

Molecular Characterization and Prevalence of 16S Ribosomal RNA Methylase Producing Bacteria in Amikacin Resistant Gram-negative Bacilli Isolated from Clinical Specimens

Kyung-A Shin¹, Seock Yeon Hwang² and Seung Bok Hong^{3,†}

¹Department of Laboratory Medicine Bundang Jesaeng Hospital, Sungnam-si, Gyeonggi-do 463-774, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

³Department of Clinical Laboratory Science, Chungbuk Health & Science University, Cheongwon 363-794, Korea

Recently, the prevalence of 16S rRNA methylase conferring high-level resistance to aminoglycosides has been increasing in Gram-negative bacilli globally. We determined the prevalence and genotype of these methylase-producing bacteria, and characterized the co-resistance to β -lactam antibiotics and quinolone in Gram-negative clinical isolates collected in 2010 at a hospital in Korea. Among 65 amikacin-resistant isolates screened from 864 Gram-negative bacilli (GNB), 16S rRNA methylase genes were detected from 49 isolates, including *Acinetobacter baumannii* (43), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Proteus mirabilis* (2) and *Serratia marcescens* (1), *Empedobacter brevis* (1). All of the 16S rRNA methylase genotype was *armA* and no variant sequences of amplified PCR products for *armA* were noted. The 16S rRNA methylase producing bacteria showed much higher resistance to aminoglycoside for Enterobacteriaceae and glucose non-fermenting (NF)-GNB and to imipenem for glucose NF-GNB, than the non-producing isolates. All of the 16S rRNA methylase producing Enterobacteriaceae had the extended-spectrum- β -lactamase. In addition, two *K. pneumoniae* concurrently produced both plasmid-mediated AmpC β -lactamase and *qnrB* gene. All of the amikacin-resistant *A. baumannii* (43) co-harbored *armA* 16S rRNA methylase and *bla*_{OXA-23} carbapenemase. In conclusion, 16S rRNA methylase producing bacteria were very prevalent among GNB in South Korea, and were commonly associated with co-resistance, including carbapenem and quinolone.

Key Words: 16S rRNA methylase, *armA*, β -lactams, Quinolone, Aminoglycoside, Gram negative bacilli

서 론

그람음성 간균에 의한 감염증의 치료에는 세포벽 생성을 억제하는 β -lactam계 항균제, 단백질 합성을 억제하는 aminoglycoside계 항균제, 그리고 DNA 합성을 저해하는 quinolone계 항균제가 흔히 사용된다 (Yao et al., 2007). 이들 항균제의 사용이 증가함에 따라 세균의 내성률도 증가하였다. Amikacin과 quinolone에 내성인 *Klebsiella*

*pneumoniae*가 1997년에 각각 8%이었으나 2003년에는 13%, 19%로 증가하였으며 2009년에 15%, 33%까지 증가하였다 (Lee et al., 2006; Lee et al., 2011). 한편 *Acinetobacter* 균종에서는 1997년에 amikacin과 quinolone에 대한 내성이 각각 50%, 2003년에 56%, 58% 그리고 2009년에는 66%, 67%로 급격히 증가하였다 (Lee et al., 2006; Lee et al., 2011).

한편 가장 흔한 aminoglycoside의 내성 기전은 수식효소에 의한 것이었으나 최근 30S 리보솜을 구성하는 16S rRNA의 methylation에 의해 amikacin 및 gentamicin을 포함한 모든 4,6-substituted deoxystreptamine 항균제에 고도 내성을 나타내게 하는 내성 기전이 증가하고 있으며, 이들 내성 기전은 플라스미드를 통해 쉽게 다른 균으로 전달될 수 있다 (Galimand et al., 2003). 2003년 프랑스에서 처음으로 *K. pneumoniae*에서 *armA*형 16S rRNA methylase

*Received: August 2, 2012 / Revised: August 13, 2012

Accepted: August 20, 2012

†Corresponding author: Seung Bok Hong. Department of Clinical Laboratory Science, Chungbuk Health & Science University, Cheongwon 363-794, Korea.

