

호흡기질환 환자로부터 분리된 *Mycoplasma pneumoniae*의 tetracycline과 erythromycin에 대한 저항성 변이

장명웅* · 박인달 · 김광혁 · 송갑영¹ · 김성원²

고신대학교 의과대학 미생물학교실, ¹부산 위생병원 내과, ²부산 성분도병원 소아과

Received September 15, 2005 / Accepted November 8, 2005

Tetracycline and Erythromycin Resistant Mutants of the *Mycoplasma pneumoniae* Isolated from Patients with Respiratory Diseases. Myung-Woong Chang*, In-Dal Park, Kwang-Hyuk Kim, Gap-Young Song¹ and Sung-Won Kim². Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, ¹Department of Internal Medicine, Busan Adventist Hospital, and ²Department of Pediatrics, Busan St. Benedict Hospital, Busan, Korea – One hundred and twenty three strains of *Mycoplasma pneumoniae* were isolated from patients with respiratory diseases from February 2002 to April 2005 in Busan, Korea. The MICs of tetracycline and erythromycin up to 90% of the 123 *M. pneumoniae* isolates tested were 0.5~1.0, and 0.5~512 µg/ml, respectively. Plasmid DNA was not isolated from all of the *M. pneumoniae* isolates. Out of 123 strains of *M. pneumoniae*, 57 (46.3%) strains contain *tetM* gene on their chromosomal DNA, and 60 (48.8%) strains were mutated in domain V of 23S rRNA for erythromycin resistance. Out of 63 strains of *M. pneumoniae* which were not mutated in domain V of 23S rRNA for erythromycin resistance, 36 (57.1%) strains contained *tetM* gene, and out of 60 strains of *M. pneumoniae* which were mutated in domain V of 23S rRNA for erythromycin resistance, 21 (35.0%) strains contained *tetM* gene. These results suggest that the isolation rate of erythromycin and tetracycline resistant *M. pneumoniae* is higher than those of other countries, and erythromycin and tetracycline are not first choice drug for *M. pneumoniae* infection in Korea, and it need confirm by a nationwide surveillance of antimicrobial resistance.

Key words – *M. pneumoniae*, *tetM* gene, erythromycin resistant mutants

*Mycoplasma pneumoniae*는 소아나 노약자에서 폐렴(마이코플라스마폐렴)을 일으키는 병원성 균으로 세포벽이 없으므로 penicillin 계의 항생물질에는 저항성을 보이지만 tetracycline이나 macrolides 또는 aminoglycoside계 항생물질에는 감수성을 나타낸다[4,9,25,27]. 따라서 마이코플라스마폐렴의 치료에는 tetracycline이나 macrolides계 항생물질이 일반적으로 사용되어져왔다[2,5,25,42,43,46]. 그러나 tetracycline계 항생제는 소아 특히 신생아나 유아에서는 설사, 골의 발육장애, 황치 등의 부작용이 있다는 문제점과[26], 1974년 tetracycline에 저항성인 마이코플라스마가 보고된[17] 이후, 이 약제에 저항성인 균주의 분리 빈도가 증가 되면서 erythromycin, clarithromycin 등의 macrolides 계나 lincomycin 이 일반적으로 사용되게 되었다[14,24,25,33,34]. 또한 최근에 외국에서는 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae*가 보고되고 있다[19,20,31,33,34,40,43]. Erythromycin 저항성 세균은 23S rRNA의 전사(transcription)후 23S rRNA의 염기 치환이나 리보솜의 수식에 의해 항생물질이 세균 ribosome의 23S rRNA 분자에 부착 능력을 상실하기 때문에 Macrolides계 항생물질에 저항성인 세균이 된다고 보고 되고 있다[15,19,

20,42,45,47]. Lucier 등[31]은 *M. pneumoniae* M129-B16 균주를 시험관내에서 erythromycin에 노출시킨 후에 23S rRNA V domain의 2063, 2064 위치에 각각 A→G 전환이 일어난 두 변이 균주를 분리하였다고 보고하였다. Okazaki 등[34]은 환자로부터 분리한 *M. pneumoniae* 중에서 clindamycin에 저항성인 균주에서 23S rRNA V domain의 2063 위치에 A→G 전환이 일어난 변이주를 확인하였다고 보고하였다. 장 등[12]도 국내에서 분리한 *M. pneumoniae* 균주의 23S rRNA domain V의 2063위치에 A→G, A→T, A→C 변이를 일으킨 erythromycin에 저항성 변이를 일으킨 균주를 분리하였다고 보고하였다.

세균에서 tetracycline에 저항성 균주가 처음으로 보고 된 것은 *Streptococcus*이며, tetracycline의 저항성 획득에 관여하는 유전자가 발견되었다[7,8]. 그 후 균종에 따라 tetracycline 저항성에 관여하는 유전자가 다르며, 세균에서 tetracycline 저항성에 관여하는 유전자로는 *tetA-G*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetN*, *tetO*, *tetP*, *tetS* 등이 알려졌다[18,28-30,35,38,44]. 이 중 에서 마이코플라스마의 tetracycline 저항성에 관여하는 유전자는 *tetM*이라고 보고 되었다[6,39]. 지금까지 *tetM* 유전자를 가지고 있는 균종으로는 *E. coli*, *Enterococcus faecalis* 등을 포함하는 다수의 균종이 알려져 있다[29,30]. 국내에서는 1991년에 박 등[35]이 환자로부터 분리된 *M. hominis*와 *Ureaplasma*

