가지기 때문에 cefixime 감수성 저하를 보이는 것으로 생각된다.

최근 들어 미국에서는 cephalosporin 내성 임균이 출현되고 확산됨에 따라 cephalosporin 과 azithromycin 병합요법을 사용하도록 권장하고 있다. 2011-2012년에 국내에서 분리된 임균의 47%가 azithromycin 에 내성이었다. Azithromycin의 내성기전은 ribosomal RNA 의 돌연변이 또는 methylation 과 ribosomal 단백질의 돌연변이가 혼한 것으로 알려져 있으며, 외국에서도 아직 azithromycin 내성은 흔하지 않다²⁵⁻²⁷. Azithromycin 내성 균주의 경우는 cephalosporin 항균제와의 병합요법에 의한 상승 효과가 불분명하여 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

국내에서 분리된 임균의 NG-MAST ST은 96개로 매우 다양하였다. NG-MAST의 ST은 *porB* 유전자와 *tbpB* 유전자의 대립유전자 번호에 의해 결정된다. 국내에서 분리된 임균의 ST은 *porB* 의 차이에 의해 다양한 ST을 보이나, *tbpB*는 *tbpB21* *tbpB33*이 각각 49주와 39주로 유전적 연관성이 있을 것으로 생각되었다. Cefixime과 ceftriaxone에 감수성이 저하된 48주 또한 NG-MAST ST형이 다양하여, NG-MAST ST와 cephalosporin제 감수성간의 직접적인 상관관계는 보이지 않았다. 그러나, 2011-2012년에 분리된 균주 중, *tbpB21*을 가진 균주의 대부분이 cephalosporin에 감수성이 저하되었으며, *tbpB33*을 가진 균주는 감수성이 높아, *tbpB21*과 국내에서 분리된 임균의 항균제 내성 간에 연관성이 있을 것으로 생각되었다.

V. 결론

2011-2012년에 국내에서 분리된 임균은 penicillin G, tetracycline 및 quinolone에는 대부분 내성을 보였지만, spectinomycin과 cephalosporin에는 감수성이었다. Cephalosporin 항균제에 감수성이 저하되었거나 비감수성인 균주는 48주로 32%이었다. *penA* 유전형 분석에서 cefixime 비감수성 균주는 XIII 형이었으며, 이는 국내에서 가장 흔한 유전형으로 감수성 균주와 비감수성 균주를 결정하는 다른 내성 기전이 관여하고 있을 것으로 생각되었다. 모자이크 형은 1 균주에서 관찰되었으며, X형이었다. Cephalosporin 내성에 관여하는 것으로 알려진 기타 유전자 변이 중에서, *porB1b*는 cephalosporin 감수성 균주에서 오히려 흔하였으며, *mtrR* A-deletion과 *ponA* 돌연변이는 cephalosporin 감수성 여부에 관계 없이 모든 균주에서 관찰되어 감수성 저하와의 관계를 설명하기 어려웠다. 각각의 유전자 변이와 cephalosporin 내성간의 관계에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 분자역학적인 분석에서는 NG-MAST *tpb21*과 cephalosporin 내성 간에 상관성을 보였으며, 모자이크 형을 가진 국내 분리 한 주가 전세계적으로 cephalosporin 치료 실패와 관련 있는 MLST ST1901을 가지며, 일본에서 발생한 ceftriaxone 고도 내성 임균과 유사한 *penA* 모자이크 형을 가지므로, *N. gonorrhoeae*의 cephalosporin 내성 출현을 모니터링 하기 위한 지속적인 감시 시스템이 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases surveillance 2011. <http://www.cdc.gov/std/stats11/Surv2011.pdf>[Online]
2. Lee H, Hong SG, Soe Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from Korean patients from 2000 to 2006. Sex Trans Dis. 2011;38:1082-6.
3. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Korea in 2008. Korean J Clin Microbiol. 2009;12:S115.
4. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Korea in 2009. Korean J Clin Microbiol. 2010;13:S88.
5. Korea Center for Disease Control and Prevention. Management guidelines for sexually transmitted disease. December 2007.
6. Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation. Korean guideline for sexually transmitted infections. October 2011.
7. Yong D, Kim TS, Choi JR, Yum JH, Lee K, Chong Y et al. Epidemiological characteristics and molecular basis of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Korea and nearby countries. J Antimicrob Chemother. 2004;54:451-5.
8. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. Emerg Infect Dis. 2011;17:148-9.

9. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:3538-45.
10. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1273–80.
11. Cámara, J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1858-60.
12. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3744-9.
13. Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R, Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2117-22.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement;

Approved Guideline. Document M100-S23. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013:100-2.

15. S. M. Bell, J. N. Pham, I. W. Carter, J. K. Hanrahan. Antibiotic susceptibility testing by the CDS method. A manual for medical and veterinary laboratories 2011. Sixth Edition. The antibiotic reference laboratory;2011:62.

16. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST 2013. <http://www.eucast.org/>[Online]

17. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito S et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:137-43.

18. Whiley DM, Limnios EA, Ray S, Sloots TP, Tapsall JW. Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3111-6.

19. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3744-9.

20. Kam KM, Lo KK, Ho NK, Cheung MM. Rapid decline in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Hong Kong associated with emerging 4-fluoroquinolone resistance. Genitourin Med. 1995;71:141-4.

21. Shu-ichi N, Chanwit T, Sasiprapa P, Ken S, Somporn S, Magnus U et al. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:916-20.
22. Tapsall J, Read P, Carmody C, Bourne C, Ray S, Limnios A, et al. Two cases of failed ceftriaxone treatment in pharyngeal gonorrhoea verified by molecular microbiological methods. J Med Microbiol. 2009;58:683-7.
23. Allen VG, Mitterni L, Seah C, Rebbapragada A, Martin IE, Lee C, et al. *Neisseria gonorrhoeae* treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. JAMA. 2013;309:163-70.
24. Zhao S, Tobiason DM, Hu M, Seifert HS, Nicholas RA. The penC mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. Mol Microbiol. 2005;57:1238-51.
25. Singh AE, Gratrix J, Read R, Lovgren M, Drews SJ, Romanowski B et al. *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing is beneficial in further characterizing gonococcal populations in Alberta, Canada. Sex Transm Dis. 2013;40:744-50.
26. Shimuta K, Unemo M, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Dorin M, Kawahata T et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level

ceftriaxone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:5225-32.

27. Kirkcaldy RD, Zaidi A, Hook EW. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance among men who have sex with men and men who have sex exclusively with women: the Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2005-2010. Ann Intern Med. 2013;158:321-8.

Abstract

Antimicrobial resistance and molecular epidemiologic characteristics of

Neisseria gonorrhoeae isolated from Korea

Hyo-Jin Kim

Department of Medical science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyungwon Lee)

The recent emergence and spread of multi-drug resistant *N. gonorrhoeae* make the use of cephalosporins more popular, and increased selective pressure may be a cause of decreased susceptibility to cephalosporins in *N. gonorrhoeae*. In Korea, the rate of patients who were treated with cephalosporins in gonococcal infections also increased from 10% in 2002 to 30% in 2010, and monitoring for cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae* may be needed. In this study, we evaluated the antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *N. gonorrhoeae* recently isolated from Korea.

A total of 151 *N. gonorrhoeae* were collected from clinical samples from sexually transmitted disease clinics and public health centers during 2011-2012. Antimicrobial susceptibility was determined by CLSI agar dilution method. The rates of resistance to penicillin G, tetracycline and ciprofloxacin were 34%, 51% and 93%, respectively. However, resistance rate to azithromycin was as low as 5% and all 151 isolates were susceptible to spectinomycin. All isolates were susceptible to cefixime and ceftriaxone, except one of cefixime non-susceptible isolate.

PenA, *mtrR*, *ponA* and *pilQ* genes were sequenced to determine the resistant mechanism of cephalosporin in 29 cephalosporin-susceptible *N. gonorrhoeae* isolates and 44 isolates of with decreased susceptibility to cephalosporin. A total

of eight *penA* genotypes were found, and most common genotype was type XIII, and one cefixime non-susceptible isolate also had it. Types IV and XVI were only noted in cefixime-susceptible isolates. Mutations of *mtrR*, *ponA*, and *pilQ* genes were found in both cephalosporin-susceptible and less-susceptible isolates, suggesting that mutations in these genes were not associated with cephalosporin resistance.

N. gonorrhoeae multi-antigen sequence typing (NG-MAST) was performed to determine genetic relatedness. Although *N. gonorrhoeae* isolated from Korea had various sequence type (ST) due to difference in *porB* allele, *tbpB* showed genetic relatedness because of 49 and 39 isolates belonged to *tbpB21* and *tbpB33*, respectively. Most isolates belonged to *tbpB21*, *tbpB110* and *tbpB620* showed decreased susceptibility to cephalosporins, but *tbp33* showed cephalosporin susceptibility.

In conclusion, most of isolates are susceptible to cephalosporins in Korea. However, the emergence of cefixime non-susceptible isolate with *penA* X mosaicism and the prevalence of isolates with the *tbpB110* allele belonging to ST1407, which cause cefixime and ceftriaxone treatment failure in successful global clones of *N. gonorrhoeae*, call for a continuous nationwide antimicrobial surveillance program in order to monitor the emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, *penA*, *mtrR*, *ponA*, *pilQ*, mosaic, *tbpB*, cephalosporin, reduced susceptibility