

*Mycoplasma pneumoniae*의 분리 및 항생제 감수성 검사(III)

장명웅* · 김광혁 · 박인달 · 송갑영¹ · 김성원 · 이은영² · 김문찬³ · 조명훈⁴ · 김규언⁵ · 최충언⁶

고신대학교 의과대학 미생물학교실, ¹위생병원 내과학교실, ²성분도병원 소아과, ³김문찬 소아과의원, ⁴연제 가정의학과의원, ⁵연세대학교 의과대학 소아과학교실, ⁶구호병원 내과, 외과, 소아과

Received February 16, 2005 / Accepted June 16, 2005

Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* and Antimicrobial Susceptibilities of the Isolates(III). Myung-Woong Chang*, Kwang-Hyuk Kim, In-Dal Park, Gap-Young Song¹, Sung-Won Kim, Eun-young Lee², Moon-Chan Kim³, Myung-Hoon Cho⁴, Kyu-Earn Kim⁵ and Choong-Eon Choi⁶. Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, ¹Department of Internal Medicine, Pusan Adventist Hospital, ²Department of Pediatrics, Pusan St. Benedict Hospital, ³Kim Moon-Chan Pediatrics, ⁴Yeonje Family Medicine, ⁵Department of Pediatrics, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University and ⁶Department of Pediatrics, Internal Medicine, Surgery, Gu-Ho Hospital – The 994 throat swabs obtained from 688 adults and 306 children patients with respiratory diseases were examined for *Mycoplasma pneumoniae* infection by culture method. Antimicrobial susceptibilities of the resulting 123 *M. pneumoniae* isolates were evaluated by testing minimum inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, minocycline, tetracycline, josamycin, sparfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin by a broth micro-dilution method. The erythromycin resistant strains of *M. pneumoniae* was determined above 1.0 µg/ml of MIC for erythromycin. The erythromycin resistant strains of *M. pneumoniae* was confirmed resistant gene mutation of the portions of genes 23S rRNA (domain II and V), and ribosomal protein L4 and L22 by PCR amplified and their nucleotide sequences were compared to those of the susceptible strain M129. The isolation rate of *M. pneumoniae* was 12.9% (89/688) for the adults and 11.1% (34/306) for the children. The MIC₉₀ of the *M. pneumoniae* isolates were 0.12 µg/ml for minocycline, 0.25 µg/ml for sparfloxacin, 0.5 µg/ml for ciprofloxacin, ofloxacin, and tetracycline, respectively, and 2.0 µg/ml for josamycin and erythromycin, respectively. The isolation rate of erythromycin resistant *M. pneumoniae* from patients was 49.4% (44/89) for the adults, 47.1% (16/34) for children, and 48.8% (60/123) for the total. No mutation could be detected in the ribosomal protein L22 region, but all strains were mutated in the ribosomal protein L4 as two point mutation M144V. Two point mutations in domain V of 23S rRNA were selected in the presence of erythromycin resistant *M. pneumoniae* isolates, such as one strain was G2057C mutant, two strains were A2059C mutants, three strains were C2611G mutants, four strains were A2058C mutants, five strains were A2058T mutants, twenty strains were A2059G mutants, and twenty-five strains were A2058G mutants, respectively. These results show that erythromycin was not the most active compound against *M. pneumoniae* infection in Korea and clinical studies of macrolides in human patients are demanded.

Key words – *Mycoplasma pneumoniae*, Antimicrobial susceptibility, Erythromycin Resistant Mutants

Mycoplasma pneumoniae (*M. pneumoniae*)는 소아나 청소년에서 여러 가지 호흡기 질환의 원인 균으로 이형폐렴이나 급성 기관지염을 일으키며, 호흡기뿐만 아니라 중추신경계에도 감염되어 전신적인 합병증을 일으킬 수 있는 중요한 병원성 균이다[4,12,14,24]. 이 균은 세포벽이 없는 세균이므로 세포벽의 합성을 저해하는 항생물질인 penicillins계의 약제에는 저항성이다. 그러므로 이 균에 의한 감염증의 치료에는 macrolides계 항생물질이나 minocycline이 일차 선택약제로 많이 이용되고 있다[1,2,5,13,19,26]. 그러나 최근에 외국에서는 erythromycin 등의 macrolides계 항생물질에 저항성인 *M. pneumoniae*가 보고 되고 있다[16,17,18,19]. Macrolides 계