***Corresponding author**

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

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

urealyticum 중에서 tetracycline에 저항성인 균주는 tetM 유전자를 가지고 있음을 보고하였으며, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *E. agglomerans*, *K. pneumoniae* 등의 균종에서는 tetM 유전자가 염색체 DNA가 아닌 plasmid DNA에 존재하지만, *M. hominis*와 *U. urealyticum*에서는 plasmid DNA가 아닌 염색체 DNA에 존재한다고 보고하였다. 일반 세균에서는 항생제에 대한 저항성 유전자가 plasmid DNA에 많이 존재하고 있으나, 마이코플라스마는 균종에 따라 plasmid DNA는 존재하지만 항생제 저항성 유전자와의 관련성은 불확실하며, 일부 균종에서 저항성 유전자가 염색체 DNA에 있는 것으로 알려져 있다[35]. 마이코플라스마 중에서는 *M. arthritis*, *A. laidlawii*, *M. hominis*, *S. citri* 등에서 plasmid DNA가 존재한다고 알려져 있지만, 항생제 저항성 유전자와의 관련성은 보고되지 않았다[3,13,16,21,33]. 또한 *M. pneumoniae*에서는 plasmid DNA의 존재가 확인되지 않았으며, tetM 유전자의 존재에 대하여도 보고 되지 않고 있다.

본 연구에서는 호흡기 질환 환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 균주가 plasmid DNA를 가지고 있는지의 유무와 plasmid를 가지고 있다면, tetM 유전자가 plasmid DNA 또는 염색체 DNA에 있는지의 유무를 밝히고, 같은 균주에서 tetracycline과 erythromycin에 동시에 저항성을 나타내는 균주의 빈도를 밝힘으로써 *M. pneumoniae* 감염의 치료에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 *M. pneumoniae* (ATCC 29342)를 표준 균주로 사용하였으며, 2002년부터 2005년까지 부산시내 소재 종합병원의 호흡기질환 환자로부터 분리 동정한 *M. pneumoniae* 123 균주를 본 연구에 사용하였다[10-12].

분리된 *M. pneumoniae*의 항생물질에 대한 감수성

호흡기 질환 환자로부터 분리 동정된 *M. pneumoniae* 123 균주를 10 ml의 Chanock's glucose 배지에 3일간 배양하여 균수가 10^6 CCU(color change unit)/ml 되도록 조정된 균액 20 μ l씩을 각 농도의 항생물질이 함유된 배지 2.0 ml에 각각 접종하여 3주간 균의 증식 유무를 육안으로 확인하였다. 항생물질은 erythromycin (Sigma, USA), tetracycline (Sigma, USA)를 사용하였으며, 각 항생물질은 최고 농도가 1,024 μ g/ml 되도록 녹인 후에 2배 희석법으로 희석하여 각 배지에는 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 μ g/ml 되도록 첨가하였다. 각 항생물질의 최저발육저지농도(MIC)의 판정은 항생물질이 들어있지 않는 대조군 계열에서 균이 증식한 시기(접종 4-7일후)에 각 항생물질이 함유된 계열에서 증식이 억제되는 최저농도를 MIC로 판정하였다[11,12].

M. pneumoniae 균주에서 plasmid 유전자의 유무 확인 방법

국내에서 분리된 *M. pneumoniae* 가 약제 저항성과 관련된 plasmid 유전자를 가지고 있는지를 확인하고자 Harasawa 등[21]의 방법을 사용하여 plasmid 유전자의 분리를 시도하였다. *M. pneumoniae*를 300 ml의 Chanock's glucose배지에서 증균 배양시킨 후 18,000 rpm으로 30분간 원심하여 수집된 균을 Tris buffer (50 mM Tris.HCl, pH 8.0, 10 mM ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), pH 8.0) 현탁하였다. 여기에 1%(w/v) sodium dodecylsulfate (SDS)가 함유된 Tris buffer pH 8.0를 0.5 ml 첨가하고, 56°C로 30초 동안 8번 열자극을 하였다. 그 후 2 M Tris, pH 7.0을 30 μ l 첨가하고, RNase A를 최종 농도가 50 mg/ml 되게 가하여 37°C에서 30분간 반응하였다. Phenol과 chloroform (1:1)용액을 같은 양 첨가하여 잘 섞은 후 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층 부분을 다른 microfuge tube로 옮기고, 1/10 부피의 3 M sodium acetate, pH 5.2와 2배 부피의 95% ethanol을 첨가하여 -70°C에서 30분간 방치하였다. 95% ethanol 층을 조심스럽게 제거하고, 70% ethanol로 조심스럽게 세척한 후에 건조시켰다. 여기에 TE buffer (pH 8.0)을 50 ml 가하여 agarose gel에 영동하여 plasmid의 유무를 관찰하였다[35].