Tel: +82-43-210-8308, Fax: +82-43-210-8289

e-mail: sbhong8646@hanmail.net

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

가 보고되면서 (Galimand et al., 2003), 최근까지 장내세균 뿐만 아니라 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp.를 포함한 다양한 그람음성 간균에서 *rmtA* (Yokoyama et al., 2003), *rmtB* (Doi et al., 2004), *rmtC* (Wachino et al., 2006), *rmtD* (Doi et al., 2007a), *rmtE* (Davis et al., 2010) 및 *npmA* (Wachino et al., 2007)가 전세계적으로 보고되었다. Bogaerts 등 (Bogaerts et al., 2007)은 2000년에서 2005년까지 Belgium에서 분리된 16S rRNA methylase를 생성하는 균 중 모두가 extended-spectrum-β-lactamase (ESBL)을 생성함을 보고하였으며, 국내에서 Kim 등 (Kim et al., 2008)은 16S rRNA methylase 생성 *A. baumannii*가 *bla_{OXA-23}*을 동시에 생성하고 aminoglycoside와 carbapenem에 동시 내성을 보이는 균에 의한 감염의 창궐을 보고하였다. 한편 2010년 Lee 등은 *armA* 양성 장내세균의 91%에서 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) 유전자인 *qnrB*와 연관됨을 보고하였다 (Lee et al., 2010).

이와 같이 16S rRNA methylase 생성 균주는 aminoglycoside에 고도 내성을 보일 뿐 아니라 다양한 β-lactam 항균제와 quinolone 등에도 내성을 보일 수 있다. 따라서 이들 균에 의한 감염의 치료를 더욱 어렵게 할 수 있으나 이에 대한 국내연구는 드물다. 본 연구의 목적은 국내 한 지역의 2차 병원에서 분리되는 그람음성 간균 중에서 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 빈도 및 유전형질을 조사하고, β-lactam 및 quinolone 내성 유전자의 동시 생성 등을 조사하여 이들 항균제 내성 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

시험 균주의 수집 및 균종 동정

2010년 4월부터 8월까지 5개월 동안 경기도지역 한 병원에서 분리된 그람음성 간균 864주 중에서 amikacin에 내성인 65주를 대상으로 하였으며 동일한 환자에서 반복 분리된 균은 제외하였다. 균의 동정은 기본적인 생화학 적 검사와 자동동정기기인 MicroScan® WalkAway 96 plus system (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, West Sacramento, CA, USA)을 이용하였다.

항균제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) 한천희석법으로 시험하였다. 시험 항균제는 amikacin (Boryung Pharmaceutical Co., Seoul,

Korea), ceftazidime (CJ Jeiljedang Co., Seoul, Korea), ciprofloxacin (Bayer Korea Co., Seoul, Korea), gentamicin (Dongshin Pharmaceutical Co., Seoul, Korea), ceftioxitin 및 imipenem (Merk & Co., Inc., Elkton, MD, USA), tobramycin (Daewoong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea), arbekacin (Joongwae Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)이었다. 최소 억제농도 (MIC)는 균의 증식이 관찰되지 않는 최소 항균농도로 정의하였으며, 매 실험마다 정도관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853를 동시에 시험하였다.

β-lactamase 선별검사

Extended-spectrum β-lactamase 생성 시험: Double disk synergy (DDS) 시험으로 ESBL 생성을 확인하였다. DDS 시험은 amoxicillin-clavulanic 디스크 (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, MD., USA, 20/10 μg)를 가운데 두고 3세대 cephalosporin (cefotaxime, ceftazidime, aztreonam: BBL, 30 μg)과 cefepime 디스크 (BBL, 30 μg)를 20 mm 간격으로 위치하게 한 후 16~18시간 배양 후 상승효과가 존재하면 ESBL로 판단하였다 (Jarlier et al., 1988). DDS에서 ESBL 생성 균주로 의심되면 CLSI ESBL phenotypic confirmatory test (CLSI, 2012)로 ESBL 생성 유무를 다시 확인하였다.

Plasmid-mediated AmpC β-lactamase 생성 시험: Plasmid-mediated AmpC β-lactamase (PMABL) 검사는 Song 등의 방법으로 (Song et al., 2007) 시행하였으며 방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. 3-aminophenylboronic acid (Sigma-Aldrich Inc, Steinhelm, Germany) 400 μg을 ceftioxitin disk에 첨가하여 억제대가 5 mm 이상 증가한 경우 양성으로 판단하였다.

Carbapenemase 생성 시험: imipenem 내성원인을 조사하기 위하여 CLSI guideline (2012)에 따라 modified Hodge test를 시행하여 carbapenemase를 선별하였으며, 양성인 균주는 imipenem-EDTA double disk synergy (EDTA-DDS) 법으로 metallo-β-lactamase (MBL) 생성을 확인하였다 (Lee et al., 2003). 한편 modified Hodge test에서 양성이고 EDTA-DDS 시험에 음성인 *A. baumannii*에서는 OXA-type carbapenemase 유전자 검출을 시도하였다 (Table 1).