항생물질은 23S rRNA의 domain V나 이와 인접한 domain II에 결합함으로써 단백질 합성을 저해한다[3,9,25]. Macrolides계 항생물질에 저항성인 세균의 저항성 획득기전으로는 항생물질이 세균 ribosome의 23S rRNA 분자에 부착 능력을 상실하기 때문이라고 하였으며[8,9,10,11,25], erythromycin 저항성 세균의 23S rRNA의 전사(transcription)후 변이나 23S rRNA의 염기 치환 등에 대한 보고는 많이 있다[10,16,27]. 일반적인 Macrolides계 항생물질에 저항성인 세균의 저항성 기전으로 약제의 불활성화, 능동적인 유출, methylation이나 변이에 의한 표적부위의 수식 등의 세 가지가 있다[11,25].

*Streptococcus pneumoniae*나 *Staphylococcus aureus*의 23S rRNA domain II나 V, 또는 ribosomal protein L4나 L22의 변이가 macrolides계 항생물질의 저항성에 관여하며 이에 관련된 rrn operon이 4개에서 6개 정도 있다고 보고되고 있다[6,17,

***Corresponding author**

Tel : +82-51-990-6421, Fax : +82-51-990-3081

E-mail : mchang@ns.kosinmed.or.kr

25]. *Mycoplasma*에서도 Gram 양성세균에서와 같은 23S rRNA copy를 한 개나 두개 가지고 있으며, 23S rRNA domain V의 peptidyltransferase 부위의 점 돌연변이에 의하여 macrolides에 내성을 가지게 된다고 보고되고 있다[19,20,21,22]. Lucier 등[16]은 *M. pneumoniae* M129-B16 균주를 시험관내에서 erythromycin에 노출시킨 후에 23S rRNA V domain의 2063, 2064 위치에 A→G 전환이 일어난 두 변이 균주를 분리하였다고 보고하였다. Okazaki 등[18]은 환자로부터 분리한 *M. pneumoniae* 중에서 clindamycin에 저항성인 균주에서 23S rRNA domain의 2063 위치에 A→G 전환이 일어난 변이주를 확인하였다고 보고하였다. 한편, 국내에서는 호흡기질환 환자의 가검물로부터 배양법으로 *M. pneumoniae*를 분리 동정하고, 이 균의 생물학적 특성이나 항생물질에 대한 저항성을 밝힌 보고는 거의 없는 실정이며, 국내에서 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae* 균주의 분리에 대한 보고는 없다[5]. 이에 본 연구에서는 국내에서 2002년 12월부터 2005년 2월까지 994명의 호흡기 질환 환자의 호흡기 도말물로부터 이 균의 분리율과 이 균의 항생물질에 대한 감수성의 정도를 밝히고, 국내에서 분리되는 *M. pneumoniae* 균주 중에서 erythromycin에 대한 MIC가 1 µg/µl 이상인 균주를 erythromycin에 저항성인 균주로 판정하고, 이 등 저항성 균주의 23S rRNA의 유전자 변이 유무를 밝힘으로써 앞으로 국내에서 이 균에 의한 감염증의 치료와 예방에 중요한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

Mycoplasma pneumoniae (ATCC 29342) 표준 균주를 대조균으로 사용하였다[5,6].

환자의 가검물 채취

서울의 종합병원 1곳과 부산시내에 있는 종합병원 3곳의 내과와 소아과 및 일차 진료기관인 소아과 의원과 가정의학과 의원 3곳에 내원하는 호흡기 질환자의 상기도로부터 가검물을 멸균된 면봉으로 채취하여 2 ml의 Chanock's glucose 배지내에 충분히 씻어 떨어뜨린 후 면봉은 바로 버리고 이것을 가검물 원액으로 하였다[5,6,7].

