

Chromosomal Mutations in *oprD*, *gyrA*, and *parC* in Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Ji Youn Sung¹, Hye Hyun Cho², Kye Chul Kwon², Sun Hoe Koo²

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong,

²Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: Outbreaks of carbapenem resistant *P. aeruginosa* give rise to significant therapeutic challenges for treating nosocomial infections. In this study, we analyzed carbapenem resistance mechanisms in carbapenem resistant and clonally different *P. aeruginosa* strains. We analyzed chromosomal alterations in the genes of OprD and efflux system regulatory proteins (MexR, NalC, NalD, MexT, and MexZ). We also investigated chromosomal alterations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) for quinolone resistance mechanisms.

Methods: Twenty-one clonally different *P. aeruginosa* strains were isolated by repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR). PCR and DNA sequencing were conducted for the detection of β -lactamase genes and chromosomal alterations of efflux pump regulatory genes, *oprD*, and QRDR in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE*.

Results: Only one (P28) of the 21 strains harbored *bla*_{VIM-2}. Two isolates had mutations in *nalD* or *mexZ* that were associated with efflux pump overexpression. Chromosomal alterations causing loss of OprD were found in 4 out of 21 carbapenem resistant *P. aeruginosa* strains. Nine of 10 imipenem and ciprofloxacin resistant strains had alterations in *gyrA* and/or *parC*.

Conclusion: Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* was mediated by several mechanisms, including loss of the OprD, overexpression of efflux systems, and production of carbapenemase. Resistance to quinolone is frequently caused by point mutations in *gyrA* and/or *parC*. (Korean J Clin Microbiol 2011;14: 131-137)

Key Words: Carbapenem resistant *P. aeruginosa*, OprD, Efflux system regulatory proteins, QRDR

서 론

녹농균에 의한 감염증 치료에는 carbapenem계 항균제가 많이 사용되어 왔는데 이는 작용 범위가 넓고, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)을 포함한 대부분의 β -lactamase에 저항성을 보여 그람음성균의 치료에 매우 효과적이기 때문이다[1]. 그러나, 최근 carbapenem에도 내성을 보이는 녹농균의 감염이 증가하고 있어 심각한 문제가 되고 있다[2].

녹농균의 carbapenem 내성은 주로 세포막의 투과성 감소, 항균제의 유출, 그리고 carbapenemase 생성 등에 의해 나타난다[3]. 이 중 carbapenemase 생성을 제외한 나머지 기전은 염색체상의 유전자 변이에 의해 나타나는 것으로 클론성으로 내성이 확산된다[4]. 항균제가 제 기능을 하기 위해서는 녹농균의 외막층을 먼저 통과해야 하는데 외막의 구멍 단백질(outer membrane porin proteins)이 감소하면 세포질 내로 항균제가 들어갈 수 없게 된다.

특히 외막의 구멍 단백질 중 OprD의 소실은 녹농균의 carbapenem에 대한 내성과 밀접하게 관련되었다고 알려져 있다. 우리나라에서 분리된 녹농균을 대상으로 한 연구에서도 carbapenem 내성균에서 OprD 단백질이 소실되거나 감소되었음이 확인된 바 있다[5].

또한 녹농균은 세포 내로 들어간 항균제를 적극적으로 세포 밖으로 퍼내는 유출계(efflux system)를 작동시킴으로써 세포 내 항균제 농도를 감소시키는데 이러한 능동적인 약물 배출은 녹농균이 항균제에 내성을 갖게 하는 중요한 기전이다. 유출계 중 특히 RND (resistance nodulation division) 계열인 MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ 그리고 MexXY-OprM 등이 녹농균에서 중요한 역할을 한다. 이들 유출계는 각각의 조절인자들에 의해 그 발현이 제한된다. 그러나 조절인자의 유전자에 변이가 생겨 그 기능을 하지 못하게 되면 유출계가 다량 발현하게 되어 항균제 내성을 유발한다[6]. 유출계의 발현 조절과 관련된 유전자로는 MexAB-OprM계를 조절하는 *mexR*, *nalC* 및 *nalD*와 MexEF-OprN계를 조절하는 *mexT*와 *mexS* 등이 있다[7]. MexAB-OprM의 발현억제 유전자인 *mexR*과 두 번째 그리고 세 번째 조절인자인 *nalC* 및 *nalD*에 변이가 생기면 MexAB-OprM계의 발현량이 증가한다. 2006년 미국에서 분리된