Table 1. Primers used for detection of 16S rRNA methylase, plasmid mediated quinolone resistance and OXA-type carbapenemase genes

Name	Nucleotide sequence (5'→3')	Product size (bp)	References.
<i>armA</i> F ^a	AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG	590	Lee et al., 2006
<i>armA</i> R	TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC		
<i>rmtA</i> F ^a	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC	635	Lee et al., 2006
<i>rmtA</i> R	TTT GCT TCC ATG CCC TTG CC		
<i>rmtB</i> F ^a	CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC	584	Lee et al., 2006
<i>rmtB</i> R	CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC		
<i>rmtC</i> F ^a	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG	711	Lee et al., 2006
<i>rmtC</i> R	ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT		
<i>rmtD</i> F ^a	ATG AGC GAA CTG AAG GAA AAA CTG C	532	Lee et al., 2006
<i>rmtD</i> R	GCT CCA AAA GCG GCA GCA CCT TA		
<i>qnrA</i> F ^b	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580	Cattoir et al., 2007
<i>qnrA</i> R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
<i>qnrB</i> F ^b	GGA ATT GAA ATT CGC CAC TG	264	Cattoir et al., 2007
<i>qnrB</i> R	TTT GCC GCC CGC CAG TCG AA		
<i>qnrS</i> F ^b	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428	Cattoir et al., 2007
<i>qnrS</i> R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG		
<i>qepA</i> F ^b	CCG ACA GGC CCA CGA CGA GGA TGC	549	Lee et al., 2006
<i>qepA</i> R	TCG GCG GCG TGT TGC TGG AGT TCT		
OXA23F ^c	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501	Woodford et al., 2006
OXA23R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT		
OXA24F ^c	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246	Woodford et al., 2006
OXA24R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT		

^a Primers for 16S rRNA methylase genes

^b Primers for plasmid mediated quinolone resistance genes

^c Primers for OXA-type carbapenemase genes

16S rRNA methylase 유전자 검출

Amikacin 내성 65주에 대하여 16S rRNA methylase 유전자 (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD*)에 대한 PCR을 시행하였다 (Table 1). PCR 반응액은 polymerase 1 U가 들어있는 premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 DNA 추출액 2 µl와 20 pmol의 primer를 각각 1 µl를 넣고, 최종 용량이 20 µl가 되게 증류수를 넣고 시행하였다. PCR 증폭은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)을 사용하였고, 94°C에서 15분 pre-denaturation 후 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분씩 35회 증폭 반응시키고 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. *rmtC* 및 *rmtD*은 annealing 온도만 각각 55°C 및 62°C로 사용하였고, 기타 조건은 위와 동일하게 시행하였다. PCR 증폭 산물은 1%의 아가로스겔을 이용하여, 100 V에서 30분간 전기영

동하였다. 증폭된 유전자를 ABI 3700 (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA)로 염기서열을 분석하였으며 염기서열은 GenBank 염기 database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)와 비교하였다

Plasmid-mediated quinolone 내성 유전자 검출

플라스미드에 의해 전달되는 quinolone 내성 유전자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 및 *qepA*를 PCR로 검출하였다 (Cattoir et al., 2007). 사용한 시발체는 Table 1과 같으며, PCR 반응액은 polymerase 1 U가 들어있는 premix (Bioneer)에 DNA 추출액 2 µl와 20 pmol의 primer를 각각 1 µl 넣고, 최종 용량이 20 µl가 되게 증류수를 넣고 반응시켰다. PCR 증폭은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Cetus)을 사용하였고, 94°C에서 15분 pre-denaturation 후 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분씩 35회 증폭 반응시키고 72°C에서

Table 2. Distribution of 16S rRNA methylase and plasmid mediated quinolone (PMQ) resistance genes in amikacin resistant gram-negative bacilli

