

Molecular and Phenotypic Characteristics of 16S rRNA Methylase-producing Gram-negative Bacilli

Hyukmin Lee¹, Eun-Mi Koh², Chang Ki Kim³, Jong Hwa Yum⁴, Kyungwon Lee⁵, Yunsop Chong⁵

¹Department of Laboratory Medicine, Kwandong University College of Medicine, Goyang,

²Incheon Blood Center, Korean Red Cross, Incheon, ³Korean Institute of Tuberculosis, Seoul,

⁴Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan,

⁵Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Recently a novel plasmid-mediated resistant mechanism that conferred high-level resistance to aminoglycoside via methylation of 16S rRNA was reported. The aims of this study were to determine the prevalence of the 16S rRNA methylase genes and to characterize the coreistance to other antibiotics in Gram-negative bacilli.

Methods: Consecutive non-duplicate Gram-negative bacilli were isolated from clinical specimens at a Korean secondary- and tertiary-care hospital from July 2006 to June 2007. The antimicrobial susceptibility was tested by the CLSI agar dilution method, and PCR was performed to detect the 16S rRNA methylase genes in the arbekacin-resistant isolates.

Results: In Gram-negative bacilli, the proportions of 16S rRNA methylase gene-positive isolates were 5% (75/1,471) in the secondary-care hospital and 4% (48/1,251) in the tertiary-care hospital, and the positive rates by species were 1% *Escherichia coli* 16% (10/1,062), *Klebsiella pneumoniae* 16% (75/460), *K. oxytoca* 2% (1/44), *Citrobacter* spp. 9% (7/82), *Enterobacter* spp. 2% (4/181), *Serratia marcescens* 6% (6/100), *Proteus mirabilis* 4% (2/57), *Achromobacter xylosoxidans* 20% (1/5), *Pseudomonas aer-*

uginosa <1% (1/505), *Acinetobacter* spp. 10% (11/112), and *Stenotrophomonas maltophilia* 2% (1/66), respectively. Among 16S rRNA methylase-positive isolates from secondary- and tertiary-care hospitals, 93% (70/75) and 90% (43/48), respectively, were *armA* positive, and others, except one *rmtA* positive isolate, were positive for the *rmtB* gene, according to PCR results. The rates of ESBL-positive and ceftazidime-resistant *K. pneumoniae* were 59% and 92%, respectively. In addition, 91% of 16S rRNA methylase-producing *K. pneumoniae* were positive for *qnrB*. There were no MBL producers among 16S rRNA methylase-producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species.

Conclusion: The novel aminoglycoside-resistant mechanisms involving 16S rRNA methylase were prevalent and widely distributed among Gram-negative bacilli in Korea, and other resistance mechanisms were commonly associated with 16S rRNA methylase-mediated resistance in Korea. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:19-26)

Key Words: 16S rRNA dimethylase, *armA*, *qnrB*, Aminoglycoside, Gram-negative bacilli

서론

Aminoglycoside 항균제는 세균 ribosome의 30S subunit에 불가역적으로 결합하여 살균 작용을 나타내며, 주로 그람 음성균의 감염에 단독 또는 병합 요법으로 주로 사용된다. Aminoglycoside 항균제 사용이 증가함에 따라 내성률도 증가

하였다. Amikacin의 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 내성률은 1997년 8%에서 2003년에는 13%로 증가하였으며, *Acinetobacter* 균종에 대한 내성률은 2003년도에 56%로 외국에 비하여 현저히 높았다[1]. 가장 흔한 aminoglycoside 내성 기전은 수식 효소(aminoglycoside-modifying enzyme)에 의한 것이며, 생성하는 수식 효소의 종류에 따라 내성을 보이는 aminoglycoside의 종류가 다르다[2]. 최근 들어 수식 효소에 안정한 arbekacin을 포함한 임상적으로 유용한 모든 aminoglycoside에 고도 내성을 일으키는 내성 기전이 보고되었다[3,4]. 새로운 내성 기전은 aminoglycoside 항균제의 작용 표적인 30S ribosome을 구성하는 16S rRNA를 methylation하여 amikacin 및 gentamicin을 포함한 모든 4,6-disubstituted deoxystreptamine 항균제에 고도 내

Received 6 April, 2009, Revised 25 November, 2009

Accepted 20 December, 2009

Correspondence: Kyungwon Lee, Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, 134, Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 82-2-2228-2446, (Fax) 82-2-313-0908, (E-mail) leekcp@yuhs.ac

성을 보이게 하는 것으로, 플라스미드를 통해 다른 균주로 쉽게 전달된다. 최근까지 그람 음성 간균에서 보고된 16S rRNA methylase에는 *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* 및 *npmA*가 있다 [3-7]. Yan 등은 2004년에 대만에서 분리된 16S rRNA methylase를 생성하는 균주 중, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)이나 plasmid-mediated AmpC β -lactamase (PABL)을 동시에 생성하는 다제 내성 균주가 혼함을 보고하였다[8]. 국내에서는 일부 제한된 균종에서 16S rRNA methylase에 대한 보고가 있었다. 이 등은 2003년과 2005년에 국내의 일개 대학 병원에서 수집한 일부 균주를 대상으로 시행한 연구에서, *armA* 유전자에 의한 aminoglycoside 고도 내성이 국내에 드물지 않고, 대부분이 ESBL과 PABL 양성인 반면 levofloxacin에 내성인 것을 보고하였다[9].

