

T Types, *emm* Genotypes and Antibiotic Resistance of *Streptococcus pyogenes* Isolated from School Children in Jinju, 2006

Eun-Ha Koh, In-Suk Kim, Sunjoo Kim

Department of Laboratory Medicine, Institute of Health Sciences,
Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju, Korea

Background: *Streptococcus pyogenes* is the most common cause of bacterial pharyngitis. T antigens and *emm* genotypes are essential markers for an epidemiological study of *S. pyogenes*. Macrolide resistance of *S. pyogenes* is a serious obstacle to successfully treating a sore throat.

Methods: One-hundred forty-seven strains of *S. pyogenes* isolated from healthy school children in 2006 were subjected to T typing and *emm* genotyping. A disk diffusion method was applied for several antibiotics. A double disk diffusion test was performed to evaluate the phenotype distribution of macrolide resistance.

Results: Among T antigens and *emm* genotypes, T11 (19.7%) and *emm*78 (16.7%), respectively, were the most common in 2006. Both T5/27/44 (2.3%) and *emm*44/61 (9.1%) declined to a great extent from

about 29% in 2004. The rate of resistance to antibiotics were 11.6% to erythromycin, 4.8% to clindamycin, 21.8% to tetracycline, and 7.5% to ofloxacin. M and cMLS_B phenotypes were 52.9% and 41.2% respectively.

Conclusion: T typing and *emm* genotyping proved a dynamic change in their distribution in 2006 compared to the results of 2004. Erythromycin and clindamycin resistance remained low as in 2004, whereas ofloxacin resistance increased slightly. M and cMLS_B phenotypes were equivalent in 2006, whereas cMLS_B was predominant in 2004. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:6-10)

Key Words: *Streptococcus pyogenes*, T type, Erythromycin resistance, *emm*, Sore throat, Pharyngitis

서 론

*Streptococcus pyogenes*는 소아의 세균성 인두염의 가장 흔한 원인균으로서, 제대로 치료하지 않는 경우 음식을 삼키기 힘들고 고열과 두통, 복통 등의 증상을 동반한다. 합병증 혹은 후유증으로는 편도 화농, 성홍열, 류마티스열, 급성사구체신염 등이 있으며, 최근에는 괴사성 근막염, 독성 쇼크 증후군 등 치명적인 감염의 보고가 있었다[1].

T 항원형 검사는 *S. pyogenes*의 세포벽에 있는 항원으로서, 항-T 혈청이 상품화되어 있고, 세균을 trypsin으로 처리한 후 추출한 항원과 슬라이드법으로 동정한다. 검사는 비교적 간단하지만 교차반응이나 응집반응이 약한 경우 판정하기 어려운 단점이 있다. *emm* 유전자는 *S. pyogenes*의 가장 중요한 독성 인

자인 M 단백질의 아미노기 5'-말단부위를 코딩하는 유전자로서, M항원형에 따라서 다양한 염기서열을 보인다[2]. 항-M 항체가 80여 가지나 되고 상품화가 되어 있지 않으며, 단백질을 보관하고 유지하는 것이 어려우므로 최근에는 *S. pyogenes*의 역학조사로서 M 항원형 검사보다는 *emm* 유전자형 검사가 보편적으로 많이 사용된다[2,3].

*S. pyogenes*는 페니실린에 모두 감수성을 보인다. 세균성 인두염의 가장 효과적인 치료제로서 경구용 혹은 주사용 페니실린이 추천되고 있지만, 우리나라에서 페니실린은 세균성 인두염에 거의 이용되고 있지 않다. 그 대신 ampicillin, amoxicillin/sulbactam 등 페니실린계 항생제 혹은 erythromycin, azithromycin, clarithromycin 등 macrolide계 항생제가 많이 이용되고 있으며, 이들 약제에 효과가 없는 경우, 1세대 cephalosporin이나 clindamycin이 추천된다[1].