Bacterial species	No. isolated	16S rRNA methylase genes			PMQ resistance genes			
		No. of AMK resistance	<i>armA</i>	<i>RmtA, B, C, D</i>	No. of AMK resistance	<i>qnrA, S</i>	<i>qnrB</i>	<i>qepA</i>
<i>E. coli</i>	398	3	0	0	3	0	1	0
<i>K. pneumoniae</i>	145	6	2	0	6	0	5	0
<i>K. oxytoca</i>	15	0	NT	NT	0	NT	NT	NT
<i>E. cloacae</i>	36	2	0	0	2	0	0	0
<i>E. earogenes</i>	21	0	NT	NT	0	NT	NT	NT
<i>C. freundii</i>	21	0	NT	NT	0	NT	NT	NT
<i>P. mirabilis</i>	26	2	2	0	2	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	20	1	1	0	1	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	100	7	0	0	7	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	82	43	43	0	43	0	0	0
<i>E. brevis</i>	1	1	1	0	1	0	0	0
Total	864	65	49	0	65	0	6	0

Abbreviations: AMK, amikacin; PMQ, plasmid mediated quinolone; NT, not tested

5분간 연장 반응시켰다. *qepA* PCR은 annealing 온도만 각각 61°C로 사용하였고, 기타 조건은 위와 동일하게 시행하였다.

OXA-carbapenemase 유전자 검출

Modified Hodge test에서 양성이고, EDTA-DDS 시험에 음성인 균주는 OXA-type carbapenemase 생성을 시사하므로, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}를 PCR로 검출하였다. 사용한 시발체와 반응은 Woodford의 방법대로 시행하였다 (Woodford et al., 2006).

결 과

16S rRNA methylase 양성률 및 유전형

2010년 4월부터 5개월 동안 경기도지역에서 분리된 그람음성 간균 864주 중에서 65주 (7.52%)가 amikacin에 내성이었으며 이 중 49주 (5.67%)가 16S rRNA methylase를 생성하였다. 16S rRNA methylase 양성인 균종은 *A. baumannii* 43주 (43/82), *K. pneumoniae* 2주 (2/6), *Proteus mirabilis* 2주 (2/2), *Serratia marcescens* 1주 (1/1) 및 *Empedobacter brevis* 1주 (1/1)였다 (Table 2). 유전형으로는 16S rRNA methylase 양성 49주 모두 *armA*이었다. Plasmid mediated quinolone 내성 유전자는 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 5주에서 *qnrB*가 검출되었으며 *armA* 양성 *K. pneumoniae* 2주에서 *armA*와 *qnrB* 유전자가 동시에 검

출되었다 (Table 2).

16S rRNA methylase 생성 균주의 항균제 내성 양상

Amikacin 내성 장내세균 14주는 imipenem을 제외하고 시험한 항균제에 모두 내성을 보였다. 이들 중 16S rRNA methylase (*armA*) 양성 균주 (5주)는 aberkacin, amikacin, gentamicin 및 tobramycin의 MIC₅₀이 모두 256 µg/mL 이상으로 16S rRNA methylase 음성 균주에 비하여 고도 내성을 보였다. 또한 16S rRNA methylase 양성 장내세균은 모두 ESBL을 생성하고 있었으며, 이들 중 *K. pneumoniae* 2주는 ESBL과 *ampC* β-lactamase를 동시에 생성하였다 (Table 3 & 4).

Amikacin 내성 포도당 비발효 세균 51주도 imipenem을 제외한 시험한 모든 항균제에 내성을 보였으며 imipenem 내성률은 16S rRNA methylase 생성 균주 및 미생성 균주에서 각각 95%와 71%이었다. 한편 *A. baumannii* 44주는 모두 16S rRNA methylase (*armA*) 양성이었으며, 이들은 16S rRNA 음성 포도당 비발효 세균에 비하여 arberkacin 과 amikacin에 대한 MIC₅₀이 의미 있게 증가되어 있었으나 gentamcin과 tobramycin의 MIC₅₀은 유사하였다. 16S rRNA methylase 양성 *A. baumannii*는 imipenem MIC₅₀이 음성주에 비하여 증가되어 있었다 (Table 3). 이들 균은 모두 modified Hodge 검사에서 양성, EDTA-DDS에서 음성을 보여 Class D carbapenemase를 시사하였으며 Class D OXA-23 β-lactamase 생성 균이었다 (Table 4).

16S rRNA methylase 유전자 및 quinolone 내성 유전자
염기서열 분석

유전자의 변이형을 선별하기 위해서 16S rRNA methylase 양성 49주에 대해 *armA* 유전자와 plasmid-mediated quinolone 내성 *qnrB* 유전자 2주에 대해 염기서열을 분석

하였으나 모든 균주에서 변이형은 관찰되지 않았다.