Received 27 July, 2011, Revised 10 October, 2011

Accepted 17 October, 2011

Correspondence: Sun Hoe Koo, Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University Hospital, 640 Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea. (Tel) 82-42-280-7798, (Fax) 82-42-257-5365, (E-mail) shkoo@cnu.ac.kr

carbapenem 내성 녹농균에서도 *mexA*의 발현량이 증가된 균들 대부분에서 *nalC*와/또는 *nalD*의 변이가 확인된 바 있다[8]. MexEF-OprN계의 발현을 조절하는 *mexT*와 *mexS*에 돌연변이가 생기면 MexEF-OprN계도 역시 과량 발현된다. *mexT*는 그 외에도 OprD 단백질과 MexAB-OprM계의 억제조절인자로 작용한다. *mexZ* 또한 조절인자로 작용을 하며 MexXY-OprM계의 과량발현을 유도함이 확인되었다[9,10].

녹농균은 염색체상의 유전자 변이에 의한 것뿐 아니라 내성 유전자의 획득에 의해서도 carbapenem에 내성을 갖게 되는데 대표적인 것이 carbapenem을 불활성화시키는 효소인 carbapenemase의 획득이다. 특히 획득성 carbapenemase에 의한 내성은 다른 균에 그 내성유전자를 전달할 수 있다는 점에서 내성확산의 우려를 낳고 있다. 녹농균이 생성하는 대표적인 carbapenemase로는 class A의 GES형 β -lactamase, class B의 VIM, IMP, SIM, GIM 및 SPM형 metallo- β -lactamase (MBL), class D의 OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-51 및 OXA-58형 β -lactamase 등이 있다[11,12].

한편 녹농균은 염색체상에 존재하는 유전자의 변이에 의해 carbapenem 항균제 이외에도 다른 항균제들에 내성을 나타낸다. 그 중 하나가 quinolone 내성인데 DNA gyrase와 topoisomerase IV 유전자를 암호화하는 quinolone 내성결정부위(QRDR; quinolone resistance-determining region)의 변이는 녹농균이 quinolone에 내성을 갖는데 중요한 역할을 한다[13]. DNA gyrase는 GyrA와 GyrB라는 단량체 소단위(monomeric subunits)로 구성되고 topoisomerase IV는 ParC와 ParE라는 단량체 소단위로 구성되기 때문에 이들 유전자에 변이가 생기면 항균제 내성이 증가한다[14].

이러한 내성기전들로 인해 carbapenem 또는 quinolone 내성을 갖게 된 녹농균의 출현 및 확산은 이 세균에 의한 감염증 치료에 많은 어려움을 가중시킬 수 있으므로 임상적으로 중요한 문제이다. 따라서 녹농균의 항균제 내성 기전을 밝히는 것은 이 균의 특성을 이해하고, 치료와 예방 계획을 수립하는데 중요하다. 본 연구에서는 대전의 한 대학병원에서 분리된 imipenem 내성 녹농균을 대상으로 녹농균의 carbapenem 내성기전을 밝히기 위해 OprD 단백질유전자 및 유출계 조절유전자들에 변이가 있는지를 조사하였고 carbapenemase의 유전형을 규명하였다. 더불어 quinolone 내성에 관여하는 QRDR의 변이도 함께 연구하여 염색체상의 유전자 변이와 항균제 내성과의 관련성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2006년 7월부터 2008년 3월까지 충남대학교병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체에서 분리된 녹농균 중 imipenem에 내성을 보인 62주를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리

된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 동정은 집락의 형태, oxidase 및 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)를 이용한 생화학적 방법으로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 시험

미국의 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 amikacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA), gentamicin (Sigma-Aldrich), ceftazidime (Hanmi, Seoul, Korea), cefepime (Boryung, Seoul, Korea), imipenem (MSD, Westpoint, Pa., USA), meropenem (Yuhan, Seoul, Korea) 및 ciprofloxacin (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA)에 대한 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 한천희석법으로 측정하였다[15]. 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위 내에 있는지를 확인하였다.

3. Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR)을 이용한 클론 선택

DNA purification kit (솔젠트, 대전, 한국)로 대상 균주의 염색체 DNA를 추출하여 주형 DNA로 사용하였다. Primer로는 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')와 REP2-Dt (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3')로 명명된 장내세균의 반복서열을 이용하였다[16]. 증폭반응은 DNA 추출액(5.0 μ L), 10 $\times$ Taq buffer (5.0 μ L), 10 mM dNTP mix (1.0 μ L), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 50 μ L의 혼합액으로 시행하였다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT., USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 68°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10 μ L)은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동 한 후 BioDoc-14TM Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. 밴드의 강도와 상관없이 밴드의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 밴드 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다[17].

4. 분자생물학적 방법에 의한 유전형 확인 및 유전자 변이 조사

1) Carbapenemase의 유전형 분석: Class A 유전자(*bla_{GES}*), class B 유전자(*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}*), class D 유전자(*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*)를 검출하기 위해 이미 보고된 바 있는 기존의 시발체를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 염기서열분석을 시행하였다[11]. DNA 추출액(5 μ L), 10 $\times$ Taq buffer (2.5 μ L), 10 mM dNTP mix (0.5 μ L), primer 각 10 pmol, 0.7U Taq DNA poly-

merase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 mL의 반응 용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp.)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 20 초, 59°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (솔젠트)로 분리 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

2) 염색체상에 존재하는 유전자의 변이 조사: PCR과 염기서열 분석을 통하여 염색체상에 존재하는 항균제 내성관련 유전자의 변이를 조사하였다. 유출계의 중요한 조절유전자인 *mexR*, *nalC*, *nalD*, *mexT* 및 *mexZ*와 외막의 구멍 단백질 유전자인 *oprD*의 변이를 조사하였고 더불어 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parD*의 QRDR 변이도 확인하였다. 사용한 시발체는 Table 1에 기술하였고 PCR 반응용액과 염기서열 분석방법은 carbapenemase의 유전형 분석 때와 동일하게 하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 62주의 imipenem 내성 녹농균이 환자의 임

상검체에서 분리되었다. 이들이 같은 클론에서 유래되었는지를 확인하기 위하여 rep-PCR을 수행한 결과 62주가 21가지의 밴드 패턴을 보였다. 각기 다른 밴드 패턴을 보인 균주 한 주씩을 선택하여 총 21주를 대상으로 항균제에 대한 MIC를 측정한 결과 대상균주 21주 중 한 주(P15)를 제외한 20주가 imipenem에 고도내성을 보였다(MIC >256 mg/L) (Table 2).

2. Carbapenemase 유전형 및 염색체 유전자의 변이

1) Carbapenemase 유전형: Carbapenemase 유전자 검출을 위해 PCR을 수행한 결과 대상 균주 21주 중 한 주(P28)만이 *bla_{VIM}*에 양성반응을 보였다. PCR 생산물을 염기서열 분석한 결과 *bla_{VIM-2}*의 염기서열과 일치하였다.

한편 21주의 imipenem 내성 녹농균에서 Ambler class A와 D에 속하는 carbapenemase 유전자는 검출되지 않았다.

2) 유전자의 변이조사: 유출계의 중요한 조절유전자인 *mexR*, *nalC*, *nalD*, *mexT* 및 *mexZ*의 변이를 조사한 결과, 대상균주 21주 중 7주가 *mexR*에 Val₁₂₆→Glu 변이를 가지고 있었고 14주가 *nalC*에 Gly₇₁→Glu 및 Ser₂₀₉→Arg 변이를 가지고 있었다. *nalD*에 변이를 가지고 있는 균주는 한 주로 Thr₁₈₈→Ala 변이를 가지고 있었다. 21주 중 15주가 *mexT*에 Leu₂₆→Val 변이를 가지고 있었고 *mexZ*에서 다양한 변이가 확인된 균주도 12주나 되었다(Table 3).

외막의 구멍 단백질 유전자인 *oprD*의 변이를 조사한 결과 총 4주에서 변이가 확인되었는데 4주 중 한 주는 Tyr₉₁→stop

Table 1. Oligonucleotide primers for the detection of efflux regulator-encoding, OprD, and QRDR genes