*S. pyogenes*는 세포 내에도 분포하는 것으로 알려졌는데, macrolide계 항생제는 세포 내로 침투하여 세균을 죽일 수 있는 효과가 뛰어나다. Clindamycin을 사용하기 위해서는 유도성 내성 여부를 확인하는 것이 중요한데, 액체배지 희석법에서는

Received 14 July, 2008, Revised 15 October, 2008

Accepted 20 December, 2008

Correspondence: Sunjoo Kim, Department of Laboratory Medicine, Gyeongsang National University School of Medicine, 90, Chilam-dong, Jinju 660-702, Korea. (Tel) 82-55-750-8239, (Fax) 82-55-762-2696, (E-mail) sjkim8239@hanmail.net

감수성을 보이더라도 이중디스크 확산법에서 erythromycin에 의해 유도내성을 보이는 경우 생체 내에서는 세균억제 효과가 없다. 또한 내성 표현형에 따라 항균제의 최소억제농도는 달라진다. 따라서 우리나라 혹은 특정 지역에서 분리된 *S. pyogenes*의 macrolide 내성 표현형 분포를 아는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 2006년 *S. pyogenes*의 역학조사를 위해서, 초등학생으로부터 분리한 세균을 대상으로 T 항원형과 *emm* 유전자형 검사를 시행하였고 그 결과를 1995년부터 2004년까지 시행했던 결과와 비교하였다. 또한 주요 항생제에 대한 내성률의 변화와 내성 기전에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세균 분리 및 동정

2006년 6월에서 10월까지 진주에 위치한 초등학교 3곳을 방문하여, 1,402명으로부터 인후배양을 시행하였다. 세균 분리 및 동정은 이미 보고한 방법에 의해 시행하였다[3].

2. T 항원형 검사

Sevac (Prague, Czech Republic) 회사로부터 구입한 항-T 혈

청(T 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 25, 27, 28, 44, B3264, Imp.19)을 이용하여 슬라이드 응집법으로 T 항원형을 동정하였다[4].

3. *emm* 유전자형 검사

AccuPower DNA extraction Kit (Bioneer, 청원)를 이용하여 DNA를 추출하였다. AccuPower PCR PreMix Kit (Bioneer)를 이용하여, *emm* 유전자를 증폭하였다. 유전자 증폭은 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 1.5분 과정을 35회 거쳤다. AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer)를 이용하여 증폭산물을 정제한 후 (주)마크로젠(서울)에 의뢰하여 염기서열 결과를 받았으며, NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 *emm* 유전자형을 결정하였다. 기존에 알려진 염기서열과 95% 이상 상동성이 있는 경우, 동일한 *emm* 유전자형으로 판단하였다[3].

4. 항생제 감수성 검사

Clinical and Laboratory Standards Institute에서 권장하는 대로, 먼양혈액이 포함된 Mueller-Hinton 한천배지에 균을 접종한 후, 페니실린, chloramphenicol, ofloxacin, erythromycin 및 clindamycin 5종에 대해서 디스크 확산법을 시행하였다[5]. 대조균으로는

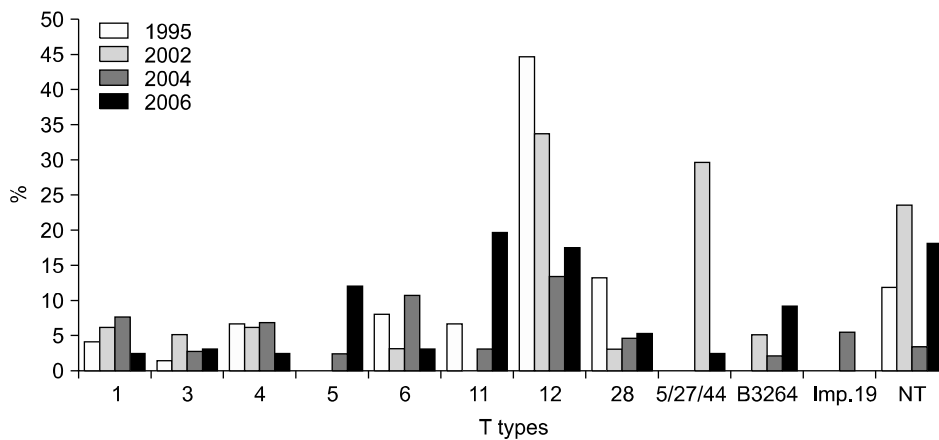


Fig. 1. Change in the distribution of T types of *Streptococcus pyogenes* between 1995~2006 in Jinju.