고 찰

864주의 그람음성 간균 중 49주 (5.7%)가 16S rRNA methylase를 생성하였으며 이 중에는 *K. pneumoniae* (2), *P.*

Table 3. Comparison of the MICs ($\mu\text{g/ml}$) for antimicrobial agents between 16S rRNA methylase- positive and -negative gram negative bacilli

	16S rRNA methylase-positive (49)				16S rRNA methylase-negative (16)			
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
<i>Enterobacteriaceae</i> (14) ^a								
Amikacin	>256	>256	>256	100	64~>256	64	>256	100
Arbekacin	256~>256	>256	>256	100	32~>256	32	>256	100
Tobramycin	256~>256	>256	>256	100	32~>256	32	>256	100
Gentamicin	256~>256	>256	>256	100	32~>256	32	>256	100
Ciprofloxacin	64~>256	256	>256	100	32~>256	128	>256	100
Ceftazidime	64~>256	64	>256	100	64~>256	64	256	100
Cefoxitin	32~>256	256	>256	100	32~>256	128	256	100
Imipenem	0.25~16	1	16	40	0.25~64	2	16	22
Glucose nonfermenting GNR (51) ^b								
Amikacin	>256	>256	>256	100	64~>256	128	256	100
Arbekacin	256~>256	>256	>256	100	32~256	32	>256	100
Tobramycin	256~>256	>256	>256	100	32~>256	>256	>256	100
Gentamicin	256~>256	>256	>256	100	32~256	>256	>256	100
Ciprofloxacin	64~>256	64	>256	100	32~256	64	128	100
Ceftazidime	64~>256	128	128	100	64~256	64	64	100
Imipenem	1~64	64	64	95	0.25~256	16	32	71

Abbreviations: GNR, Gram negative bacilli; MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistance

^a composed with 5 positive isolates and 9 negative isolates for 16S rRNA methylase.

^b composed with 44 positive isolates and 7 negative isolates for 16S rRNA methylase, which included 44 *Acinetobacter baumannii*, 7 *Pseudomonas aeruginosa* and 1 *Empedobacter brevis*

Table 4. Determinants of antimicrobial resistance in 49 Gram-negative bacilli with 16S rRNA methylase

Isolates (No)	16S M ^a	DDS test	Carbapenemase		<i>qnrB</i> ^b	Susceptibility		
			Hodge ^c	<i>bla</i> _{OXA-23}		IMP	FOX	CIP
<i>K. pneumoniae</i> (2)	<i>armA</i> ^b	ESBL + <i>ampC</i>	Negative	-	+	S/R	R	R
<i>P. mirabilis</i> (2)	<i>armA</i>	ESBL	Negative	-	-	R/S	R	R
<i>S. marcescens</i> (1)	<i>armA</i>	ESBL	Negative	-	-	S	R	R
<i>A. baumannii</i> (43)	<i>armA</i>	Negative	Positive	+	-	R	R	R
<i>E. brevis</i> (1)	<i>armA</i>	Negative	Negative	-	-	R	R	R

Abbreviations: DDS, double disk synergy test; ESBL, extended spectrum- β -lactamase; IMP, imipenem; FOX, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; NT, not tested; S, susceptibility; R, resistance

^a 6S rRNA methylase gene

^b no variant sequences of amplified PCR products for *armA* and *qnrB* were noted.

^c modified Hodge test

mirabilis (2), *S. marcescens* (1), *A. baumannii* (43), *E. brevis* (1) 등이 포함되었는데, *E. brevis*에서 16S rRNA methylase의 보고는 전세계적으로 처음이다. 2000년부터 2005년 사이에 벨기에에서 수집된 15,386주의 장내세균에서 총 19주 (0.12%)가 16S rRNA methylase를 생성하였으며 (Bogaerts et al., 2007), 2004년 일본의 169개 병원에서 수집한 87,626주의 그람음성 간균에서 총 26주 (0.03%)의 16S rRNA methylase 생성주가 분리되었다 (Yamane et al., 2007). 한편 2006-7년 국내의 두 병원에서 수집된 2,722주의 그람음성 간균에서 123주 (4.5%)의 16S rRNA methylase 생성주가 분리되어 (Lee et al., 2010) 이들 내성 기전이 점차 증가하며 다양한 균으로 확산됨을 시사하였다.