이와 같이 16S rRNA methylase 생성 균주는 세균 감염증 환자 치료에 유용한 aminoglycoside와 다른 중요 항균제에 다제 내성을 보여 임상적으로 매우 중요하나 국내에서는 이에 대한 연구가 드문 실정이다. 본 연구에서는 서울과 경기도에 소재하는 2차와 3차 병원의 환자에서 분리되는 그람 음성 간균 중에서 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 빈도와 그 내성 유형, 또한 이들 세균 중에 β -lactam 및 fluoroquinolone 항균제에 대한 다제 내성 양상을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험 균주의 수집 및 균종 동정

2006년 7월부터 2007년 6월까지 경기도의 2차 병원(명지병원)과 2007년 4월부터 6월까지 서울의 3차 병원(세브란스병원)에 입원한 환자에서 분리되는 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* 균종 및 *Stenotrophomonas maltophilia* 일련 균주를 수집하였으며, 중복 분리된 균주는 제외하였다. 균종 동정은 전통적인 생화학적 방법과 상품화된 kit를 이용하였다.

2. 항균제 감수성 시험

항균제 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 한천 희석법으로 시험하였다. 시험 항균제는 ceftazidime (GlaxoSmithKline, Greenford, United Kingdom), cefoxitin 및 imipenem (Merck/Sharp & Dohme, Rahway, NJ, USA), levofloxacin (Daiichi pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan), arbekacin (Meiji Seika, Tokyo, Japan), amikacin (Dong-A Pharmaceutical, Seoul, Korea), gentamicin 및 tobramycin (Dong Wha Pharmaceutical, Seoul, Korea)이었다. Arbekacin의 breakpoint는 *Staphylococcus aureus*와 같이 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ 를 감수성, $8 \mu\text{g/mL}$ 를 중간, $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 를 내성으로 정하였고[10], 정도관리를 위해서 *E. coli* ATCC 25922 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853 균주를 동시에 시험하였다.

3. β -lactam 항균제 내성

1) Extended-spectrum β -lactamase 생성 시험: Cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 항균제의 억제대 지름이 각각 $\leq 27 \text{ mm}$, $\leq 22 \text{ mm}$ 및 $\leq 27 \text{ mm}$ 이면 ESBL 생성 균주를 의심하였다. ESBL 생성 균주가 의심되면 double disk synergy (DDS) 시험으로 ESBL 생성을 확인하였다.

2) Plasmid-mediated AmpC β -lactamase 생성 시험: *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 PABL 생성 여부를 선별하기 위하여 cefoxitin 항균제의 MIC를 시험하였다. *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 AmpC β -lactamase를 발현하지 않거나 없으므로, cefoxitin에 대해서 내성인 균주는 PABL을 생성하는 것으로 판정하였다.

3) Carbapenemase 생성 시험: *E. coli* ATCC 25922를 지시 세균으로 사용하여, imipenem-Hodge 변법으로 carbapenemase를 선별하였고, 양성인 균주는 Imipenem-EDTA double disk synergy 법으로 metallo- β -lactamase (MBL) 생성을 확인하였다.

4. 16S rRNA methylase 생성 시험

1) 16S rRNA methylase 선별: Arbekacin은 수식 효소에는 영향을 받지 않고, 16S rRNA methylase 양성 균주만 고도내성을 보이므로 Arbekacin 디스크($30 \mu\text{g}$, Eiken Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 CLSI 디스크 확산법으로 선별하였다[11]. Arbekacin 디스크 억제대가 $\leq 13 \text{ mm}$ 이면 선별 양성으로, 억제대가 없으면 고도 내성으로 간주하였다[9].