M. pneumoniae 균주에서 염색체 DNA의 분리 방법

국내에서 분리된 *M. pneumoniae*의 염색체 DNA의 분리는 Hempstead의 [22]의 방법으로 분리하였다. 환자로부터 분리된 각 *M. pneumoniae* 균주를 300 ml의 Chanock's glucose배지에서 증균 배양시킨 후 18,000 rpm으로 30 분간 원심하여 균을 수집하고, wash solution (0.25 M NaCl; 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0; 10 mM MgSO_4)으로 3회 세척한 후 1/2 부피의 고농도 TE buffer (50mM Tris.HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA)로 2회 세척하였다. 소량의 TE buffer에 잘 현탁하여 microfuge tube로 옮기고, 12,000 rpm에서 1 분간 원심 분리한 다음, 100 μ l의 고농도 TE buffer에 다시 잘 현탁하여 -20°C에서 1 시간 방치하였다. 55°C에서 신속하게 녹인 후 1% SDS가 함유된 TEE buffer (50 mM Tris.HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 2 mM EGTA) 1 ml를 첨가하였다. 11 μ l의 proteinase K (10 mg/ml in 0.1% SDS, 10 mM Tris.HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 가하여 55°C에서 15 분간 반응시킨 후 RNase (5 mg/ml)를 11 μ l가하여 37°C에서 1시간 동안 반응 시켰다. 여기에 5 M potassium acetate 100 μ l를 가하고 얼음 속에서 30 분간 방치한 후 10 분 동안 원심하여 chloroform-isoamylalcohol (24:1)을 동량 가하고 15 분간 실온에 방치한 후 1 분간 원심하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 1/10 부피의 3 M sodium acetate (pH 4.8)와 2배 부피의 95% ethanol을 가하여 12,000 rpm에서 5 분간 원심하고, 70% ethanol로 세척한 후 잘 건조시켜 450 μ l의 TE에 녹이고 50 μ l의 3 M so-

dium acetate (pH 4.8)와 500 µl의 isopropanol을 가하여 원심한 후 70% ethanol로 조심스럽게 세척하고, 50 µl의 TE를 가하여 실험에 사용하였다[1,35].

PCR 법에 의한 tetM과 erythromycin 저항성 변이 균주의 확인 방법

국내에서 분리한 *M. pneumoniae* 123 균주를 Chanock's glucose 배지 5 ml에 배양한 후 12,000 rpm으로 15 분간 원심한 다음 인산완충액 (PBS)으로 2번 세척하였다. 침전물의 최종 부피를 50 µl로 조정하여 110°C에서 10 분간 가열한 후 12,000 rpm으로 15 분간 원심하여 그 상층액을 PCR 반응의 template로 사용하였다. Template DNA가 들어 있는 용액에 Taq polymerase (TaKaRa Taq, Japan)와 10X PCR buffer, deoxyribonucleotide triphosphates, 1.5 mM MgCl₂를 첨가하고, 해당 primer를 각각 가한 후 MiniCycler (MJ research, USA)에서 반응 시켰다(Table 1). 먼저 94°C 10 분간 전 처리한 후 94°C에서 1 분, 60°C (erythromycin 저항성 균은 55°C)에서 1분, 72°C에서 1 분의 시간으로 40회 반복 반응시키고 마지막에 72°C에서 10 분간 연장 반응시켰다. Erythromycin 저항성 균주의 경우에는 annealing 온도만 55°C에서 1 분간 반응시킨 것이 이외에는 위와 동일한 방법으로 반응시켰다. 이들 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide에서 염색하여 결과를 관찰하였다. 결과가 확인 된 산물은 자동염기분석기인 ABI 377 DNA Sequencer (Perkin- Elmer Biosystem, USA)의 유전자 염기서열을 분석하였다. 각 primer 부위의 PCR 산물의 유전자 염기서열을 분석하여 erythromycin에 감수성인 *M. pneumoniae* M129 표준균주와 비교분석하여 돌연변이 부위를 확인하였다[32,33-35,41,45].

결 과

한자로부터 분리된 *M. pneumoniae*의 tetracycline과 erythromycin에 대한 MIC

2002년 12월부터 2005년 2월까지 부산시내 몇몇 병원에 내원한 환자 994명으로부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주의 tetracycline과 erythromycin에 대한 MIC는 Fig. 1과 Table 4와 같다. 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 tetracycline에 대한 MIC가 0.5µg/ml이하인 균주가 91%이었으며, 9%의 균주가 MIC 1.0 µg/ml이었다. 분리된 *M. pneumoniae* 균주 중에서 erythromycin에 대한 MIC가 1.0 µg/ml 이하인 균주가 61(49.6%)이었으며, MIC가 16 µg/ml인 균주가 1(0.8%), 32 µg/ml인 균주가 1(0.8%)이었으며, MIC가 64 µg/

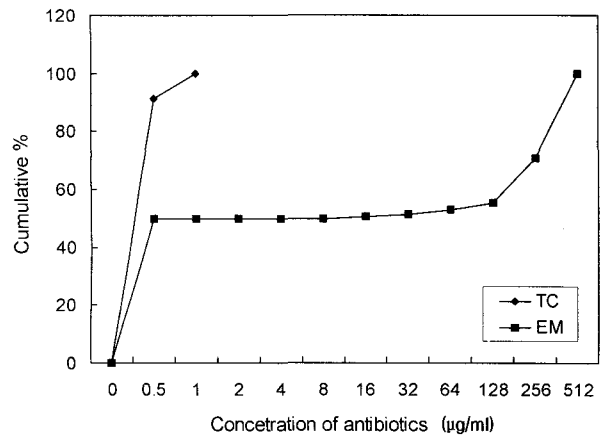


Fig. 1. Cumulative percentage(%) of MICs for 123 strains of *M. pneumoniae* isolates against tetracycline and erythromycin determined by the broth dilution method. TC: tetracycline, EM: erythromycin