16S rRNA methylase 유전형은 49주가 모두 *armA*로 이전의 국내의 보고와 유사하였다 (Lee et al., 2010). 흥미로운 것은 지리적으로 가까운 일본에서는 *rmtA*가 주로 분리되었으며 (Yamane et al., 2007), 유럽에서는 *armA*가 흔히 분리되었는데 (Bogaerts et al., 2007) 일본 및 유럽에서 분리되는 균주와의 clonality에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

16S rRNA methylase 생성 균주는 다양한 항균제에 내성을 보일 수 있는데, 특히 장내세균에서 ESBL의 생성을 흔히 동반한다. 유럽에서 분리되는 *armA* 유전자 양성 균주 모두에서 CTX-M형 ESBL이 생성됨이 보고되었으며 (Bogaerts et al., 2007), 내에서도 19주의 *armA* 양성 장내세균 14주 (73.7%)가 ESBL 생성 균주이었다 (Lee et al., 2010). 그러나 CTX-M은 1주로 유럽과 대만의 경우와 상이하였다 (Yan et al., 2004). 본 연구에서도 5주의 *armA* 양성 장내세균은 모두 ESBL을 생성하고 있었으며, 이들 중 *K. pneumoniae* 2주는 PMABL를 동시에 생성하고 있었다. 한편 Lee 등의 보고 (Lee et al., 2010)에 의하면 국내 *armA* 양성 장내세균 14주 (*K. pneumoniae*와 *E. coli*) 중 9주 (64%)가 PMABL를 생성하고 있다는 보고와 유사한 결과를 보인다. 결과적으로 16S rRNA methylase 생성 장내세균은 ESBL을 흔히 생성하며, *K. pneumoniae*와 *E. coli*에서는 PMABL도 동시에 생성하므로 흔히 다제 내성을 보일 수 있을 것으로 추측된다.

16S rRNA methylase 생성 포도당 비발효 그람음성 간균에서 carbapenemase를 동시에 생성하는 균주가 보고되고 있는데, Yu 등 (Yu et al., 2007)은 중국 19개 병원에서 수집한 carbapenem 내성 *A. baumannii* 342주 중에서 *armA*를 생성하는 균주가 221주 (61%)였다고 보고하였으며, 미국 Pennsylvania에서 분리된 5주의 *armA*를 생성하는

균주 중에서 2주가 OXA-23 carbapenemase를 동시에 생성하여 carbapenem에 내성을 보였다고 하였다 (Adams-Haduch et al., 2008). 또한 브라질에서는 SPM-1형 MBL과 *rmtD* 16S rRNA methylase를 동시에 생성하는 *P. aeruginosa*의 집단감염이 보고되기도 하였다 (Doi et al., 2007b). 본 연구에서도 *armA* 양성 *A. baumannii* 43주가 모두 imipenem에 대한 MIC가 16 µg/mL 이상으로 내성이었으며, modified Hodge test에서 양성, EDTA-DDS에서 음성을 보여 class D carbapenemase의 생성을 시사하였다. 그리고 class D carbapenemase 중 *A. baumannii*에서 가장 흔한 *bla*_{OXA-23}에 대한 유전자 검사에서 모두 양성을 보였다. 한편 *armA*와 OXA-23 carbapenemase 양성 균주에 의한 감염의 창궐 (outbreak)이 2007년 국내의 서로 다른 지역의 병원에서 보고되었는데 (Kim et al., 2008; Jeong et al., 2011), 본 균주의 수집병원은 기존 보고된 병원들과 서로 다른 지역이므로 국내에서 *armA*와 OXA-23 carbapenemase 동시 생성 *A. baumannii*이 널리 확산되었음을 시사한다.