2) 16S rRNA methylase 유전자 검출: Arbekacin 디스크 선별에서 양성인 균주를 대상으로, 16S rRNA methylase 유전자(*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD*)에 대한 PCR을 시행하였다 (Table 1). Taq DNA polymerase 1 U이 들어있는 PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 DNA 추출액 $1 \mu\text{L}$ 와 20 pmol의 primer 각각 $1 \mu\text{L}$, 증류수를 첨가하여 PCR을 시행하였다. 증폭은 Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하였고, *armA*, *rmtA* 및 *rmtB* multiplex PCR은 94°C 5분의 pre denaturation 후, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초 및 extension 72°C 1분을 35회 반복하였고, 마지막으로 5분간 extension을 시행하였다. *rmtC* 및 *rmtD* PCR은 annealing 온도만 각각 55°C 및 62°C 로 변경하였고, 기타 조건은 상기와 동일하게 시행하였다. PCR 증폭 산물은 1%의 agarose gel을 이용하여, 100 V에서 30분간 전기 영동하여, UVI pro Uvitec Ltd., Cambridge, England)로 관찰하였다. 모든 시험 균주 중의 일부를 무작위로 선택하여 gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 DNA를 추출하고 ABI 3700 장비 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)로 methylase 유전자의 염기서열을 분석하였다.

Table 1. Primers used for PCR detection of 16S rRNA methylase genes, *qnr*, and *qepA* genes

Name	Nucleotide sequence (5'→3')	Product size (bp)	GenBank accession No.
<i>armA</i> F	AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG	590	AB116388
<i>armA</i> R	TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC		
<i>rmtA</i> F	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC	635	AB083212
<i>rmtA</i> R	TTT GCT TCC ATG CCC TTG CC		
<i>rmtB</i> F	CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC	584	AB103506
<i>rmtB</i> R	CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC		
<i>rmtC</i> F	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG	711	AB194779
<i>rmtC</i> R	ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT		
<i>rmtD</i> F	ATG AGC GAA CTG AAG GAA AAA CTG C	532	DQ914960
<i>rmtD</i> R	GCT CCA AAA GCG GCA GCA CCT TA		
<i>qnrA</i> F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580	qnrA1-qnrA6*
<i>qnrA</i> R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
<i>qnrB</i> F	GGA ATT GAA ATT CGC CAC TG	264	qnrB1-qnrB6*
<i>qnrB</i> R	TTT GCC GCC CGC CAG TCG AA		
<i>qnrS</i> F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428	qnrS1-qnrS2*
<i>qnrS</i> R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG		
<i>qepA</i> F	CCG ACA GGC CCA CGA CGA GGA TGC	549	AB263754
<i>qepA</i> R	TCG GCG GCG TGT TGC TGG AGT TCT		

*Primers designed for multiplex PCR of various *qnr* genes by Cattoir V, et al¹².

Table 2. The rates and distributions of 16S rRNA methylase in gram-negative bacilli isolated at a secondary- and tertiary-care hospital from 2006 to 2007

Bacterial species	Secondary-care hospital (Myongji Hospital)					Tertiary-care hospital (Severance Hospital)				
	No. isolated	No. of PCR positive for				No. isolated	No. (%) of PCR positive for			
		Total (%)	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>armA+rmtB</i>		Total (%)	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>armA+rmtB</i>
<i>E. coli</i>	646	8 (1)	8	0	0	416	2 (<1)	0	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	245	51 (21)	49	0	2	215	24 (11)	24	0	0
<i>K. oxytoca</i>			ND			44	1 (2)	1	0	0
<i>Citrobacter</i> spp.	37	3 (8)	3	0	0	45	4 (10)	2	2	0
<i>Enterobacter</i> spp.	129	2 (2)	2	0	0	52	2 (4)	2	0	0
<i>S. marcescens</i>	52	4 (8)	4	0	0	48	2 (4)	2	0	0
<i>P. mirabilis</i>	57	2 (4)	2	0	0			ND		
<i>M. morgani</i>	27	1 (4)	1	0	0			ND		
<i>Providencia</i> spp.	21	3 (14)	0	2	1			ND		
<i>A. xylosoxidans</i> *			ND			5	1 (20)	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	257	1 (<1)	1	0	0	248	0 (0)	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> spp.			ND			112	11 (10)	11	0	0
<i>S. maltophilia</i>			ND			66	1 (2)	1	0	0
Total	1,471	75 (5)	70	2	3	1,251	48 (4)	44	3	1

**A. xylosoxidans*: *rmtA* positive.

Abbreviation: ND, not determined.

5. 플라스미드 매개 quinolone 내성 유전자 검출

플라스미드에 의해 전달되는 quinolone 내성 유전자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 및 *qepA*를 PCR로 검출하였다[12]. DNA는 16S rRNA methylase를 검출하기 위해 추출한 것을 사용하였다. 상청액 1 µL, 20 pmol의 primer 각각 1 µL, 1 U의 *Taq* DNA pol-

ymerase가 들어있는 PreMix (Bioneer)에 증류수를 첨가하여 총 20 µL가 되게 하여 PCR을 시행하였다. 증폭은 Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf)을 사용하였고, *qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS* multiplex PCR은 94°C 5분의 predenaturation 후, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초 및 extension 72°C 1분을 35회 반복하였고, 마지막으로 5분간 extension을 시행하였다. *qepA*

PCR은 annealing 온도만 61°C로 변경하였고, 기타 조건은 상기와 동일하게 시행하였다. 일부 균주에서는 ABI 3700 장비로 염기 서열을 분석하여 유전형질을 확인하였다.

