

Extended-Spectrum β -lactamase를 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*에서의 *qnrB*와 *armA* 유전자의 동시생성

김문희¹ · 성지연² · 박종우² · 권계철² · 구선희²

선병원 진단검사의학과¹, 충남대학교병원 진단검사의학과²

Coproduction of *qnrB* and *armA* from Extended-Spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*

Moon Hee Kim, M.D.¹, Ji Youn Sung², Jong Woo Park, M.D.², Gye Cheol Kwon, M.D.², and Sun Hoe Koo, M.D.²

Department of Laboratory Medicine, Sun General Hospital¹, Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital², Daejeon, Korea

Background : Multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* is a worldwide problem. Although various resistance mechanisms have been recognized with increasing frequency, only a few cases of triple resistance of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* have been reported. This study was designed to evaluate the coexistence of *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*) and 16S rRNA methylase (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, and *rmtC*) in ESBL-producing *K. pneumoniae*.

Methods : We tested 44 isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae* at Chungnam National University Hospital from March to September 2006. Antimicrobial susceptibilities were tested by broth microdilution method, and transconjugation test was performed using *E. coli* J53 with azide resistance. Search for *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*) and 16S rRNA methylase (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, and *rmtC*) genes was conducted by PCR amplification, and the genotypes were determined by direct nucleotide sequence analysis of the amplified products. Epidemiologic study was performed by Enterobacteriaceae repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR).

Results : All ESBL-positive strains produced *qnrB*; however, *armA* was detected in 68.2%. The coproduction rate of *qnrB* and *armA* in ESBL-producing *K. pneumoniae* was 68.2%. Two types (A and B) were dominant in ERIC-PCR results.

Conclusions : *K. pneumoniae* producing *qnrB*, *armA*, and ESBL are spreading widely. (*Korean J Lab Med* 2007;27:428-36)

Key Words : Extended-spectrum β -lactamase, *qnrB*, *armA*, *Klebsiella pneumoniae*

서론

Klebsiella 속은 자연에 널리 분포하는 세균으로 사람의 피부,

비인두, 장에도 존재한다[1]. *Klebsiella* 속에 의한 감염은 대부분 병원 감염이고 소아당뇨나 만성폐쇄성폐질환을 앓고 있는 면역 저하 환자에서 기회 감염을 유발하는데 이러한 감염을 일으키는 균들의 대부분은 *Klebsiella pneumoniae*이다[2]. *K. pneumoniae*는 중 특이적 염색체성 SHV형, LEN형 혹은 OKP형 β -lactamase를 생성하므로 ampicillin, amoxicillin, carbenicillin 및 ticarcillin에 자연 내성이다[3]. 광범위를 포함한 cephalosporin 계열의 항균제를 *K. pneumoniae* 감염증의 치료에 이용하여 왔으나[4] 항균제 사용의 증가는 이들에 대한 내성 세균이 생기는

접 수 : 2007년 8월 2일 접수번호 : KJLM2060
수정본접수 : 2007년 10월 24일
게재승인일 : 2007년 10월 25일
교신저자 : 구선희
우 301-721 대전광역시 중구 대사동 640
충남대학교병원 진단검사의학과
전화 : 042-280-7798, Fax : 042-257-5365
E-mail : shkoo@cnu.ac.kr

부작용을 낳았다. Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) 생성균주는 penicillin, 헤파임 및 광범위 cephalosporin과 monobactam 등 carbapenem을 제외한 β -lactam계 항균제 대부분에 내성이고 aminoglycoside 및 trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ) 등 다른 계열의 항균제에도 다제 내성인 경우가 많아 적절한 치료약제를 선택하기 어려우며 ESBL 유전자가 플라스미드에 의해 다른 균종으로 전파될 수 있기 때문에 이들에 대한 신속, 정확한 검출이 매우 중요하다[5-7].