*M. pneumoniae*의 분리 배양 및 동정

상기의 가검물 원액 20 µl를 2 ml의 Chanock's glucose 배지가 들어있는 24 well plate에서 10^{-1} - 10^{-6} 까지 계단 희석하여 37°C에서 3주간 배양하였다. 배지의 색깔을 매일 확인하여, 배지의 색깔이 투명하고, 적색에서 황색으로 변하였으면 *M. pneumoniae*가 증식된 것으로 추정하고, 색깔이 변한 최대희석배수의 역지수를 색깔변화단위(color change unit: CCU)로 하였다. *M. pneumoniae*가 배양된 것으로 추정된 균액을 다시 24 well plate에서 10^{-1} - 10^{-6} 까지 계단 희석하고, 각각의 희석액을 10 µl 취하여 Chanock's glucose 한천배지에 접종하여

가습상자에 넣어 37°C에서 3주간 배양하면서 집락의 형성 유무를 현미경(100x)으로 확인 하였다. 형성된 집락은 닭 적혈구흡착시험 양성이고, arginine 이용 시험 음성이고, *M. pneumoniae* 항혈청에 대한 대사저지시험 양성인 것을 *M. pneumoniae*로 동정하였다[5,7,24].

분리된 *M. pneumoniae*의 항생물질에 대한 감수성

호흡기 질환 환자로부터 분리 동정된 *M. pneumoniae* 60 균주를 10 ml의 Chanock's glucose 배지에 3일간 배양하여 균수가 10^6 cfu/ml되도록 조정한 후에 각 항생물질이 함유된 2.0 ml의 배지에 각각 20 µl씩 접종하여 3주간 균의 증식 유무를 확인하였다. 항생물질은 erythromycin (Sigma, USA), tetracycline (Sigma, USA), minocycline (Cheil Food & Chem. Co., Seoul), sparfloxacin (Cheil Food & Chem. Co., Seoul), ofloxacin (Cheil Food & Chem. Co., Seoul), ciprofloxacin (Cheil Food & Chem. Co., Seoul), josamycin (Yamanouchi Pharm. Co., Tokyo)를 사용하였으며, 각 항생물질은 최고 농도가 32 µg/ml되도록 녹인 후에 각 배지에는 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015 µg/ml되도록 첨가하였다. 각 항생물질의 최저발육저지농도(MIC)와 최저살균농도(MBC)의 판정은 항생물질이 들어있지 않는 대조군 계열에서 균이 증식한 시기(접종 4~7일후)에 각 항생물질이 함유된 계열에서 증식이 억제되는 최저농도를 MIC로, 접종 3주후 균의 증식이 억제된 최저농도를 MBC로 판정하였다[1,5,6,26].

PCR 법에 의한 erythromycin 저항성 변이 균주의 확인

Erythromycin 1.0 µg/ml 이상의 농도에 저항성 균주들을 각각의 MIC농도의 배지 5 ml에 배양한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심한 다음 인산완충액(PBS)으로 2번 세척하였다. 침사의 최종부피를 50 µl로 조정하여 110°C에서 10분간 가열한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 그 상층액을 PCR 반응에 사용하였다. 추출한 DNA 용액에 Taq polymerase (TaKaRa Taq, Japan)와 10X PCR buffer, deoxynucleotide triphosphates, 1.5 mM MgCl₂를 첨가하고, 해당 primer를 각각 가한 후에 MiniCycler (MJ Research, U.S.A)에서 반응시켰다(Table 1 참조). 먼저 94°C 10분간 전 처리한 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 시간으로 30회 반복 반응시키고 마지막에 72°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 이 산물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide에서 염색하여 결과를 관찰하였다. 각 primer 부위 PCR 산물의 유전자 염기서열을 분석하여 erythromycin에 감수성인 *M. pneumoniae* M129균주와 비교 분석하여 돌연변이 부위를 확인하였다[9,16,18,19].

결 과

M. pneumoniae 균주 분리

2002년 12월부터 2005년 2월 현재까지 부산 A병원에 내원

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer target and designation	Primer sequence(5'-3')	position
23S rRNA domain II		
Mp23S II-F	CGTGGCGTTTGAAGTATGAG	560 ^a
Mp23S II-R	TGGCGCCATCATACATTTCAG	886 ^a
23S rRNA domain V		
MP23S V-F	TAACTATAACGGTCCTAAGG	1911 ^a
Mp23S V-R	ACACTTAGATGCTTTCAGCG	2762 ^a
Ribosomal protein L4		
MPL4-F	GAACCAGTGAACTAAGCCC	46 ^b
MPL4-R	TTTGTCCAAGAGCTTGGCAC	465 ^b
Ribosomal protein L22		
MPL22-F	CCGTGTGAGAATCTCACCCC	99 ^b
MPL22-R	CTGCTTTTGACGTGCCA	502 ^b