결 과

1. 16S rRNA methylase 양성률

2차 병원에서는 그람 음성 간균 1,471주 중 75주(5%), 3차 병원에서는 1,251주 중 48주(4%)의 16S rRNA methylase 생성균이 분리되었다. 16S rRNA methylase 양성인 균주의 비율은 세브란스병원 분리주 중 균종별로 <1~20% 및 명지병원 분리주 중 균종별로 <1~21%의 분포를 보였다(Table 2).

2. 16S rRNA methylase 유전형 분포

16S rRNA methylase 양성 균주 중에서 가장 흔한 것은 *armA* 이었다. 2차 병원 분리주 75주에서 70주(93%)가, 3차 병원 분리주 48주에서 43주(90%)가 *armA* 양성이었고, 균종별로는 *E. coli* 9주, *K. pneumoniae* 75주, *K. oxytoca* 1주, *Citrobacter* spp. 5주, *Enterobacter* spp. 4주, *S. marcescens* 6주, *P. mirabilis* 2주, *M. morganii* 1주, *Providencia* spp. 1주, *P. aeruginosa* 1주, *Acinetobacter* spp. 11주 및 *S. maltophilia* 1주였다. *E. coli* 2주, *K. pneumoniae* 2주, *Citrobacter* 균종 2주 및 *Providencia* 균종 3주에서는 *rmtB* 유전자가 검출되었으며, 이 중 4주에서는 동시에 *armA* 유전자가 검출되었다. *armA*와 *rmtB*가 동시에 분리되

Table 3. Comparisons of MICs (μ g/mL) of antibiotics for 16S rRNA methylase-positive and -negative gram-negative bacilli

Antimicrobial agents	16S rRNA methylase-positive				16S rRNA methylase-negative			
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
<i>Enterobacteriaceae</i> (133)								
Ceftazidime	0.12~>128	64	>128	66	1~>128	32	>128	63
Cefoxitin	0.5~>128	>128	>128	85	8~>128	32	>128	68
Imipenem	0.06~32	0.25	2	4	$\leq 0.06 \sim 4$	0.25	1	0
Levofloxacin	0.06~>128	64	128	81	0.12~>128	2	128	36
Arbekacin	>128	>128	>128	100	2~>128	16	>128	50
Amikacin	>128	>128	>128	100	8~>128	16	>128	50
Gentamicin	>128	>128	>128	100	8~>128	128	>128	100
Tobramycin	>128	>128	>128	100	32~>128	64	>128	100
<i>Pseudomonas</i> (9) and <i>Acinetobacter</i> (13)								
Ceftazidime	128~>128	>128	>128	100	2~>128	16	>128	45
Imipenem	1~8	4	4	0	1~32	16	32	72
Levofloxacin	4~64	8	32	63	2~>128	64	128	90
Arbekacin	>128	>128	>128	100	2~>128	64	>128	63
Amikacin	>128	>128	>128	100	4~>128	64	>128	90
Gentamicin	>128	>128	>128	100	2~>128	>128	>128	90
Tobramycin	>128	>128	>128	100	0.5~>128	128	>128	90

Table 4. Comparisons of the rates of β -lactam resistance and quinolone resistance in 16S rRNA methylase-positive and -negative gram-negative bacilli

Bacterial species (No. of isolates)	No. (%) of other resistance mechanisms					
	ESBL	PABL	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i> *
16S rRNA methylase-positive						
<i>E. coli</i> (10)	7 (70)	7 (70)	0 (0)	2 (20)	1 (10)	1 (10)
<i>K. pneumoniae</i> (75)	44 (59)	69 (92)	1 (2)	68 (91)	0	0
Other <i>Enterobacteriaceae</i> (23)	13 (57)	NT	2 (9)	9 (39) [†]	0	1 (4)
<i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Acinetobacter</i> spp. (12)	0 [‡]	NT	0	1 (8)	0	0
16S rRNA methylase-negative						
<i>E. coli</i> (4)	2 (50)	1 (25)	0	0	0	1 (25)
<i>K. pneumoniae</i> (14)	6 (43)	9 (64)	0	8 (57)	1 (7)	0
Other <i>Enterobacteriaceae</i> (4)	1 (25)	NT	0	1 (25)	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Acinetobacter</i> spp. (11)	NT	NT	0	4 (36)	0	0

*2 of 3 *qepA*-positive strains were *rmtB*-positive strains; [†]7 *qnrB*-positive strains were *Citrobacter* species; [‡]Metallo- β -lactamase production tested in *P. aeruginosa*.