Primer pairs	Target	Sequence (5' – 3')	Reference
Efflux regulator-encoding genes			
mexR-F	<i>mexR</i>	TGTTCTTAAATATCCTCAAGCGG	8
mexR-R		GTTGCATAGCGTTGTCCTCA	
nalC-F	<i>nalC</i>	TCAACCCTAACGAGAAACGCT	8
nalC-R		TCCACCTCACCGAACTGC	
nalD-F	<i>nalD</i>	GCGGCTAAAATCGGTACACT	8
nalD-R		ACGTCCAGGTGGATCTTGG	
mexT-F	<i>mexT</i>	AAAACCACCCGTCGTTATTG	8
mexT-R		CAGTTCGTCGGTGTAGCTGA	
mexZ-F	<i>mexZ</i>	ATTGGATGTGCATGGGTG	8
mexZ-R		TGGAGATCGAAGGCAGC	
Opr D gene			
oprD-F	<i>oprD</i>	ATGCGACATGCGTCATGCAAT	4
oprD-R		CGGTACCTACGCCCTTCCTT	
QRDR gene			
GyrA-F	<i>gyrA</i>	CGGGATGAACGAATTGGGTGTGA	14
GyrA-R		AATTTTACTCATACGTGCTTCGG	
ParC-F	<i>parC</i>	TTCCCGTGCATTTTCGATCAGTACTTC	14
ParC-R		CGTATGACAAAGGATTCCGGTAAATC	
ParE-F	<i>parE</i>	GTCCGTAAGCAATCAAAG	14
ParE-R		CTTTATATAAAGGCGGTAACG	
GyrB-F	<i>gyrB</i>	TGAAATTCTTGCTGGA AAAAC	14
GyrB-R		CAACAATAGGACGCATGTAAC	

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the 7 antimicrobial agents for 21 isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* as determined by agar dilution

Isolates	MICs (mg/L)							Rep-PCR identical strains*
	AMK	GEN	CAZ	FEP	IPM	MEM	CIP	
P1	128	>1,024	16	4	>1,024	128	>32	4
P2	128	>1,024	16	4	>1,024	128	>32	4
P3	<2	64	64	<2	256	16	4	5
P4	512	>1,024	64	16	>1,024	64	>32	13
P5	128	>1,024	16	4	>1,024	128	>32	4
P6	1,024	256	>1,024	>256	>1,024	256	1	1
P8	1,024	256	>1,024	>256	>1,024	64	1	1
P11	64	64	128	48	>1,024	128	1	3
P15	<2	<2	<2	<2	16	2	>32	1
P17	>1,024	256	>1,024	>256	>1,024	256	>32	1
P18	>1,024	>1,024	>1,024	>256	>1,024	512	2	1
P20	<2	<2	16	<2	256	8	1	1
P28	32	32	256	128	>1,024	16	>32	1
P41	>1,024	256	>1,024	>256	>1,024	128	1	2
P48	16	32	<2	8	512	32	>32	6
P53	512	>1,024	128	>256	512	256	>32	5
P55	<2	<2	16	<2	256	8	1	1
P70	<2	<2	256	>256	512	8	1	1
P86	<2	<2	256	128	512	16	1	1
P91	64	16	256	>256	>1,024	64	1	3
P92	32	32	256	>256	>1,024	32	>32	3

*The number of strain(s) shown identical rep-PCR band pattern.

Abbreviations: AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacin.

Table 3. Chromosomal alteration(s) in efflux regulator-encoding genes of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Isolate	Chromosomal alteration(s) in				
	MexR	NalC	NalD	MexT	MexZ
P1	Val ₁₂₆ →Glu	None	None	Leu ₂₆ →Val	None
P2	None	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	Ser ₁₈₆ →Asp
P3	Val ₁₂₆ →Glu	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	Ser ₁₈₆ →Asp
P4	None	Gly ₇₁ →Glu, Glu ₁₅₃ →Gln, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	None
P5	None	Gly ₇₁ →Glu, Glu ₁₅₃ →Gln, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	His ₅₁ →Tyr, Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P6	None	None	None	None	None
P8	Val ₁₂₆ →Glu	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	None	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P11	None	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P15	None	None	None	None	Gln ₁₃₂ →stop
P17	None	Gly ₇₁ →Glu, Glu ₁₅₃ →Gln, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	None
P18	None	Gly ₇₁ →Glu, Ala ₁₈₆ →Thr	None	Leu ₂₆ →Val	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P20	Val ₁₂₆ →Glu	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	Thr ₁₈₈ →Ala	Leu ₂₆ →Val	None
P28	None	None	None	Leu ₂₆ →Val	None
P41	Val ₁₂₆ →Glu	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	None	None
P48	None	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	None
P53	None	Gly ₇₁ →Glu, Glu ₁₅₃ →Gln, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P55	None	None	None	None	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P70	None	None	None	None	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P86	None	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	None
P91	Val ₁₂₆ →Glu	Gly ₇₁ →Glu, Ser ₂₀₉ →Arg	None	Leu ₂₆ →Val	Arg ₁₃₈ →Leu, Ser ₁₈₆ →Asp
P92	Val ₁₂₆ →Glu	None	None	Leu ₂₆ →Val	Ser ₁₈₆ →Asp