^a*E. coli* numbering, ^b*M. pneumoniae* numbering

한 성인환자 450명의 호흡기 도말물로부터 *M. pneumoniae*의 분리율은 79명(17.6%)이었으며, Y병원에 내원한 성인환자 99명에서는 7명(7.1%)이었으며, G병원의 49명의 환자에서는 3 (6.1%)이었으며, K병원 57명과 H병원 33명에서는 균이 분리되지 않았다. 성인환자 688명 중 89명(12.9%)에서 균이 분리되었다. S병원에 내원한 소아환자 161명의 가검물중에서 34명(21.1%)에서 *M. pneumoniae*가 분리되었으나, K병원의 97명, Ys병원 48명중에서는 균이 분리되지 않았다. 소아환자 306명 중에서 34명(11.1%)에서 균이 분리되었다. 본 연구에서 총 994명 중에서 123명(12.4%)에서 *M. pneumoniae* 균주가 분리되었다(Table 2).

분리된 *M. pneumoniae*균주의 항생물질 감수성 검사

환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 균주의 erythromycin, josamycin, tetracycline, minocycline, sparfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin에 대한 감수성검사를 시험관 희석법으로 실시한 결과는 Table 3과 같다.

호흡기 환자의 상기도로부터 분리된 123균주의 *M. pneumoniae* 중에서 계대배양이 가능하였던 116균주의 ciprofloxacin에 대한 MIC 범위는 0.25~0.5 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 0.5 µg/ml 이었다. Ofloxacin에 대한 MIC 범위는 0.25~0.5 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 0.5 µg/ml 이었다. Minocycline에 대한 MIC 범위는 0.015~0.25 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 0.12 µg/ml 이었다. Tetracycline에 대한 MIC 범위는 0.06~0.5 µg/ml

g/ml이었으며, MIC₉₀은 0.5 µg/ml 이었다. Sparfloxacin에 대한 MIC 범위는 0.06~0.5 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 0.25 µg/ml 이었다. josamycin과 erythromycin에 대한 MIC 범위는 0.15~8.0 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 2.0 µg/ml 이었다.

Erythromycin에 저항성 균주의 확인

환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 erythromycin이 1.0 µg/ml 이상의 농도에서 증식되는 균주를 erythromycin에 대한 저항성균주로 선별하였으며, 그 결과는 Table 4와 같다.

환자에서 분리된 erythromycin 저항성 *M. pneumoniae* 균주의 분포를 보면 1 µg/ml에 저항성인 균주가 성인에서 11균주(25.0%), 소아에서 4균주(25.0%)였으며, 2 µg/ml에 저

Table 2. Isolation of *M. pneumoniae* from the throat swabs of the patients with respiratory diseases from December of 2002 to February of 2005.

Age	Hospital	cases	Culture positive (%)
Adult	Adventist	450	79 (17.6)
	Yeonje	99	7 (7.1)
	Guho	49	3 (6.1)
	Kosin	57	0 (0)
	Hansol	33	0 (0)
	Subtotal	688	89 (12.9)
Children	St. Benedict	161	34 (21.1)
	Kim's	97	0 (0)
	Yonsei	48	0 (0)
	Subtotal	306	34 (11.1)
Total	994	123 (12.4)	

Table 3. Comparison of the in vitro activity of the antimicrobial agents against 123 strains of *M. pneumoniae* isolates

Antibiotis	MIC (µg/ml)		
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ciprofloxacin	0.25~0.5	0.25	0.5
Ofloxacin	0.25~0.5	0.25	0.5
Minocycline	0.015~0.25	0.12	0.12
Tetracycline	0.06~0.5	0.25	0.5
Sparfloxacin	0.06~0.5	0.25	0.25
Josamycin	0.015~8.0	0.12	2.0
Erythromycin	0.015~8.0	0.015	2.0

Table 4. Erythromycin resistant *M. pneumoniae* isolated from patients with respiratory diseases compared with adult and children

Patients	MIC (µg/ml)				
	1	2	4	8	Total
Adults	11/44 (25.0)	9/44 (20.5)	11/44 (25.0)	13/44 (29.6)	44/89 (49.4)
Children	4/16 (25.0)	1/16 (6.3)	6/16 (37.5)	5/16 (31.3)	16/34 (47.1)
Total	15/60 (25.0)	10/60 (16.7)	17/60 (28.3)	18/60 (30.0)	60/123 (48.8)

항성인 균주가 성인에서 9균주(20.5%), 소아에서 1 균주(6.3%)였으며, 4 µg/ml에 저항성인 균주가 성인에서 11균주(25.0%), 소아에서 6균주(37.5%)였으며, 8 µg/ml에 저항성인 균주가 성인에서 13균주(29.6%), 소아에서 5균주(31.3%)였으며, 총 분리균주 123주 중에서 60균주(48.8%)가 erythromycin 저항성 균주이었다.