는 균주는 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 2주 및 *P. rettgeri* 1주였으며, 균종별 및 분리 병원별 분포가 다양하였다. *A. xylosoxidans* 1주에서는 *rmtA* 유전자가 양성이었다. 유전자의 변이형을 선별하기 위해서 3차 병원에서 분리된 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 2주, *C. freundii* 1주, *A. baumannii* 1주 및 *S. maltophilia* 1주와 2차 병원에서 분리된 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 3주, *C. freundii* 1주, *P. rettgeri* 1주, *M. morgani* 1주 및 *P. aeruginosa* 1주에서 *armA* 유전자 염기 서열을 분석하였으나 모든 균주에서 동일한 염기 서열을 보였다. *rmtB* 유전자가 검출된 9주에 대해서도 유전자를 증폭하여 염기 서열을 분석하였으나, 염기 서열의 변이는 관찰되지 않았다(Table 2).

3. 16S rRNA methylase 생성 균주의 항균제 내성 양상

16S rRNA methylase를 생성하는 균주 중, *Enterobacteriaceae* 133주와 *P. aeruginosa* 9주 및 *Acinetobacter* 균종 13주를 대상으로 항균제 감수성을 시험하였다. 16S rRNA methylase를 생성하는 *Enterobacteriaceae*에 대한 ceftazidime 및 cefoxitin의 MIC₉₀은 >128 µg/mL 및 >128 µg/mL으로 16S rRNA methylase 음성 균주의 >128 µg/mL 및 128 µg/mL과 비슷하였으나, 내성률은 16S rRNA methylase 양성 균주에서 각각 66% 및 85%로 16S rRNA methylase 음성인 균주의 63% 및 68%보다 cefoxitin 내성률이 높았다. 16S rRNA methylase 양성인 *Enterobacteriaceae*의 levofloxacin에 대한 내성률은 81%로 음성인 균주의 36%와 비교하여 매우 높았다. Aminoglycoside 계열인 arbekacin, amikacin, gentamicin 및 tobramycin의 MIC가 모두 128 µg/mL 이상으로 고도 내성을 보였다. *P. aeruginosa*와 *Acinetobacter* 균종의 imipenem에 대한 MIC₉₀은 4 µg/mL으로 모두 감수성이었다(Table 3).

16S rRNA methylase 양성 *E. coli* 10주의 ESBL, PABL 및 *qnr* 양성률은 각각 70%, 70% 및 30%로, 음성인 4주의 50%, 25% 및 0%와 비교하여 높았으나, 균주 수가 너무 적어 양성률을 비교하기가 어려웠다. *K. pneumoniae*의 ESBL 및 PABL 양성률은 59% 및 92%로, 16S rRNA methylase 음성 균주의 43% 및 64%에 비해서 높았으며, 16S rRNA methylase를 생성하는 *K. pneumoniae*의 91%가 *qnrB*를 동시에 가지고 있었다(Table 4). 다른 *Enterobacteriaceae*에서도 ESBL 및 *qnr* 유전자 양성률은 57% 및 48%였고, 16S rRNA methylase 음성에서는 각각 25%였다. 기타 *Enterobacteriaceae* 균종 23주 중, *armA*와 *qnrB*가 동시에 양성인 균주는 9주였고, 9주의 *armA*와 *qnrB* 동시 생성 균주 중에서 7주가 *Citrobacter* spp.에 속하였다. Plasmid성 quinolone efflux pump인 *qepA* 유전자는 *rmtB* 유전자 양성인 *E. coli* 및 *C. freundii*와 16S rRNA methylase 음성인 1주의 *E. coli*에서 양성이었고(Table 4), 3주 모두의 염기서열은 문헌에 보고된 것과 100% 일치하였으나, 분리 시기와 기관 및 16S rRNA methylase 생성 양상이 3균주 각각 상이하여 역학적 연

관성은 낮을 것으로 추정되었다. *Pseudomonas* 및 *Acinetobacter* 균종에서 metallo-β-lactamase를 생성하는 균주는 없었다.

고 찰

16S rRNA methylase에 의한 aminoglycoside 내성은 aminoglycoside를 합성하는 *Actinomycetes* 균종에서 처음 발견되었으며, 세균이 생성하는 aminoglycoside 항균제로부터 자신을 보호하는 역할을 한다[13,14]. 최근까지 16S rRNA methylation에 의한 aminoglycoside 내성은 그람 음성 간균에 존재하지 않는 것으로 생각되었으나, *armA*와 *rmtA*가 각각 처음으로 보고되었다[3,4]. 그람 음성 간균에서 분리된 16S rRNA methylase의 기원에 대해서는 아직 명확하지 않으나, 처음 보고된 *armA*와 *Actinomycetes* 균종에서 보고된 16S rRNA methylase의 상동성이 37~47%로 상이하고, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD* 역시 마찬가지로 기존의 16S rRNA methylase와는 낮은 상동성을 나타내는 것으로 보아 알려지지 않은 기원으로부터 유래되었을 것으로 생각되고 있다[3-7].