16S rRNA methylase 생성 균주는 quinolone에 대해서도 높은 내성을 보이는데 (Lee et al., 2010) 본 연구에서도 *armA* 생성 장내세균 및 *A. baumannii*는 ciprofloxacin에 100%의 내성을 보였다. 한편 quinolone에 대한 내성 기전으로 quinolone-resistance determining region의 변화 (Hooper, 2003)와 efflux pump의 증가 (Poole, 2007) 및 porin의 감소 (Ruiz, 2003) 등이 알려져 있다. 최근에는 플라스미드를 통하여 다른 균주로 전파가 되는 Qnr 단백질에 의한 내성 기전과 *qepA* gene에 의한 내성이 알려져 있는데, 본 연구에서 이들 유전자를 검사한 결과 *E. coli* 1균주와 *K. pneumoniae* 5주에서 *qnrB* 유전자가 검출되었으며, *armA* 양성 *K. pneumoniae* 2주는 모두 *qnrB* 유전자를 포함하고 있었다. 이는 국내에서 *armA* 생성 *K. pneumoniae*의 91%가 *qnrB*가 검출되어 높은 연관성을 보였다는 보고와 일치한다 (Lee et al., 2010). 결국 *armA* 양성 *K. pneumoniae*는 2주 모두 ESBL, PMABL, *qnrB*를 동시에 보유하고 있었는데, 이들은 항균제 선택 압력이 높은 병원 환경에서 16S rRNA methylase, PMABL 및 *qnrB* 내성 유전자가 동시에 수평-확산되었을 가능성을 시사하므로 감염관리에 철저한 주의가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 국내에서 16S rRNA methylase에 의한 aminoglycoside 고도 내성인 그람음성 간균의 양성율은 5.7%로 높았으며 특히 *A. baumannii*에서 양성율이 53.6%로 외국의 보고 뿐만 아니라 다른 국내보고 보다 월등히

높았다. 그리고 다양한 균 종으로 16S rRNA methylase의 내성 유전자가 전파되고 있었으며 유전자형은 모두 *armA* 형이었다. 마지막으로 16S rRNA methylase 생성 세균에서 ESBL, PMABL, *qnrB* (장내세균) 및 carbapenemase (*A. baumannii*)와 같은 다양한 내성 기전을 동시에 포함하고 있었다.

REFERENCES

- Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, Harrison LH, Doi Y. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52: 3837-3843.
- Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of *armA* and *rmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylase in Belgium. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 2007. 59: 459-464.
- 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: 394-397.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty two informational supplement (M100-S22). Wayne, PA: CLSI, 2012.
- Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multifunctional aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. 47: 2565-2571.
- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycoside. *Clin Infect Dis.* 2007a. 45: 88-94.
- Doi Y, de Oliveira GD, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase *rmtD* and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007b. 51: 852-856.
- Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2004. 48: 491-496.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteria* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47: 2565-2571.
- Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC and Rubenstein E, eds. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd ed, 2003. pp. 41-67. American Society for Microbiology Press. Washington DC, USA.
- Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988. 10: 867-878.
- Jeong HW, Son BR, Shin DI, Ryu D, Hong SB, Hand K, Shin KS. Characterization of *Acinetobacter baumannii* co-producing carbapenemase OXA-23 and OXA-66, and *armA* 16S ribosomal RNA methylase at a university hospital in South Korea. *Korean J Clin Microbiol.* 2011. 14: 67-73.
- Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG, Kim SJ, Lee JC. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla(OXA-23)*, *bla(PER-1)* and *armA* in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2008. 14: 716-718.
- Lee H, Koh EM, Kim CK, Yum JH, Lee K, Chong Y. Molecular and phenotypic characteristics of 16S rRNA methylase-producing Gram-negative Bacilli. *Korean J Clin Microbiol.* 2010. 13: 19-26.
- Lee H, Young D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006. 56: 305-312.
- Lee K, Kim MN, Kim JS, Hong HL, Kang JO, Shin JH, Park YJ, Yong D, Jeong SH, Chong Y, KONSAR Group. Further increases in carbapenem, amikacin and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009. *Yonsei Med J.* 2011. 52: 793-802.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong YS. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 4623-4629.
- Lee K, Park KH, Jeong SH, Lim HS, Shin JH, Yong D, Ha GY, Chong Y, KONSAR Group. 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.
- Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* 2007. 39: 162-176.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulations and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* 2003. 51: 1109-1117.
- Song W, Jeong SH, Kim JS, Kim HS, Shin DH, Rho KH, Lee KM. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC β -lactamases and extended-spectrum- β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007. 57: 315-318.
- Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m¹A1408 Methyltransferase, NpmA, found in a clinical isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2007. 51: 4401-4409.
- Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. 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: 178-184.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brawn S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006. 27: 351-353.
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kato H, Shibayama K, Kimura K. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infect Dis.* 2007. 13: 642-646.
- Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, Lu YJ, Li JD. 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: 1007-1012.
- Yao JDC, Moellenring Jr RC. *Antibacterial Agents* (Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Eds). 2007. 9th ed, pp1077-1113. ASM Press. Washington, DC, USA.
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 2003. 362: 1888-1893.
- 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: 454-455.