Table 4. Chromosomal alteration(s) in *oprD*, *gyrA*, and *parC* of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Isolate	Chromosomal alteration(s) in		
	OprD	GyrA	ParC
P1	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P2	Deletion bp 352-368	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P3	None	None	None
P4	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P5	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P6	None	None	Ser87→Leu
P8	None	None	None
P11	Tyr91→stop	None	None
P15	None	None	Ser87→Leu
P17	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P18	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P20	None	Thr83→Ile,	None
P28	None	Asp87→Tyr	
P41	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P48	Deletion G 333	None	Ser87→Leu
P53	None	Thr83→Ile	Ser87→Trp
P55	None	Thr83→Ile	Ser87→Leu
P70	None	None	None
P86	None	None	None
P91	None	None	None
P92	GA insertion after A382	None	None

변이를 가지고 있었고 나머지 3주는 frameshift를 가지고 있었다(Table 4).

한편 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parD*의 QRDR 변이를 조사한 결과 21주 중 10주가 *gyrA*에 변이를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이들 10주는 모두 Thr83→Ile 변이를 가지고 있었으며 그 중 한 주(P20)는 Asp87→Tyr 변이도 같이 가지고 있었다. *parC*에 변이를 가지고 있는 균주는 모두 12주였는데 그 중 11주가 Ser87→Leu 변이를 가지고 있었고 나머지 한 주가 Ser87→Trp 변이를 가지고 있었다(Table 4). 반면에 *gyrB*와 *parD*에서는 변이가 발견되지 않았다.

고 찰

Carbapenem 항균제는 녹농균이 생성하는 여러가지 β -lactamase에 안정하며 분자량이 작고 양성(zwitterionic)하전 및 친수성 구조여서 세균 세포 내로 잘 투과되는 장점이 있다. 따라서 carbapenem은 여러 β -lactam제에 내성인 녹농균의 감염치료에 쓸 수 있는 귀중한 항균제이다. 그러나 carbapenem 사용이 늘어감에 따라 최근에는 carbapenem에도 내성을 보이는 다제내성 녹농균의 감염이 증가하고 있어 임상적으로 많은 문제가 되고 있다. 따라서 carbapenem 내성기전을 밝히는 것은 녹농균 감염을 치료하는데 매우 중요하다.

녹농균의 carbapenem 내성기전을 조사하기 위해 imipenem

내성이면서 유전적으로는 서로 다른 균주를 수집한 결과 총 21주의 녹농균이 임상검체로부터 얻어졌다. 수집된 총 21주의 imipenem 내성 녹농균을 대상으로 유출계의 조절유전자인 *mexR*, *nalC*, *nalD*, *mexT* 및 *mexZ*의 변이를 조사한 결과 7주에서 *mexR*에, 그리고 14주에서 *nalC*에 변이가 있는 것이 확인되었다. 그러나 이들 유전자의 변이는 녹농균에서 빈번하게 발견되는 변이이기는 하나 *mexA*의 발현에 직접적으로 영향을 주는 변이는 아니다[18,19]. 21주 중 한 주(P20)가 *nalD*에 Thr188→Ala 변이를 가지고 있었는데 이 변이는 *mexA*의 발현량 증가와 관련이 있는 것으로 확인된 바 있다[8]. *mexT*와 *mexZ* 또한 많은 변이를 가지고 있었으나 실제로 발현에 영향을 주는 변이를 가지고 있는 균주는 한 주(P15)뿐이었다. 이 균주(P15)는 아미노산이 stop codon으로 치환된 변이를 가지고 있었는데, 2006년 미국에서도 *mexZ*의 염기가 바뀌어서 stop codon이 된 경우에 *mexX*의 발현량이 증가했다는 보고가 있었다[8]. Imipenem 내성균 21주를 대상으로 유출펌프 조절유전자에 변이가 있는지를 조사한 결과 많은 균주가 유전자에 변이를 가지고 있었으나 실제로 발현량에 중요한 영향을 주는 변이를 가지고 있었던 균주는 2주(P15, P20)뿐이었다. 그러나 이 균주들의 carbapenem에 대한 MIC는 유출펌프 조절유전자에 변이를 갖고 있지 않는 균주들과 크게 차이가 없었다. 2001년의 보고에서도 유출펌프의 발현량보다는 OprD 단백질 발현이 carbapenem 내성에 크게 기여한다고 하였다[5].