2000년부터 2005년 사이에 벨기에의 2개 병원에서 수집한 15,386주의 그람 음성 간균을 대상으로 시행한 연구에서 총 19주(0.12%)의 16S rRNA methylase 생성 균주를[15], 일본 전역의 169개 병원에서 수집한 87,626주의 그람 음성 간균 중, *rmtA* 14주, *armA* 9주, *rmtB* 1주 및 *rmtC* 2주를 보고하였다[16]. 본 연구에서는 2,722주의 그람 음성 간균을 시험하여 123주의 16S rRNA methylase 양성 세균을 검출하였고, 양성률은 4.5%로 기존의 보고에 비해 높은 결과를 나타내었다. 특히 *K. pneumoniae*의 양성률이 2차 병원 21% 및 3차 병원 11%로 다른 균종에 비하여 높았으며, 기타 균종의 양성률은 병원별로 0.5%부터 14%까지 다양하였다. 16S rRNA methylase를 생성하는 균종의 종류는 기존에 보고되었던 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii* 및 *Acinetobacter* 균종이 대부분이었으나, *C. koseri* 및 *Morganella morganii* 같은 *Enterobacteriaceae*와 포도당 비발효 그람 음성 간균인 *S. maltophilia*에서 처음으로 *armA* 유전자를 검출하였고, 국내에서는 처음으로 *Achromobacter xylosoxidans*에서 *rmtA* 유전자를 검출하였다. 이는 국내에서 분리되는 임상 균주의 16S rRNA methylase 생성 균주의 비율이 외국에 비하여 월등히 높을 뿐 아니라, 기존의 보고보다 다양한 균종으로 확산되고 있음을 나타내는 것으로 생각되었다.

16S rRNA methylase의 유전형은 *armA*가 92%로 대부분을 차지하여 이전 국내 보고와 일치하였고[9,17], *rmtA*가 주로 분리되는 일본과는 다르게 *armA*가 흔한 유럽과 유사한 양상을 나타내었다. 지리적으로 가까운 일본보다 유럽과 유사한 양상을 나타낸 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판

단된다. 또한 기존에는 국내에서 드물게 보고되던 *rmtB* 유전자가[9,18] 9균주(8%)에서 검출되어 이전에 비해 *rmtB* 유전자의 확산이 증가했음을 알 수 있었다. *rmtB* 유전자의 확산 원인은 다양하나, 최근 중국에서 보고한 바에 의하면 aminoglycoside를 먹이에 혼합하여 사육한 돼지에서 분리된 *E. coli*의 32%가 *rmtB* 유전자를 가지고 있다고 하여[18], 환경에서 존재하는 *rmtB* 유전자의 전파를 주의해야 할 것으로 생각되었다. 또한 16S rRNA methylase에 관한 기존의 모든 보고에서는 한 균주에서 하나의 16S rRNA methylase 유전자만이 보고되었으나, 본 연구에서는 4균주에서 *armA*와 *rmtB*를 동시에 생성하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 균주의 분자유전학적인 특성에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 유전형의 변이를 관찰하기 위해 10주의 *armA* 양성 균주와 9주의 *rmtB* 양성 균주에 대해 시행한 염기 서열 분석에서는 모두 동일한 염기 서열을 보여, 유전형의 분화는 아직 일어나지 않는 것으로 판단되었다.

16S rRNA methylase를 생성하는 균주는 다양한 항균제에 다제 내성을 보인다. 16S rRNA methylase 생성은 ESBL에 β -lactam 항균제 내성과 흔히 동반된다. 유럽에서 분리되는 *armA* 유전자 양성 균주의 모두에서 CTX-M 형의 ESBL 유전자가 검출됨을 알 수 있고[19], 16S rRNA methylase 생성 균주에서 CTX-M-3, CTX-M14, SHV-5 등의 ESBL 유전자가 94% (33/35)에서 검출되어, 16S rRNA methylase를 생성하는 대부분의 균주가 β -lactam 항균제에 내성임을 보고하였다[8]. CTX-M-3 유전자와 *armA* 유전자 양성인 균주에 대한 분자유전학적인 분석에서 두 내성 유전자는 동일 plasmid에 존재하지만 멀리 떨어진 위치에 존재한다고 하였다[20]. 본 연구에서도 16S rRNA methylase 양성 균주는 ceftazidime 및 cefoxitin에 대한 내성률과 ESBL 생성 양성률이 음성 균주에 비해서 높았다. 국내에서 분리되는 16S rRNA methylase 생성 균주가 CTX-M 형의 ESBL 생성주인지에 대해서는 추가적인 분석이 필요하지만, 국내에서 분리되는 *K. pneumoniae*에서 가장 흔한 ESBL 유전형이 SHV-12으로[21], 16S rRNA methylase 생성 균주에서 CTX-M 형의 ESBL 빈도에 대한 연구가 필요하다. 또한 본 연구에서는 cefoxitin에 내성으로 PABL 생성이 의심되는 균주의 비율이 16S rRNA methylase 양성 *E. coli* 70% (7/10) 및 *K. pneumoniae* 92% (69/75)로 음성인 균주의 25% (1/4) 및 64% (9/14)보다 높았다. 한편 일부 균종에서는 carbapenemase와 16S rRNA methylase를 동시에 생성하는 균주가 보고되었다. Yu 등의 보고에 의하면 중국 전역의 19개 병원에서 수집한 carbapenem 내성 *A. baumannii* 342주 중에서 *armA* 생성 균주는 221주(65%)였고, 크게 3종류의 pulsotype으로 분류되었으나, MBL 생성 균주는 없었다[22]. 미국 Pennsylvania에서 분리된 5주의 *armA* 생성 주 중에서 2주가 OXA-23을 생성하고 carbapenem에 고도 내성을 보였으며[23], 또한 MBL인 SPM-1과 *rmtD*