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer and name	Primer sequence(5'-3')	Size (bp)
tetM		
tet-F	CAGTATGAGAGCTCGGTTC	508
tet-R	TCCGACTATTTGGACGACGG	
2 3S rRNA domain II		
Mp23S II-F	CGTGCGTTTTGAAGTATGAG	327
Mp23S II-R	TGGCGCCATCATACATTCAG	
23S rRNA domain V		
MP23S V-F	TAACTATAACGGTCCTAAGG	852
Mp23S V-R	ACACTTAGATGCTTTCAGCG	
Ribosomal protein L4		
MPL4-F	GAACCAGTGAAACTAAGCCC	420
MPL4-R	TTTGTCCAAGAGCTTGGCAC	
Ribosomal protein L22		
MPL22-F	CCGTGTGAGAATCTCACCCC	404
MPL22-R	CTGCTTTTTGACGTGCCA	

ml인 균주가 2(1.6%)이었으며, MIC가 128 µg/ml인 균주가 3(2.4%)이었으며, MIC가 256 µg/ml인 균주가 19(15.5%)이었으며, MIC가 512 µg/ml인 균주가 36(29.3%) 이었다.

M. pneumoniae 균주에서 Plasmid 유전자의 유무 확인

호흡기질환 환자에서 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 모두 tetracycline과 erythromycin에 대한 저항성과는 관계없이 plasmid DNA는 분리되지 않았다(Table 2). 그러므로 tetracycline과 erythromycin에 대한 저항성 유전자는 plasmid에는 존재하지 않음을 알 수 있다.

Tetracycline에 저항성인 Tet M 유전자의 확인

환자로부터 분리 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 tetracycline에 저항성 유전자인 tet M의 유무를 PCR검색한 결과 성인 환자에서 분리된 89 균주 중에서 43(48.3%) 균주가 tet M 유전자를 가지고 있으며, 소아환자에서 분리된 34 균주 중에서 14(41.2%) 균주가 tetM 유전자를 가지고 있었으며, 전체 123균주 중에서 57(46.3%)균주가 tetM 유전자를 가지고 있는 tetracycline 저항성균주임이 확인되었다(Fig. 2, Table 3).

M. pneumoniae 균주의 erythromycin에 대한 MIC와 저항성 변이

환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주의 erythromycin에 대한 저항성 변이가 일어났는지를 유전자 분석으로 확인하여 본 결과는 Table 4와 같다. 환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 63 균주는 erythromycin에 대한 저항성 변이가 일어나지 않았다. 그러나 erythromycin

Table 2. Detection of plasmid DNA and chromosome from *M. pneumoniae* Isolates

Age	No of Samples	Plasmid DNA	Chromosome
Adults	89	-	89
Children	34	-	34
Total	123	0	123

Table 4. MIC distribution of erythromycin-resistant *M. pneumoniae* isolates

Mutation of 23S rRNA	MIC (µg/ml) of erythromycin										Total
	<= 1.0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
No mutation	61				1					1	63
A2058G								1	7	17	25
A2059G						1	2	1	8	8	20
A2058T									2	3	5
A2058C									1	3	4
C2611G									1	2	3
A2059C								1		1	2
G2057C										1	1
Total	61				1	1	2	3	19	36	123

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

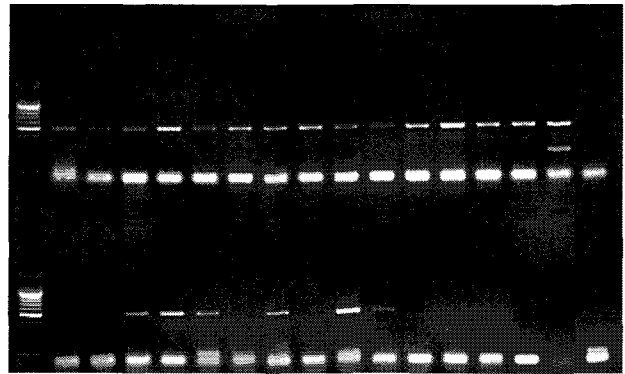


Fig. 2. TetM gene (508 bp) positive strains of *M. pneumoniae* isolates.

Upper lane 1: molecular marker, lane 2: positive control, lane 3~16: positive samples, and lane 17: negative samples.

Lower lane 1: molecular marker, lane 4,5,6,8,10,11: positive samples, and lane 2,3,7,9,12~17: negative samples.

Table 3. Distribution of TetM gene on the chromosomal DNA of *M. pneumoniae* isolates

Age	Chromosomal DNA	tetM positive	tetM negative
Adults	89	43(48.3%)	46(51.7%)
Children	34	14(41.2%)	20(58.8)
Total	123	57(46.3%)	66(53.7%)

에 대한 MIC 검사 결과에서는 63 균주 중 61균주는 MIC가 1.0 µg/ml 이하였으나, 나머지 1균주는 MIC가 16 µg/ml, 다른 1균주는 MIC가 512 µg/ml이었다. 환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 60 균주는 erythromycin에 저항성 변이가 일어났으며, 그 중에서 25균주는 23S rRNA의 V domain에 A2058G 변이가 일어났으며, 20 균주는 A2059G 변이가 일어났으며, 5 균주는 A2058T 변이가 일어났으며, 4 균주는 A2058C 변이가 일어났으며, 3 균주는 C2611G 변이가 일어

났으며, 2 균주는 A2059C 변이가 일어났으며, 1 균주는 G2057C 변이가 일어났다. A2058G 변이가 일어 25 균주의 MIC는 128 µg/ml가 1 균주, 256 µg/ml가 7 균주, 512 µg/ml가 17 균주였다. A2059G 변이가 일어난 20 균주의 MIC는 32 µg/ml가 1 균주, 64 µg/ml가 2 균주, 128 µg/ml가 1 균주, 256 µg/ml가 8 균주, 512 µg/ml가 8 균주였다. A2058T 변이가 일어 5 균주의 MIC는 256 µg/ml가 2 균주, 512 µg/ml가 3 균주였다. A2058C 변이가 일어 4 균주의 MIC는 256 µg/ml가 1 균주, 512 µg/ml가 3 균주였다. A2611G 변이가 일어 3 균주의 MIC는 256 µg/ml가 1 균주, 512 µg/ml가 2 균주였다. A2059C 변이가 일어 2 균주의 MIC는 128 µg/ml가 1 균주, 512 µg/ml가 1 균주였다. G2057C 변이가 일어 1 균주의 MIC는 512 µg/ml이었다.