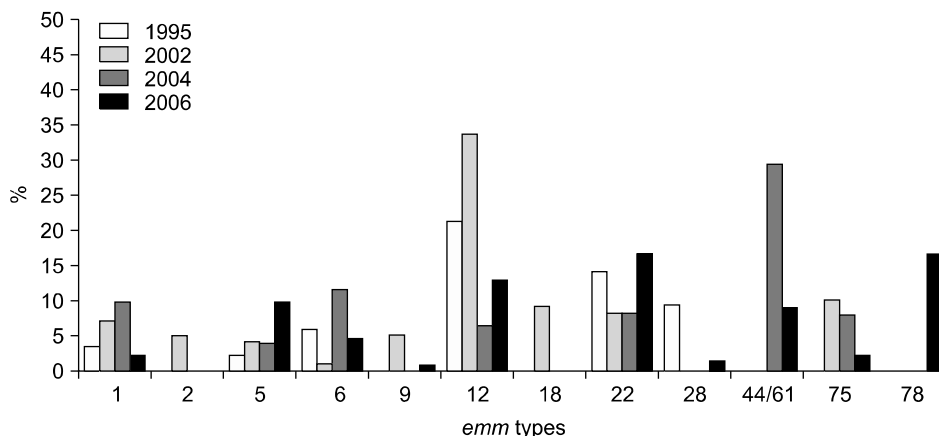


Fig. 2. Change in the distribution of *emm* types of *Streptococcus pyogenes* between 1995~2006 in Jinju.

Streptococcus pneumoniae ATCC 49169를 사용하였다.

5. Macrolide 내성 표현형

Erythromycin과 clindamycin 디스크 간격을 1.5 cm 떨어뜨려, clindamycin의 억제대 크기가 erythromycin에 의해 유도된 내성의 영향으로 좁아지는 현상이 생기는지 관찰하였다. 이 경우 영문자 'D' 형태를 나타내게 되는데, 이를 유도형으로 정의하였다. 만약 'D' 형태가 나타나지 않고, erythromycin 내성, clindamycin 감수성을 보이면 M형으로 정의하고, 두 가지 항생제에 모두 내성을 보이는 경우 구성형(cMLS_B)으로 정의하였다[3,6].

6. Macrolide 내성 유전자형 검사

Macrolide 내성 균주를 대상으로 내성 유전자를 검출하였다. AccuPower DNA extraction Kit (Bioneer)를 이용하여 염색체성 DNA를 추출한 후 AccuPower PCR PreMix Kit (Bioneer)를 이용하여, *erm*(B), *erm*(A) 및 *mef*(A) 유전자를 증폭하였다. 유전자 증폭은 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 30회 거쳤으며, 증폭산물은 1.5% 아가로스 겔에 전기영동하여 확인하였다[3].

결 과

1. *Streptococcus pyogenes* 분리

연구대상 1,402명 중 147명(10.5%)으로부터 *S. pyogenes*를 분리하였다.

2. T 항원형 분포

분리된 균주 중 132주에 대한 T 항원형 분석에서 T11이 19.7%로 가장 흔하였고, T12가 17.4%, T5가 12.1%, B3264가 9.1%를 차지하였다(Fig. 1). T항원이 동정되지 않은 것은 18.2%였다.

3. *emm* 유전자형 분포

*emm*22와 *emm*78이 각각 16.7%로 가장 흔하였고, *emm*12는

Table 1. Antibiotic resistance of *Streptococcus pyogenes* isolated from three elementary schools in Jinju, 2006

School	N	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Ofloxacin*
Munsan	63	5 (7.9)	3 (4.8)	9 (14.3)	4 (6.3)
Gumsan	11	0	0	3 (27.3)	0
Chunjun	73	12 (16.4)	4 (5.5)	20 (27.4)	7 (9.6)
Total	147	17 (11.6)	7 (4.8)	32 (21.8)	11 (7.5)

No isolates were resistant to chloramphenicol or penicillin.
N (%)

*Six of the 11 isolates were intermediate resistant to ofloxacin.