를 동시에 생성하는 균주에 의한 집단 감염도 브라질에서 보고되어, 16S rRNA methylase를 생성하는 일부 균주가 carbapenemase를 동시에 생성할 수 있음을 증명하였다[24]. 본 연구에서는 carbapenem 내성인 *P. aeruginosa* 중 1주에서 *armA*가 분리되었으나 carbapenemase를 생성하지는 않았으며, 16S rRNA methylase를 생성하는 *Acinetobacter* 균종 중에서 carbapenem에 내성인 균주는 없었다. 그러나 국내에서 2003년과 2005년에 국내 1개 대학 병원에서 분리된 *Acinetobacter* 균종 중, 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 대부분이 carbapenem에 내성이었다는 보고도 있어[9], 이들 균주의 내성 기전 규명에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서 분리된 16S rRNA methylase 생성 균주는 levofloxacin에 대해서도 높은 내성률을 나타내었다. Fluoroquinolone에 대한 내성 기전으로는 세균 염색체의 변이에 의한 quinolone-resistance determining region (QRDR)의 변화[25]와 efflux pump의 증가[26] 및 porin의 감소[27] 등이 주로 알려져 있다. 그러나 최근에 plasmid를 통해 다른 균주로 전파 가능한 fluoroquinolone 내성 기전이 보고되었는데, pentapeptide repeat family에 속하는 Qnr 단백질에 의한 내성 기전[28]과 plasmid-mediated active efflux (*qepA* gene)에 내성 기전[29]이 여기에 속한다. Qnr 단백질에 의한 내성은 *qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS* 유전자에 의해서 일어나며, 각 유전형별로 호발하는 균종에 차이가 있으며, 일부에서는 ESBL 유전자와 함께 검출되는 경우가 흔하다[30]. 본 연구에서는 *armA*를 생성하는 *K. pneumoniae*의 91%에서 *qnrB* 유전자가 검출되어 매우 높은 연관성을 보여주었다. 이는 항균제 선택 압력이 높은 병원 환경에서 *armA*와 *qnrB*를 동시에 갖는 *K. pneumoniae*의 확산 또는 내성 유전자에 의한 *armA*와 *qnrB*의 동시 수평 확산에 의한 것으로 생각된다. *qepA* 유전자는 *E. coli*에서 처음 보고되었으며, *rmtB* 유전자와 함께 transposable element에 존재한다. 본 연구에서도 *qepA* 유전자 양성인 3주의 균주 중, 2주에서 *rmtB*가 검출되어 유사한 양상을 보여 주었다. *qepA*에 의한 fluoroquinolone 내성은 현재까지는 매우 낮으나 *rmtB*가 확산될 경우, 동시에 확산될 가능성이 있어 주의가 필요할 것으로 판단되었다.

결론적으로 국내에서 16S rRNA methylase 유전자에 의한 aminoglycoside 고도 내성인 그람음성 간균의 양성률은 4~5%로 외국에 비하여 흔하였으며, 다양한 균종으로 내성 유전자가 전파되고 있음을 알 수 있었다. 또한 16S rRNA methylase 생성 균주 중 다제내성 균주가 혼함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2007년 대한임상미생물학회 연구비 지원으로 진행되었음.