Erythromycin 저항성 *M. pneumoniae*의 염기서열 분석

Erythromycin의 저항성에 관여하는 유전자인 23S rRNA domain II, V과 ribosomal protein L4, L22 부분을 PCR로 확인한 후 각각의 PCR 산물의 염기서열을 분석하여 erythromycin에 감수성인 *M. pneumoniae* 129 균주의 염기서열과 비교한 결과는 Table 5와 Fig. 1과 같다.

Erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae* 60균주 중에서 23S rRNA domain V의 G2057C 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 1주(1.7%) 이었으며, A2059C 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 2주(3.3%) 이었으며, C2611G 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 3주(5.0%) 이었으며, A2058C 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 4주(6.7%) 이었으며, A2059G 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 20주(33.3%) 이었으며, A2058G 부위에 돌연변이가 일어난 균주가 25 (41.7%) 이었다. Erythromycin 저항성인 *M. pneumoniae* 60균주 중에서 23S rRNA domain II 부위에 돌연변이가 일어난 균주는 2 주(3.3%) 이었으며, 한 균주는 T742C 부위에, 다른 한 균주는 T799C 부위에서 thymine이 cytosine으로 돌연변이가 일어났음을 알 수 있었다. Erythromycin에 저항성 *M. pneumoniae* 60균주는 모두가 ribosomal protein L4 영역에서 methionine이 valine으

Table 5. Detection of erythromycin resistant mutants gene on the *M. pneumoniae* 123 isolates by PCR and sequencing of the gene

Region	Nucleotide and amino acid changes			
	Domain of 23S rRNA		Ribosomal protein	
	II	V	L4	L22
A2058G		25 (20.3%)		
A2059G		20 (16.3%)		
A2058T		5 (4.1%)		
A2058C		4 (3.3%)		
C2611G		3 (2.4%)		
A2059C		2 (1.6%)		
G2057C		1 (0.8%)		
T742C	1 (0.8%)			
T799C	1 (0.8%)			
M144V			123	
Changed	2 (1.6%)	60 (48.8%)	123	0
Unchanged	121 (98.4%)	63 (51.2%)	0	123
Total	123 (100%)	123 (100%)	123	123

A: adenine, C: cytosine, G: guanine, T thymine, M: methionine, V: valine

로 돌연변이가 일어났으나, ribosomal protein L22영역에서는 돌연변이가 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 erythromycin에 저항성인 균주로 확인된 60 균주 모두가 ribosomal protein L4 영역과 23S rRNA domain V에 내성변이가 일어났으며, 이 중에서 2균주는 23S rRNA domain II에 변이가 일어난 erythromycin 저항성 균주임이 확인 되었다. 따라서 본 연구에서 지금까지 분리된 *M.*

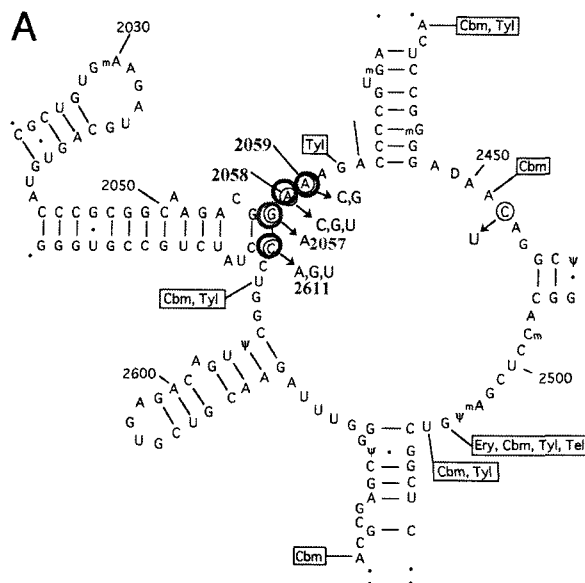


Fig. 1. 23S rRNA mutation to erythromycin resistant *M. pneumoniae* isolates in Korea.

pneumoniae 균주의 48.8%가 erythromycin에 저항성 균주라는 것을 알 수 있었다.