12.9%, *emm*5는 9.9%였다(Fig. 2). *emm* 유전자형이 동정되지 않은 것은 2주 있었다. T항원이 동정되지 않은 24균주는 대부분 *emm*22 10주로 동정되었고, 기타 *emm*3 2주, *emm*5 3주, *emm*6 2주, *emm*9 1주, *emm*12 2주, *emm*44/61 1주, *emm*77 1주, unknown 2주로 다양하였다.

4. 항생제 내성률

3개 초등학교의 항생제 내성률은 약간 차이가 있었지만 전체적으로 erythromycin 11.6%, clindamycin 4.8%, tetracycline 21.8%, ofloxacin 7.5%의 내성률을 보였다(Table 1). 페니실린과 chloramphenicol에 내성을 보이는 균주는 없었다.

5. Macrolide 내성 표현형 및 유전자형

Erythromycin에 내성을 보인 17균주를 대상으로 macrolide 내성 표현형을 조사한 결과 구성형 내성은 41.2%, M형은 52.9%, 유도형 내성은 5.9%였다(Table 2). 일부 균주는 냉동보관 후 계대배양에 실패하여 내성 유전자 검사를 시행할 수 없었지만, *erm*(B) 및 *mef*(A) 유전자가 각각 50%를 보였다. *erm*(A) 유전자는 관찰되지 않았고, 유도형 표현형을 보인 1균주는 *erm*(B) 유전자 양성이었다. 내성 균주는 모두 한 개의 내성 유전자만을 보유하고 있었다.

고 찰

경남 진주 지역에서 건강한 초등학생을 대상으로 시행한 *S. pyogenes*의 역학적 조사는 1995년, 2002년 및 2004년에 이루어진 바 있다. 2006년도에도 동일한 방법으로 조사를 시행하였으

Table 2. Comparison of antibiotic resistance rates, macrolide resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus pyogenes* between 1995-2006 in Jinju

	1995	2002	2004	2006*
N of GAS isolated	85	98	324	147
Resistance rates (%)				
Erythromycin	25.0	51.0	9.8	11.6
Clindamycin	10.1	33.7	8.8	4.8
Tetracycline	38.0	39.0	18.3	21.8
Ofloxacin	0	4.0	0.3	7.5
Resistance phenotypes (%)				
cMLS _B	34.0	64.0	87.5	41.2
M	66.0	34.0	9.4	52.9
iMLS _B	0	2.0	3.1	5.9
Resistance genotypes (%)				
<i>erm</i> (B)	ND	65.0	90.6	50
<i>mef</i> (A)	ND	33.0	9.4	50

Abbreviation: ND, not done; GAS, group A streptococci.

*Two isolates of cMLS and five isolates of M phenotypes were not tested for resistance genotypes.

며, 최근의 역학적 특성이나 항생제 내성의 변화를 살펴보고자 하였다.

T항원형과 *emm* 유전자형은 밀접한 연관이 있었는데, 예를 들면 T11은 대개 *emm*78로 동정되었고, T12는 *emm*12 혹은 *emm*22로 동정되었다. 2002년에 그 빈도가 29.6%로서 가장 흔하였던 T5/27/44는 불과 2년 후에 2.3%로 매우 드물어졌으며, 그동안 거의 관찰되지 않던 T11이 19.7%로서 가장 흔히 분리되었다. 2004년을 제외하고 그동안 진주 지역 혹은 다른 지역에서 가장 흔히 분리되는 T12형은 17.4%로 비교적 흔하였고, 그동안 드물었던 T5는 12.1%를 보였다. *emm* 유전자형 분포에서 그동안 전혀 관찰되지 않았던 *emm*78이 16.7%로 가장 흔하였고, *emm*12, 22도 비교적 자주 관찰되었다. 참고로 저자들은 국내의 여러 지역에서 *S. pyogenes*의 역학조사를 시행한 바 있는데, 1992년 강원도에서 T11, M78이 46.8%로 가장 흔한 항원형이었고, 그 후 다른 지역에서는 이 항원형은 거의 분리되지 않았다[4]. 다른 연구자의 연구에서 1998~2003년 사이 인두염 환자에서 분리한 615균주 중 *emm*78은 관찰되지 않았다[7]. 2004년에 그 빈도가 29.3%로 가장 흔히 동정되었던 *emm*44/61은 2006년에는 9.1%로 감소하였다. 2004년과 비교하여 T항원 및 *emm* 유전자형의 분포는 유의한 차이를 보였다(χ^2 test, $P < 0.05$).