본 연구에서도 *oprD*의 변이를 조사한 결과 총 4주에서 OprD 단백질 발현억제와 관련된 변이가 확인되었다(Table 4). 4주 중 한 주는 Tyr91→stop 변이를 가지고 있었고 나머지 3주는 frameshift를 가지고 있었는데 유전자상에 stop codon이나 frameshift가 생기면 이는 OprD의 소실을 유발한다[4,17]. OprD 단백질 발현억제와 관련된 변이가 확인된 4개의 균주는 모두 imipenem (MIC >512 mg/L)과 meropenem (MIC >32 mg/L)에 대해 고도내성을 보였는데 이는 녹농균의 경우 OprD 단백질 발현이 carbapenem 내성에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

녹농균 21주를 대상으로 carbapenem 내성획득에 중요한 역할을 하는 carbapenemase의 유전형질을 조사한 결과 대상 균주 21주 중 한 주(P28)가 VIM-2를 생성하는 것으로 나타났다. VIM-2 생성 녹농균은 1998년 국내에 처음으로 소개되었으며 2003년 국내에서 분리된 carbapenem 비감수성 녹농균 중 11.4%를 차지하였다[20,21]. 2005년의 보고에서도 18.1%에 해당하는 carbapenem 비감수성 녹농균이 VIM-2를 생성하는 것으로 나타나 국내에는 VIM-2가 흔한 것임이 밝혀진 바 있다[22].

본 연구에서는 녹농균의 carbapenem 내성기전에 대한 연구 외에, quinolone 내성을 갖게 하는 염색체상의 유전자에 변이에 대해서도 조사하였다. Quinolone은 녹농균 감염 치료에 광범위하게 사용되어 온 항균제 중 하나이다. 그러나 사용한 지 20년이 지나자 이 항균제에 내성인 세균이 널리 퍼지게 되었다. 녹

농균이 quinolone 내성을 갖게 되는 중요한 기전 중 하나가 quinolone의 표적인 세균의 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV의 변이이다. Quinolone 결합부위 즉 QRDR의 아미노산이 바뀌면 quinolone과의 결합이 감소하게 되어 농농균이 quinolone에 내성을 나타내게 되는 것이다. 본 연구에서도 21주 중 10주가 *gyrA*에 변이를, 그리고 12주가 *parC*에 변이를 가지고 있는 것으로 나타났으며 이 중 9주는 *gyrA*와 *parC*에 모두 변이를 가지고 있었다. 두 유전자에 변이를 가지고 있는 9주 중 한 주(P18)를 제외한 8주는 ciprofloxacin에 고도내성을 보였다 (MIC >32 mg/L) (Table 4). 한편 본 연구에서는 *gyrA*의 Thr₈₃→Ile 변이와 *parC*의 Ser₈₇→Leu 변이가 압도적으로 많았는데 이 변이들은 QRDR에서 가장 빈번하게 나타나는 변이들로 알려져 있다[23]. Quinolone 내성과 관련한 연구에서 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV의 A subunit인 *gyrA*와 *parC*의 변이는 많이 연구되고 보고되어 있는 반면 B subunit인 *gyrB*와 *parE*의 변이에 대한 보고는 드물다. 본 연구에서도 *gyrB*와 *parD*에서는 변이가 발견되지 않았다.