Tetracycline 저항성 tetM 유전자와 erythromycin 저항성 변이와의 상관관계

Tetracycline 저항성 tetM 유전자를 가지고 있는 *M. pneumoniae* 균주의 23S rRNA V domain에서 erythromycin 저항성 변이와의 관계를 비교한 결과는 Table 5와 같다.

Erythromycin에 저항성변이를 일으키지 않은 *M. pneumoniae* 63 균주 중에서 36균주(57.1%)가 tetM 유전자를 가지고 있으며, 27균주(42.9%)는 tetM 유전자를 가지고 있지 않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 A2058G 변이를 일으킨 25균주 중에서 8균주(32.0%)가 tetM 유전자를 가지고 있으며, 17균주(68.0%)는 tetM 유전자를 가지고 있지 않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 A2059G 변이를 일으킨 20균주 중에서 8균주(40.0%)가 tetM 유전자를 가지고 있으며, 12균주(60.0%)는 tetM 유전자를 가지고 있지 않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 A2058T 변이를 일으킨 5균주 중에서 3균주(60.0%)가 tetM 유전자를 가지고 있으며, 2균주(40.0%)는 tetM 유전자를 가지고 있지 않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 A2058C 변이를 일으킨 4균주 중에서 4균주(100.0%) 모두가 tetM 유전자를 가지고 있었다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 C2611G 변이를 일으킨 3균주 중에서 1균주(33.3%)가 tetM 유전자를 가지고 있으며, 2균주(66.7%)는 tetM 유전자를 가지고 있지

않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 A2059C 변이를 일으킨 2균주 중에서 균주(100.0%)가 tetM 유전자를 가지고 있지 않았다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA V domain에 G2057C 변이를 일으킨 1균주는 tetM 유전자를 가지고 있었다. Erythromycin에 저항성 변이를 일으킨 60균주 중에서 57균주(95%)가 tet M 유전자를 가지고 있었다.

고 찰

본 연구에서 호흡기 질환 환자로 부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주의 tetracycline에 대한 MIC는 112균주(91%)가 0.5 µg/ml이하로 tetracycline에 감수성이었으며, 11균주(0.9%)가 MIC 1.0 µg/mL로 저항성이었다. 이는 장 등[10]이 1995년 국내에서 분리한 *M. pneumoniae* 33균주의 tetracycline에 대한 MIC₉₀이 0.78 µg/ml이었으며, MIC가 1.0 µg/ml이상인 균주가 2(6%)이었다는 결과보다 낮은 결과였으며, Arai 등[2]은 환자로 부터 분리된 *M. pneumoniae* 균주의 MIC₉₀은 6.26 µg/ml이었으며, MIC가 1.56 µg/ml인 균주가 41(82%) 이었다는 보고보다도 현저하게 낮았다. Kenny 등 [27]은 환자에서 분리한 *M. pneumoniae* 53 균주에의 tetracycline에 대한 MIC₉₀은 2.0 µg/ml이었다는 보고보다도 낮은 결과였다. 이와 같이 국내에서 분리된 *M. pneumoniae* 균주의 tetracycline에 대한 MIC가 낮은 것은 상당한 기간동안 국내에서 tetracycline을 사용하지 않았기 때문으로 생각된다. 그러나 MIC가 낮으면서도 tetM 유전자를 가지고 있는 균주에 대하여 MIC를 다시 한번 검사하였으나 같은 결과를 얻었으므로 이 문제는 앞으로 연구해 보아야 할 과제라고 생각된다.

호흡기질환 환자로 부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 erythromycin에 대한 저항성 변이가 일어나지 않은 감수성인 것이 61 균주(49.6%)이었으며, 저항성 변이가 일어나 저항성인 것이 62 균주(50.4%)이었다. 이는 장 등[10]이 1995년 분리한 *M. pneumoniae* 33 균주 모두가 erythromycin에 감수성이었다는 보고와 차이가 많았으며, 이는 국내에서 1995년 까지는 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae*가 분리되지 않았다는 결과를 보여준 것으로 생각된다. 이와 같이 짧은 기간에 erythromycin에 저항성 균주가 출현할 수 있

Table 5. Comparison of tetracycline resistance tetM gene positive and erythromycin resistant mutants of *M. pneumoniae* 123 isolates

	Erythromycin resistant mutation on 23S rRNA domain V (%)								
	No mutation	A2058G	A2059G	A2058T	A2058C	C2611G	A2059C	G2057C	Total
Tet M(+)	36 (57.1)	8 (32.0)	8 (40.0)	3 (60.0)	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	1 (100)	57 (46.3)
Tet M(-)	27 (42.9)	17 (68.0)	12 (60.0)	2 (40.0)	4 (100)	2 (66.7)	2 (100)	0 (0)	66 (53.7)
Total	63 (51.2)	25 (20.3)	20 (16.3)	5 (4.1)	4 (3.3)	3 (2.4)	2 (1.6)	1 (0.8)	123 (100)