인두배양검사나 항원추출검사에 의해 세균성 인두염이 진단되면 다른 사람에게 균의 전파를 예방하고, 증상의 완화를 위해서, 혹은 합병증을 예방하기 위해서는 항생제 투여가 필요하다[1]. 세균성 인두염의 올바른 진단은 병력 및 진찰 소견뿐만 아니라 인두배양을 통한 세균의 분리가 필요하며, 만약 세균 배양 시설이 없는 경우에는 외래에서 간단히 시행할 수 있는 *S. pyogenes* 항원 추출검사가 권장된다[1,8]. 아직까지 우리나라에서는 소아과 의원에서 이들 배양 검사 혹은 항원 추출검사가 일상적으로 시행되지는 않고 있으며, 상기도 감염 증상이 심한 경우 세균성 인두염이라고 판단하여 항생제가 자주 사용되고 있다. 그러나 가장 흔한 상기도 감염의 원인은 rhinovirus, adenovirus, coronavirus 등의 바이러스라고 알려져 있으며, *S. pyogenes*는 약 15~20%에서만 감염을 일으킨다[1]. 항생제 남용으로 인해 항생제 내성률이 증가한다는 보고가 있으며[6], 반대로 항생제 사용을 잘 관리하여 항생제 내성률이 감소하였다는 보고도 있었다[9].

서울과 마산에서 인두염 환자를 대상으로 시행한 연구에서, 1997~2003년에 분리된 *S. pyogenes*의 28.5% (94/330)가 erythromycin 내성이라고 보고된 바 있다[10]. 비슷한 시기에 지역의 보건소와 검사센터에서 수집된 균주에서는 20.5% (126/615)의 erythromycin 내성률을 보였다[7]. 두 연구 모두 T12 혹은 *emm*12의 빈도와 erythromycin 내성률의 연관성을 제시하였다[7,10]. 진주 지역에서는 erythromycin 내성률이 1995년 25%였고, 2002년에는 51%로 가장 높았다. 그 후 2년만에 내성률이

9.8%로 급격히 낮아졌다. 정확한 원인은 알 수 없지만, *emm*12 내성 균 수는 비슷하지만 감수성 균의 증가로 인해 상대적인 내성률이 감소한 것으로 추측하였다[11]. 물론 진주 지역에서 항생제 사용을 줄이거나, 다른 항생제로 전환해서 내성률이 감소했을 가능성도 있지만, 이에 대해서는 조사하지 못하였다. 본 연구에서는 2006년도에도 이러한 내성률이 계속 낮게 유지되는지, 아니면 다시 증가했는지 살펴보고자 하였는데 2004년과 비교하여 거의 비슷한 내성률을 보였다(χ^2 test, $P > 0.05$). 오히려 clindamycin은 8.8%에서 4.8%로 감소하여, 진주 지역에서 역학조사를 시행한 이후 가장 낮은 내성률을 보였다. Tetracycline 역시 21.8%의 낮은 내성률을 유지하였지만, ofloxacin은 조사 기간 중 가장 높은 7.5%를 보여 이에 대한 관심을 가질 필요가 있다고 생각한다.

Macrolide 내성 표현형은 큰 변화를 보였는데, 그동안 점차 증가하던 구성형 비율이 41.2%로 낮아지고 대신 최소억제농도가 낮은 M형이 52.9%를 보였다(Table 2). 유도형은 1균주에 불과해 진주 지역에서는 유도형이 매우 드문 것으로 판단하였다. 그러나 서울에서 보고된 다른 연구에서는 유도형 내성이 가장 흔하다고 하였다[12].

본 연구의 제한점으로는 모집단의 숫자가 크지 않고, 한 지역에서만 분리된 것으로서 우리나라의 전체적인 역학 조사 결과를 반영하지 못한 점이다. 하지만 동일한 지역에서 장기간에 걸친 역학 조사를 시행함으로써 균주의 변화와 항생제 내성률을 지속적으로 살펴볼 수 있는 장점이 있다.