고 찰

호흡기 질환 환자의 상기도 가검물로부터 배양법에 의한 *M. pneumoniae*의 분리율은 본 연구에서는 성인에서 12.9%, 소아에서 11.1%였으며, 이는 국내에서 Chang 등[5]이 소아 폐렴환자에서 12%와는 유사한 성적이었으나 소아와 성인의 호흡기 질환자에서 각각 6.5%, 8.0% 라는 보고보다는 높은 분리율이었으나, Chang 등[6]은 성인 호흡기 질환자에서 29.3%, 소아 환자에서 14%의 분리율 보다는 낮은 분리율이었다. 외국에서는 Tully 등[24]은 5~46%, Dular 등[9] 14.2~45.9% 라고 하여 보고자에 따라 차이가 많음을 알 수 있다. 이는 가검물의 채취 및 처리 방법, 배지의 종류나 배양 조건 등에 따라 차이가 있을 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 호흡기 질환 환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 균주의 tetracycline에 대한 MIC 범위는 0.06~0.5 µg/ml로 tetracycline에 저항성 균은 분리되지 않았다. 이는 Chang 등[6]의 보고와 Waites 등[26]의 보고와 유사하게 tetracycline에 저항성 균은 없었으나, Chang 등[5]의 보고에서 분리균의 6%, Kenny 등[15]은 분리균의 10% 정도가 tetracycline에 저항성이었다는 보고와는 차이가 있었다. 이는 분리 시기와 국가에 따라 차이가 있을 수 있으며, 국내에서도 년도별로 차이가 있는 것은 아마도 최근에 임상에서 tetracycline의 사용이 감소되었기 때문으로 생각된다. Ciprofloxacin에 대한 MIC 범위는 0.25~0.5 µg/ml 이었으며, 이는 Chang 등[6]의 분리균주의 63.3%, Chang 등[5]의 보고에서 분리균주의 42%가 저항성 균주였다는 보고와는 매우 다른 결과였다. Ofloxacin에 대한 MIC 범위는 0.25~0.5 µg/ml이었으며, 이는 Chang 등[5]의 보고에서 분리균주의 30%가 저항성 균주였다는 보고와는 차이가 많으나, Chang 등[6]의 분리균주에서는 ofloxacin에 대한 저항성균이 없었다는 보고와는 같은 경향이었다. 이러한 차이점의 원인은 추후 규명해 보아야 할 것으로 생각된다. Minocycline에 대한 MIC 범위는 0.015~0.25 µg/ml이었으나, Arai 등[1]과 Suyama 등[23]의 MIC₉₀은 0.5 µg/ml 보다 낮았으며, 장 등[6]의 보고에서와 같이 저항성 균주는 없었다. Sparfloxacin에 대한 MIC 범위는 0.06~0.5 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 0.5 µg/ml로 Kaku 등[13]의 0.063 µg/ml, Kenny 등[15]의 0.25 µg/ml Chang[6] 등의 0.06 µg/ml, Chang 등[5]의 0.195 µg/ml보다 높았으나 저항성 균은 없었다. Josamycin에 대한 MIC 범위는 0.15~8.0 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 2.0 µg/ml로 Chang 등[5]은 분리 균주 모두가 josamycin에 감수성이었다는 보고와 Chang 등[6]의 분리균주 모두가 감수성이었다는 보고와는 차이가 많았으며, 이와 같은 차이는 균의 분리 시기와 사용된 항생물질의 종류와 제