참 고 문 헌

1. Lee K, Park KH, Jeong SH, Lim HS, Shin JH, Yong D, et al. Further increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, amikacin- and fluoroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: 2003 KONSAR surveillance. *Yonsei Med J* 2006;47:43-54.
2. Vakulenko SB and Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430-50.
3. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2565-71.
4. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003;362:1888-93.
5. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:491-6.
6. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:178-84.
7. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:852-6.
8. Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1007-12.
9. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305-12.
10. Kondo S. Development of arbekacin and synthesis of new derivatives stable to enzymatic modifications by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Antibiot* 1994;47:561-74.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. Wayne, PA, CLSI, 2006.
12. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:394-7.
13. Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tennamariensis*. *Mol Gen Genet* 1985;200:415-21.
14. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:207-33.
15. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:459-64.
16. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kato H, Shibayama K, Kimura K, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007;13:642-6.
17. Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:907-8.
18. Chen L, Chen ZL, Liu JH, Zeng ZL, Ma JY, Jiang HX. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:880-5.
19. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2949-53.
20. Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase (ESBL) gene blaCTX-M-3. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Aug 13; [Epub ahead of print]
21. Bae IK, Lee YN, Jeong SH, Lee K, Yong D, Lee J, et al. Emergence of CTX-M-12, PER-1 and OXA-30 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Clin Microbiol* 2006; 9:102-9.
22. Yu YS, Zhou H, Yang Q, Chen YG, Li LJ. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:454-5.
23. Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S Ribosomal RNA Methylase-Producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4209-10.
24. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51: 3388-90.
25. Hooper DC. Mechanisms of Quinolone Resistance. In: Hooper DC and Rubenstein E, eds. *Quinolone Antimicrobial Agents*. 3rd ed, Washington DC; American Society for Microbiology Press, 2003: 41-67.
26. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007;39:162-76.
27. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1109-17.
28. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
29. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3354-60.
30. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:629-40.

=국문초록=

그람 음성 간균에서 16S rRNA Methylase 생성 빈도와 생성 세균의 내성 양상

¹관동대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²적십자사 인천혈액원, ³결핵연구원,
⁴동의대학교 임상병리학과, ⁵연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소

이혁민¹, 고은미², 김창기³, 염종화⁴, 이경원⁵, 정윤섭⁵

배경: 근래에 16S rRNA를 methylation하여 임상적으로 유용한 모든 aminoglycoside 항균제에 고도 내성을 보이는 새로운 내성 기전이 보고되었으나, 이에 대한 국내 연구는 드물다. 이에 본 연구에서는 서울과 경기도에 소재하는 2차와 3차 병원의 환자에서 분리되는 그람음성 간균 중에서 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 빈도와 그 내성 유전형 및 다제 내성 양상을 규명하고자 하였다.

방법: 2006년 7월~2007년 6월에 경기도의 2차 병원과 2007년 4~6월에 서울의 3차 병원에 내원한 환자에서 분리한 일련의 그람 음성 간균을 대상으로 하였으며, 중복 분리주는 제외하였다. 수집한 균주는 한천 희석법으로 항균제 감수성을 시험하였고, 16S rRNA methylase 생성은 arbekacin 디스크를 이용하여 선별한 후, PCR로 유전자를 검출하였다.

결과: 그람음성 간균 중, 16S rRNA methylase 양성 균주의 비율은 2차 병원 5% (75/1,471) 및 3차 병원 4% (48/1,251)였으며, *Escherichia coli* 1% (10/1,062), *Klebsiella pneumoniae* 16% (75/460), *K. oxytoca* 2% (1/44), *Citrobacter* spp. 9% (7/82), *Enterobacter* spp. 2% (4/181), *Serratia marcescens* 6% (6/100), *Proteus mirabilis* 4% (2/57), *Achromobacter xylosoxidans* 20% (1/5), *Pseudomonas aeruginosa* <1% (1/505), *Acinetobacter* spp. 10% (11/112) 및 *Stenotrophomonas maltophilia* 2% (1/66)에서 확인되었다. *armA*는 3차 병원 분리주 48주 중 43주(90%)에서, 2차 병원 분리주 75주 중 70주(93%)에서 양성이었으며, 1주를(*rmtA*) 제외한 나머지 균주는 *rmtB* 양성이었다. 16S rRNA methylase 생성 *K. pneumoniae*의 ESBL 양성률 및 cefoxitin 내성률은 59% (44/75) 및 92% (69/75)로 높았으며, 특히 16S rRNA methylase 양성 *K. pneumoniae*의 91%가 *qnrB*를 동시에 가지고 있었다. 16S rRNA methylase 양성인 *Pseudomonas* 및 *Acinetobacter* 균종에서 metallo- β -lactamase를 생성하는 균주는 없었다.

결론: 국내에서 16S rRNA methylase 유전자 양성인 그람음성 간균은 외국에 비하여 흔하였고, 여러 균종에 널리 퍼져 있으며, 다제 내성인 경우가 많았다. [대한임상미생물학회지 2010;13:19-26]

교신저자 : 이경원, 120-752, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02-2228-2446, Fax: 02-313-0908
E-mail: leekcp@yuhs.ac