(+): positive, (-): negative

는 것인지 외국의 예를 보면 다음과 같다. 일본에서도 1992년 Arai 등[2]이 분리한 *M. pneumoniae* 50 균주의 erythromycin에 대한 MIC는 0.01 µg/ml로 감수성이었으며, 1994년 Kaku 등[24]이 분리한 43 균주의 erythromycin에 대한 MIC가 0.031 µg/ml로 감수성이었으며, 1998년 Izumikawa 등[23]이 분리한 44 균주의 erythromycin에 대한 MIC는 0.0313 µg/ml로 감수성이었다고 보고되었으나, 2001년 Okazaki 등[34]이 분리한 152 균주 중 141(92.8%) 균주는 erythromycin에 감수성이었으나 11(7.2%) 균주는 저항성이었으며, 2004년 Matsuoka 등[33]이 분리한 76균주 중에서 13(18%) 균주가 erythromycin에 저항성이었다고 보고하여 짧은 기간 경과에서도 내성균의 출현이 가능함을 보여 주고 있다. 본 연구에서 국내에서 분리되는 erythromycin에 저항성 *M. pneumoniae* 균주의 분리가 일본 보다 현저히 높으며, 이는 국내에서 erythromycin 등 항생제의 사용빈도가 높은 것과 관계가 있을 것으로 생각된다.

한편 국내에서 분리된 *M. pneumoniae*의 tetracycline에 대한 MIC는 낮았으나, 이 균에서 tetracycline에 저항성인 tetM 유전자의 보유 유무를 조사하기 위하여 plasmid DNA의 분리를 시도하였으나, plasmid DNA는 분리되지 않았다. 따라서 분리된 *M. pneumoniae* 123균주에서 염색체 DNA를 분리하여 tetM 유전자를 검색하여 본바 tetracycline에 대한 MIC와는 관계없이 57 균주(46.3%)에서 tetM 유전자를 보유하고 있음이 확인되었다. 소아나 성인에서 분리된 균주와도 차이가 없었다. *M. pneumoniae*에서 tetM 유전자의 존재를 보고한 논문은 찾아보기 어려워 비교 검토 할 수가 없었다. 그러나 박 등[35]은 국내에서 분리된 *M. hominis*와 *Ureaplasma urealyticum*에서 plasmid DNA는 확인되지 않았으나, tetracycline에 저항성인 10 균주 모두에서 염색체 DNA에 tetM 유전자를 가지고 있었으며, tetracycline에 저항성인 *Ureaplasma urealyticum* 11 균주 중 9 균주에서 tetM 유전자를 확인할 수 있었다고 보고하였다.

국내에서 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 erythromycin에 저항성 변이를 일으키지 않은 63 균주의 erythromycin에 대한 MIC를 보면 61균주는 MIC가 1.0 µg/ml 이하였으나, 1균주는 MIC가 16 µg/ml이었고 다른 한 균주는 MIC가 512 µg/ml이었다. 이로써 erythromycin에 대한 저항성 변이 유전자는 확인되지 않았으나 고도의 저항성을 가지는 균주가 있음을 확인 할 수 있었으며, 이 균주들은 두 번의 확인 시험을 하였으나 저항성 유전자는 확인되지 않았다. Erythromycin 저항성 *M. pneumoniae* 균주들 중에서 23S rRNA domain V의 A2058G (*E. coli* numberings) 변이주가 20.3%로 가장 많았으며, 이 균주들의 erythromycin에 대한 MIC 범위는 128-512 µg/ml이었으며, A2059G (*E. coli* numberings) 변이주가 16.3%였으며, 이 균주의 MIC 범위는 32-512 µg/ml이었으며, A2058T 변이주가 4.1% 였으며, 이

균주의 MIC 범위는 256-512 µg/ml이었으며, A2058C 변이주가 3.3%이었으며, MIC 범위는 256-512 µg/ml이었으며, C2611G 변이주가 2.4%이었으며, MIC 범위는 256-512 µg/ml이었고, A2059C 변이주가 1.6%이었으며, MIC 범위가 128-512 µg/ml이었으며, G2057C 변이주가 0.8%로 MIC는 512 µg/ml이었다. 또한 국내에서 분리되는 *M. pneumoniae* 균주 중에서 erythromycin에 저항성 변이를 일으키지 않은 63 균주 중 36 균주는 tetracycline에 저항성 유전자인 tetM 유전자를 가지고 있었으며, erythromycin에 대한 저항성 변이를 일으킨 A2058G 변이주 25 균주 중에서 8 균주, A2059C 변이주 20 균주 중에서 8 균주, A2058T 변이주 5 균주 중에서 3 균주, C2611G 변이주 3 균주 중에서 1 균주, G2057C 변이주 1 균주가 tetM 유전자를 가지고 있음을 확인하였다. 이는 erythromycin 저항성 변이주의 35%는 tetM 유전자도 공유하고 있으므로 이들 균주에 대한 치료에는 각별한 주의가 요망된다. 이는 Matsuoka[33] 등의 10/13(77%) 균주가 A2063G 변이주 이었으며, 1/13(7.7%) 균주가 A2064G, 1/13(7.7%) 균주가 A2063C, 1/13(7.7%) 균주가 A2617G 변이주 이었다는 보고와도 차이가 많았으며, 이는 사회적 환경적인 차이가 있을 수 있는 것으로 생각된다. Pereyre 등[36,37]은 erythromycin에 저항성인 *M. pneumoniae* 균주에서 23S rRNA domain V에서 C2611A, A2062G 변이균주를 확인하였으며, Okazaki 등[34]의 erythromycin 저항성 균주의 23S rRNA domain V에서 A2063G(*E. coli* 숫자로는 A2058G와 같음), A2064G (*E. coli* 숫자로는 A2059G와 같음), A2064C 변이주를 확인하였으며, Lucier 등[31]은 erythromycin 저항성 균주에서 A2063G, A2064G 변이 균주를 확인하였다는 보고와 유사하였다. 그러나 국내 분리균주에서 *M. pneumoniae*에서는 위에서 보고 되지 않은 부위의 변이 균주도 있었다.