조회사에 따라 차이가 있을 수 있으나, 국내 분리 균의 차이점에 대하여는 앞으로 추시하여 보아야 할 필요가 있다고 생각된다. Erythromycin에 대한 MIC 범위는 0.15~8.0 µg/ml이었으며, MIC₉₀은 2.0 µg/ml로 Chang 등[5]은 분리 균주 모두가 erythromycin에 감수성이었다는 보고는 차이가 많았으며, 이는 국내에서 1995년 까지는 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae*가 분리되지 않았으며, Matsuoka[17] 등의 보고에 의하면 일본에서도 1998년도 분리 균주에서는 erythromycin 저항성 *M. pneumoniae*가 없었다고 보고한 것과 같은 경향이었다. Waites 등[26]의 MIC 0.008 µg/ml, Pereyre 등[19]의 MIC 1.0 µg/ml, Yamaguchi 등[28]의 MIC 0.025 µg/ml 보다는 월등히 높았으나, Matsuoka 등[17]의 erythromycin 저항성균의 MIC 256 µg/ml 보다는 낮았다. 본 연구에서 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae* 균주의 분리율이 48.8%로 일본의 Matsuoka[17] 등의 20% 보다 현저히 높으며, 이는 국내에서 erythromycin의 사용빈도가 많은 결과라고 생각된다. 국내에서 분리된 erythromycin 저항성 *M. pneumoniae* 균주들은 23S rRNA domain V의 A2058G (*E. coli* numberingis) 변이주가 20.3%로 가장 많았으며, A2059G (*E. coli* 숫자) 변이주가 16.3%, A2058T 변이주가 41%, A2058C 변이주가 3.3%, C2611G 변이주가 2.4%, A2059C 변이주가 1.6%, G2057C 변이주가 0.8%이었다. 이는 Matsuoka[17] 등의 10/13 (77%)균주가 A2063G 변이주였으며, 1/13 (7.7%)균주가 A2064G, 1/13 (7.7%)균주가 A2063C, 1/13 (7.7%)균주가 A2617G 변이주였다는 보고와도 차이가 많았으며, 이는 사회환경적인 차이가 있을 수 있는 것으로 생각된다. Pereyre 등[20]은 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae* 균주에서 23S rRNA domain V에서 C2611A, A2062G 변이균주를 확인하였다는 보고나, Okazaki 등[18]의 erythromycin 저항성 균주의 23S rRNA domain V에서 A2063G (*E. coli* 숫자로는 A2058G와 같음), A2064G (*E. coli* 숫자로는 A2059G와 같음), A2064C 변이주를 확인하였다는 보고나, Lucier 등[16]은 erythromycin 저항성 균주에서 A2063G, A2064G 변이균주를 확인하였다는 보고와 유사하였다. 그러나 국내 분리균주에서 *M. pneumoniae*에서는 아직까지 보고되지 않은 변이균주도 있었다. 따라서 국내에서 분리된 *M. pneumoniae* 균주는 erythromycin에 저항성 균주가 많으므로 앞으로 이들 균에 의한 폐렴환자의 치료에 erythromycin을 사용하는 것은 고려되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

2002년 2월부터 2005년 2월까지 성인 및 소아 호흡기 질환자 994명의 상기도 도말물에서 *M. pneumoniae* 균주를 분리하고, 분리 균주의 ciprofloxacin, ofloxacin, minocycline, tetracycline, sparfloxacin, josamycin, erythromycin에 대한

감수성 검사를 실시하였으며, 분리된 균주의 23S rRNA domain II와 V에서 erythromycin 저항성 변이가 일어났는가를 PCR과 유전자 염기서열분석으로 erythromycin에 감수성인 *M. pneumoniae* 균주의 염기서열과 비교분석하여 확인하였다. 호흡기질환자에서 *M. pneumoniae*의 분리율은 123/994 (12.4%)이었으며, 분리된 *M. pneumoniae* 균주의 minocycline, sparfloxacin, tetracycline, ciprofloxacin, ofloxacin, josamycin, erythromycin MIC 범위는 각각 0.015~0.25, 0.06~0.5, 0.06~0.5, 0.25~0.5, 0.25~0.5, 0.015~8.0, 0.015~8.0 µg/ml이었다. 분리 동정된 *M. pneumoniae* 균주 중에서 erythromycin에 저항성인 균주가 60주(48.8%)였으며, 모두가 ribosomal protein L4 영역과 23S rRNA domain V에 내성변이가 일어났으며, 이 중 2균주는 23S rRNA domain II에도 변이가 일어난 균주도 있었다. 국내에서 분리되는 *M. pneumoniae* 균주의 48%가 erythromycin에 저항성인 균주이므로 앞으로 이 균에 의한 폐렴의 치료에 주의가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ10-PG6-01GM03-0002)