대전의 한 대학병원에서 분리된 imipenem 내성 농농균은 항균제의 유출펌프 조절유전자 및 OprD 단백 유전자 등에 다양한 돌연변이를 가지고 있었다. 또한 quinolone 내성을 갖는데 중요한 역할을 하는 염색체상의 QRDR 변이를 가지고 있었다. 이상의 결과에서 농농균은 다양한 염색체상의 유전자 변이에 의해서도 carbapenem과 quinolone 등의 항균제에 대해 내성을 나타낼 수 있음이 확인되었다. 그러나 본 연구에서 염색체상의 유전자 변이나 carbapenemase가 확인되지 않은 균주도 상당수 포함되어 있었으므로 이들의 내성기전을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

- Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-704.
- 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.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:247-50.
- Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L, Riccio ML, Dubois V, Tonin EA, et al. Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:88-90.
- Pai H, Kim J, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:480-4.
- Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997;23:345-54.
- Sawada I, Maseda H, Nakae T, Uchiyama H, Nomura N. A quorum-sensing autoinducer enhances the *mexAB-oprM* efflux-pump expression without the MexR-mediated regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* 2004;48:435-9.
- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1633-41.
- Sobel ML, Neshat S, Poole K. Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2005;187:1246-53.
- Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1676-80.
- Sung JY, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Ko CS, Shin SY, et al. Characterization of class 1 integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J Clin Microbiol* 2009;12:17-23.
- Yoon WS, Lee BY, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Jeong TJ, et al. Prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates and mechanisms of resistance. *Korean J Clin Microbiol* 2005;8:26-33.
- Jalal S and Wretling B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 1998;4:257-61.
- Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol* 2008;131:164-72.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100-S10 (M2). Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006.
- Shannon KP and French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:818-25.
- Chung SY, Sung JY, Kwon KC, Park JW, Ko CS, Shin SY, et al. Characteristics of acquired beta-lactamase gene in clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J Clin Microbiol* 2008;11:98-106.
- Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1797-802.
- Ziha-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechère JC, Plésiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:287-91.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Yong D. Rapid increase of imipenem-hydrolyzing *Pseudomonas aeruginosa* in a Korean hospital. *Abstr E-85*, 38th ICAAC, 1998.
- Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y; Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003;9:868-71.
- Kim IS, Lee NY, Ki CS, Oh WS, Peck KR, Song JH. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo-beta-lactamase producers in a Korean

- hospital. Microb Drug Resist 2005;11:355-9.
23. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of

Pseudomonas aeruginosa isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2263-8.

=국문초록=

oprD, *gyrA* 및 *parC* 유전자에 변이를 갖는 Carbapenem 내성 녹농균

¹극동대학교 임상병리학과, ²충남대학교 의과대학 진단검사의학교실

성지연¹, 조혜현², 권계철², 구선희²

배경: Carbapenem 내성 녹농균의 확산은 이 균에 의한 감염증 치료에 많은 어려움을 준다. 본 연구에서는 녹농균의 carbapenem 내성기전을 분석하기 위해 *OprD* 및 유출펌프 조절유전자(*MexR*, *NalC*, *NalD*, *MexT* 및 *MexZ*)의 염색체상의 변이를 조사하였다. 아울러 quinolone 내성기전을 알아보기 위해 QRDR (quinolone resistance-determining region) 변이도 함께 조사하였다.

방법: Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR)을 이용하여 서로 다른 클론에 속하는 녹농균을 선별하였다. 총 21주가 서로 밴드 패턴을 보였으며 이 균주들을 대상으로 PCR과 DNA 염기서열분석을 통해 β -lactamase 유전자를 검출하였고 유출펌프 조절유전자, *oprD* 및 QRDR (*gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE*)의 변이를 확인하였다.

결과: 분리된 21주의 녹농균 중 한 주(P28)가 *bla*_{VIM-2}를 가지고 있었으며 2주가 *nalD* 또는 *mexZ*에 유출펌프의 과량발현을 유발할 수 있는 변이를 가지고 있었다. *OprD*의 소실을 유발할 수 있는 염색체상의 변이가 21주의 녹농균 중 4주에서 확인되었다. Imipenem 및 ciprofloxacin에 내성인 녹농균 10주 중 9주가 *gyrA*와/또는 *parC*에 변이를 가지고 있었다.

결론: Carbapenem 내성 녹농균은 유출펌프의 과량발현, *OprD* 단백질의 소실 및 carbapenemase 생성 등에 의해서 carbapenem에 내성을 나타낸다. 녹농균은 또한 *gyrA*와/또는 *parC*의 QRDR에 변이를 일으켜 quinolone에 내성을 나타낸다. [대한임상미생물학회지 2011;14:131-137]

교신저자 : 구선희, 301-721 대전시 중구 대사동 640
충남대학교병원 진단검사의학과
Tel: 042-280-7798, Fax: 042-257-5365
E-mail: shkoo@cnu.ac.kr