결론적으로 2004년 이후 2년이 경과한 시점에서 *S. pyogenes*의 역학적 분포는 매우 큰 변화를 보였다. 하지만 항생제 내성률은 낮게 유지되었고, 표현형에서는 구성형 비율이 감소하였다.

참 고 문 헌

1. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2002;35:113-25.
2. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J Clin Microbiol 1996;34:953-8.
3. Kim SJ and Lee NY. Epidemiology and antibiotic resistance of group A streptococci isolated from healthy schoolchildren in Korea. J Antimicrob Chemother 2004;54:447-50.
4. Kim SJ, Cha SH, Kim EC, Kaplan EL. Serotypes of *Streptococcus pyogenes* isolated from healthy school children in Kangwon-do. J Korean Med Sci 1994;9:52-6.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2007.
6. Bassetti M, Manno G, Collida A, Ferrando A, Gatti G, Ugolotti E, et al. Erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Italy. Emerg Infect Dis 2000;6:180-3.

7. Yi YH, Choi JH, Lee HK, Lee KJ, Bae SM, Yu JY, et al. Characterization of erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Korea. Jpn J Infect Dis 2006;59:192-4.
8. Koh EH and Kim S. Evaluation of SD Bioline Strep A for rapid antigen testing in elementary schoolchildren. Korean J Clin Microbiol 2007;10:54-8.
9. Seppälä H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococcus in Finland. N Engl J Med 1997;337:441-6.
10. Koo H, Baek S, Ma S, Lee H, Cha S. Trends of incidence of erythromycin-resistant group A streptococci in Korea from 1998 through 2002. Infect Chemother 2004;36:75-82.
11. Koh EH, Kim S, Lee NY. Decrease of erythromycin resistance in group A streptococci by change of *emm* distribution. Jpn J Infect Dis 2008;61:261-3.
12. Bae SY, Kim JS, Kwon JA, Yoon SY, Lim CS, Lee KN, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated in Seoul, Korea. J Med Microbiol 2007;56: 229-35.

=국문초록=

2006년 진주지역 초등학생에서 분리된 *Streptococcus pyogenes*의 T 항원형과 *emm* 유전자형 및 항생제 내성

경상대학교 의과대학 진단검사의학교실, 건강과학원

고은하, 김인숙, 김선주

배경: *Streptococcus pyogenes*는 세균성 인두염의 가장 흔한 원인균이다. T항원과 *emm* 유전자형은 *S. pyogenes*의 역학조사에 필수적이다. Macrolide 항생제에 대한 내성은 인두염을 치료하는 데 큰 장애이다.

방법: 2006년 건강한 초등학생으로 분리된 147균주의 *S. pyogenes*를 대상으로 T항원형과 *emm* 유전자형 검사를 시행하였다. 디스크 확산법을 이용하여 항생제 감수성 검사를 시행하였고, 이중 디스크 확산법으로 macrolide 내성 표현형을 조사하였다.

결과: 2006년에는 T11 (19.7%), *emm*78 (16.7%)이 가장 흔한 형이었다. 2004년도 29%의 가장 높은 빈도를 보였던 T5/27/44은 2.3%, *emm*44/61은 9.1%로 감소하였다. 항생제 내성률은 erythromycin 11.6%, clindamycin 4.8%, tetracycline 21.8%, 및 ofloxacin 7.5%였다. 내성 표현형은 M형이 52.9%, cMLS_B형이 41.2%였다.

결론: T항원형과 *emm* 유전자형 검사를 통해 2004년에 비해 2006년에 균주 분포에 큰 변화가 있음을 알 수 있었다. 2004년 이후 erythromycin과 clindamycin 내성률은 낮게 유지되고 있었지만, ofloxacin 내성률은 약간 상승하였다. 2004년에는 cMLS_B형이 우월하였지만, 2006년에는 M 및 cMLS_B 표현형이 비슷한 분포를 보였다. [대한임상미생물학회지 2009; 12:6-10]

교신저자 : 김선주, 660-702, 경남 진주시 칠암동 90
경상대학교병원 진단검사의학과
Tel: 055-750-8239, Fax: 055-762-2696
E-mail: sjkim8239@hanmail.net