국내에서 분리된 *M. pneumoniae*의 erythromycin에 대한 저항성 변이뿐만 아니라 tetracycline에 저항성인 Tet M 유전자를 공유하고 있는 균주가 있으므로 이들 *M. pneumoniae* 균주에 의한 폐렴환자의 치료에 erythromycin을 사용하는 것은 고려되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

2002년 2월부터 2005년 4월까지 호흡기질환 환자로부터 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주의 tetracycline과 erythromycin에 대한 MIC 범위는 각각 0.5~1.0, 0.5~512 µg/ml이었다. 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주에서 plasmid DNA는 확인되지 않았다. 분리된 *M. pneumoniae* 123 균주 중에서 57(46.3%) 균주가 tetracycline에 저항성인 tetM 유전자를 가지고 있었으며, 23S rRNA domain V에 erythromycin에 저항성 변이를 일으킨 균주가 60(48.8%)이었다. Erythromycin에 저항성 변이를 일으키지 않은 63균주 중에서 tetM 유

전자를 가지고 있는 균주는 36(57.1%)이었으며, erythromycin에 저항성 변이를 일으킨 60균주 중에서 21(35.0%) 균주가 tetM 유전자를 가지고 있었다.

본 연구로써 국내에서 tetracycline과 erythromycin에 대한 저항성 *M. pneumoniae* 균주의 분리율이 외국에 비하여 높으며, *M. pneumoniae* 감염의 치료에 erythromycin이 일차 선택제가 될 수 없으므로 이에 대한 범국가적 조사가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

1. Aaij C., and P. Borst 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochem Biophys Acta.* **269**, 192-196.
2. Arai S., Y. Gohara, K. Kuwano, and T. Kawashima. 1992. Antimycoplasmal activities of new quinolones, tetracyclines, and macrolides against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**, 1322-1324.
3. Barroso G., and J. Labarere. 1988. Chromosomal gene transfer in *Spiroplasma citri*. *Sci.* **242**, 959-961.
4. Blanchard A., and C. Bebear. 2002. Mycoplasmas of human, pp 45-71, In Razin S, and Hermann R (ed), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma*. Kluwer Academic Pub., New York.
5. Braun P., J.O. Klein, and E.H. Kass. 1970. Susceptibility of genital mycoplasma to antimicrobial agents. *Appl Microbiol*, **19**, 62-65.
6. Brown J.T., and M.C. Roberts. 1987. Cloning and characterization of tetM gene from a *Ureaplasma urealyticum* strain. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**, 1852-1856.
7. Burdett V. 1980. Identification of tetracycline resistant R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Antimicrob Agents Chemother.* **18**, 753-758.
8. Burdett V., J. Inamine, and S. Rajagopalan. 1986. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. *J Bacteriol.* **165**, 564-570.
9. Cassell G.H., W.A. Clyde, and J.K. Davis. 1985. Mycoplasmal respiratory infections. pp65-106, In *The Mycoplasmas Vol. IV*, Razin S and Barile MF (Ed), Academic Press, New York.
10. Chang M.W., K.H. Kim, I.D. Park, and M H Joh. 1995. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens of patients by polymerase chain reaction and culture method. *J. Korean soc. Microbiol.* **30**, 517-525.
11. Chang M.W., K.H. Kim, I.D. Park, K.H. Kang, and E.H. Kong. 2003. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* and antimicrobial susceptibilities of the *M. pneumoniae* isolates. *J Bacteriol Virol*, **33**, 183-191.
12. Chang M.W., K.H. Kim, I.D. Park, G.Y. Song, S.W. Kim, E.Y. Lee, M.C. Kim, M.H. Cho, K.E. Kim, and C.E. Choi. 2005. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* and antimicrobial susceptibilities of the isolated (III). *Korean J Life Sci*, **15**(3), 479-485.
13. Clewell D.B., and C. Gawron-Burke. 1986. Conjugative transposon and the dissemination of antibiotic resistance in *streptococci*. *Ann Rev Microbiol.* **40**:635-659.
14. Cummings M.C., and W.M. McCormack. 1990. Increase in resistance of *Mycoplasma hominis* to tetracycline. *Antimicrob Agents chemother*, **34**, 2297-2300.
15. Douthwaite S, L.H. Hansen, and P. Mauvis. 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.
16. Dybvig K. 1989. Transformation of *Acholeplasma laidlawii* with streptococcal plasmids pVA868 and pVA920. *Plasmid*, **21**, 155-160.
17. Ford O.K., and J.R. Smith. 1974. Nonspecific urethritis associated with a tetracycline-resistant T-mycoplasma. *Br J Vener Dis.* **50**, 373-377.
18. Furness G, and A.M. Cerone. 1979. Preparation of competent single-cell suspensions of *M. hominis* tetS and *M. salivarium* tetS for genetic transformation to tetracycline resistance by DNA extracted from *M. hominis* tet R. *J Infect Dis*, **139**, 441-451.
19. Furneri P.M., G. Rappazzo, M.P. Musumarra, P. Dipietro, L.S. Catania, and L.S. Roccasalva. 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.
20. Hansen L.H., P. Mauvais, S. Douthwaite. 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.
21. Harasawa R., and M.F. Barile. 1983. Survey of plasmids in various Mycoplasmas. *Yale J Biol Med.* **56**, 783-789.
22. Hempstead P.G. 1990. An improved method for the rapid isolation of chromosomal DNA from *Mycoplasma* spp. *Can J Microbiol* **36**, 59-64.
23. Izumikawa K., Y. Hirakata, T. Yamaguchi, R. Yoshida, H. Tanaka, H. Takemura, S. Maesaki, K. Tomono, M. Kaku, K. Izumikawa, S. Kamihira, and S. Kohno. 1998. *In vitro* activities of quinupristin-Dalfopristin and the streptogramin RPR106972 against *M. pneumoniae*. *Antimicrob agents chemother.* **42**, 698-699.
24. Kaku M., K. Ishida, K. Irifune, R. Mizukane, H. Takemura, and R. Yoshida. 1994. *In vitro* activities of sparfloxacin against *M. pneumoniae*. *Antimicrobil Agents Chemother.* **38**, 738-741.
25. Kang K.S., H.O. Woo. 2003. Pattern occurrence of *Mycoplasma pneumoniae* in admitted children: Southern central Korea, from 1989 to 2002. *J Korean Pediatr Soc.* **46**, 474-479.
26. Kapusnik-Uner J.E., M.A. Sande, H.F. Chambers. 1996. Antimicrobial agents, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antimicrobial agents, pp1123-