참고 문헌

1. Arai S., Gohara Y., Kuwano K., Kawashima T. 1992. Antimycoplasmal activities of new quinolones, tetracyclines, and macrolides against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* **36**, 1322-1324.
2. Arai S., Tokitsu Y. 1995. Antimycoplasmacidal activity of new quinolones in vitro and in vivo. *Jap J Mycoplasmol.* **21**, 37-38.
3. Ban N.P., Hansen N.J., Moore P.B., Steitz T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
4. Cassell G.H., Clyde W.A., and Davis J.K. 1985. Mycoplasmal respiratory infections. In *The Mycoplasmas* Vol. IV, Razin S and Barile MF (Ed), Academic Press, New York, pp65-106.
5. Chang M.W., Kim K.H., Park I.D., Joh M.H. 1995. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*의 in clinical specimens of patients by PCR and culture method. *J Korean Soc. Microbiol.* **30**, 517-525.
6. Chang M.W., Kim K.H., Park I.D., Kang K.H., Kong E.H., et al. 2003. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* and antimicrobial susceptibilities of the *M. pneumoniae* isolates. *J Bacteriol Virol.* **33**, 183-191.
7. Daxboeck F., Krause R., Wensich C. 2003. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect.* **9(4)**, 263-273.
8. Douthwaite S., Hansen L.H., Mauvis P. 2000. Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* **36**, 183-192.
9. Dular R., Kajioka R., Kasatiya S. 1988. Comparison of gene-probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *L Clin Microbiol.* **26**, 1068-1069.
10. Furneri P.M., Rappazzo G., Musumarra M.P., Dipietro P., Catania L.S., Roccasalva L.S. 2001. Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2958-2960.
11. Hansen L.H., Mauvais P., Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domain II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol. Microbiol.* **31**, 623-631.
12. Jacobs E. 1993. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections; a critical review of current procedures. *Clin Infect Dis.* **17(Suppl. 1)**, S79-S82.
13. Kaku M., Ishida K., Irifune K., Mizukane R., Takemura H., Yoshida R., et al: 1994. In vitro activities of sparfloxacin against *M. pneumoniae*. *Antimicrobil Agents Chemother.* **38**, 738-741.
14. Kang K.S., Woo H.O. 2003. Pattern of occurrence of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in admitted children: Southern central Korea, from 1989 to 2002. *J Korean Pediatr Soc* **46**, 474-479.
15. Kenny G.E., Cartwright F.D. 1994. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to new glycytyclines in comparison with those to older tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**, 2628-2632.
16. Lucier T.S., Heitzman K., Liu S.K., Hu P.C. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *M. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2770-2773.
17. Matsuoka M., Narita M., Okazki N., Ohya H., Yamazaki T., et al: 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *M. pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4624-4630.
18. Okazaki N., Narita M., Yamada S., Izumikawa K., Umetsu M., Kenri T., Sasaki Y., Arakawa Y., Sasaki T. 2001. Characteristics of macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol. Immunol.* **45**, 617-620.
19. Pereyre S., Gonzalez P., de Barbeyrac B., Darnige A., Renaudin H., Charron A., Raherison S., Bebear C.M. 2002. Mutation in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *M. hominis* and *M. fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3142-3150.
20. Pereyre S., Guyot C., Renaudin H., Charron A., Bebear C., Bebear C.M. 2004. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *M. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 460-465.
21. Prunier A.L., Malbrunny B., Tande D., Picard B., Leclercq R. 2002. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides.

- Antimicrob. Agents Chemother. **46**, 3054-3065.
22. Schulzhen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albercht R., Yonath A, Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.
 23. Suyama N., Ishida K., Kaku M., Izumikawa K., Hara K. 1995. Therapeutic activities of macrolides against *M. pneumoniae* infection. *Jap J Mycoplasmol.* **21**, 39-40.
 24. Tully J.G., Rose D.L. 1979. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *J Infect Dis.* **139**, 478-482.
 25. Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitution in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1-12.
 26. Waites KB, Duffy LB, Schmid T, Carb D, Pate MS, Cassell GH: 1991. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* to sparfloxacin and PD 127391. *Antimicrobial Agents Chemother.* **35**, 1181-1185.
 27. Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577-585.
 28. Yamaguchi T., Hirakata Y., Izumikawa K., Miyazaki Y., Maesaki S., et al: 2000. In vitro activity of telithromycin (HMR3647), a new ketolide, against clinical isolates of *M. pneumoniae* in Japan. *Antimicrob. Agents chemother.* **44**, 1381-1382.