- 1153, In Goodman & Gilman, The pharmacological basis of therapeutics, 9th(ed), McGraw-Hill, New York.
27. Kenny G.E., F.D. Cartwright. 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.
 28. Knapp J.S., S.R. Johson, J.M. Zenilman, M.C. Roberts, and S.A. Morse. 1988. High-level tetracycline resistance due to tet M in strains of *Neisseria* species, *Kingella detrificans*, *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**, 765-769.
 29. Levey S.B. 1988. Tetracycline resistance determinants are wide spread. *ASM News*, **54**, 418-422.
 30. Levy S.B., L.M. McMurry, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, M.C. Roberts, and D.E. Taylor. 1989. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**, 1373-1378.
 31. Lucier T.S., K. Heitzman, S.K. Liu, and P.C. Hu. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *M. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2770-2773.
 32. Mahairas G.G., C. Jian, and C. Minion. 1990. Genetic exchange of transposon and integrative plasmid markers in *M. pulmonis*. *J Bacteriol.* **172**, 2267-2272.
 33. Matsuoka M., M. Narita, N. Okazki, H. Ohya, and T. Yamazaki. 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *M. pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4624-4630.
 34. Okazaki N., M. Narita, S. Yamada, K. Izumikawa, M. Umetsu, T. Kenri, Y. Sasaki, Y. Arakawa, and T. Sasaki. 2001. Characteristics of macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* **45**, 617-620.
 35. Park I.D., K.H. Kim, M.W. Chang, H.S. Park. 1992. Distribution of tetM gene in the tetracycline resistant bacteria. *J Korean Soc Microbiol.* **27**, 59-72.
 36. Pereyre S., P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A. Charron, S. Raheison, C.M. Bebear. 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.
 37. Pereyre S., C. Guyot, H. Renaudin, A. Charron, C. Bebear, and C.M. Bebear. 2004. *In vitro* selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *M. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 460-465.
 38. Prunier A.L., B. Malbrunny, D. Tande, B. Picard, and R. Leclercq. 2002. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3054-3065.
 39. Roberts M.C., L.A. Koutsky, K.K. Holmes, D.J. LeBlanc, and G.E. Kenny. 1985. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal tetM sequences. *Antimicrob agents Chemother.* **28**, 141-143.
 40. Ross J.I., E.A. Eady, J.H. Cove, C.E. Jones, A.H. Ratyal, Y.W. Miller, S. Vyakranam, and W. Cunliffe. 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacterium isolated from acne patients is associated with mutation in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**, 1162-1165.
 41. Schulzen F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albercht, A. Yonath, and F. Franceschi. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.
 42. Suyama N., K. Ishida, M. Kaku, K. Izumikawa, and K. Hara. 1995. Therapeutic activities of macrolides against *M. pneumoniae* infection. *Jap J Mycoplasmol.* **21**, 39-40.
 43. Taylor-Robinson D. 1976. Mycoplasmas of various hosts and their antibiotic sensitivities. *Prostagrand Med J Suppl.* **43**, 100-105.
 44. Trzcinski K., B.S. Cooper, W. Hryniewicz, and C.G. Dowson. 2000. Expression of resistance to tetracycline in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* **45**, 763-770.
 45. Vester B., and S. Douthwaite. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitution in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1-12.
 46. Waites K.B., L.B. Duffy, T. Schmid, D. Carb, M.S. Pate, and G.H. Cassell. 1991. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* to sparfloxacin and PD 127391. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**, 1181-1185.
 47. Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577-585.