최근에 quinolone 내성을 포함한 장내세균에서의 다제 내성이 미국 등 전세계에서 문제가 되고 있다[8]. *qnr* 유전자와 플라스미드 pMG 252에 의한 quinolone 내성을 가진 *K. pneumoniae*가 1994년 엘라바마 대학의 버밍엄 의료센터에서 발견되었는데 이 유전자는 quinolone으로부터 DNA gyrase를 보호하는 단백을 암호화한다[9]. 18개 나라와 미국 24개 주에서 모은 350개의 *qnrA* 유전자를 가진 그람 음성 균주를 조사한 결과 많은 균주가 Amp C β -lactamases 또는 ESBL도 같이 가지고 있는 것으로 밝혀졌다[9]. 미국에서는 *qnr*과 관련된 전파 가능한 플라스미드매개 quinolone 내성이 quinolone에 내성을 보이는 *K. pneumoniae*에서 흔히 발견되었는데[10], quinolone 내성은 ESBL 생성 균주에서 18-56%의 높은 빈도로 발견되었다[11-13].

Aminoglycoside는 그람 음성 간균에 의한 감염증의 치료에 널리 이용하는 항균제로 세균의 30S 리보솜 subunit에 비가역적으로 결합하여 세균의 단백질 합성을 억제하는 작용을 한다. Aminoglycoside에 대한 내성은 주로 N-acetylation, O-nucleotidylation 또는 O-phosphorylation을 통한 약제의 효소 변화에 기인한다[14]. Galimand 등[15]은 프랑스에서 분리된 *K. pneumoniae*에서 16S rRNA methylase 유전자 *armA*를 처음 보고하였는데, 이 균주들은 각종 aminoglycoside에 고도내성임을 보고하였고 1세대 16S rRNA methylase gene *armA*라 이름지었다. 16S rRNA methylase는 4,6-disubstituted deoxystreptamines (arbakacin, amikacin 및 kanamycin)에 aminoglycoside에 대한 친화력을 잃게 만드는 rRNA의 posttranscriptional methylase를 통해 고도내성을 전달한다. *armA* 유전자는 접합성 플라스미드에 의해 수평적으로 전달될 수 있다. *armA* 유전자는 여러 다양한 종류의 장내세균에 전달된다는 것이 유럽 여러 나라에서 보고되었다[16].

세균의 항균제 내성의 조사는 감염증의 치료 방침 결정에 기초가 된다. 국내에서 분리된 *K. pneumoniae* 중 ESBL 균주는 널리 알려졌지만 quinolone 제제 및 aminoglycoside 제제에 대한 다중 내성에 대한 연구는 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 2006년 충남대학병원에서 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae*를 대상으로 *qnr* (*qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS*) 및 16S rRNA methylase (*armA*, *rmtA*, *rmtB* 및 *rmtC*) 유전자의 동시 생성 현황을 조사하여 *K. pneumoniae*에서의 β -lactamase, quinolone 및 aminoglycoside에 대한 다제 내성의 빈도와 분자적 역학상황을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2006년 3월 1일부터 9월 1일까지 충남대학교병원 진단검사의학과 미생물 검사실에서 분리된 *K. pneumoniae* 197주 중에서 ESBL 유전자가 검출된 바 있는 44주를 대상으로 하였고, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집 대상에서 제외하였다.

2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 확인시험

CLSI 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 확인시험을 시행하였다[17]. Mueller-Hinton 한천 배지(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에 McFarland 0.5 탁도의 균액을 바른 후 cefotaxime (BBL, 30 μ g)과 cefotaxime/clavulanic acid (CTC) (BBL, 30/10 μ g), ceftazidime (BBL, 30 μ g)과 ceftazidime/clavulanic acid (CZC) (BBL, 30/10 μ g) 디스크를 놓고 35°C에서 16-18시간 배양 후 억제대를 측정하여 CTC 또는 CZC에 의한 억제대가 cefotaxime과 ceftazidime에 의한 억제대보다 5 mm 이상 클 경우 ESBL 생성 양성 균주로 판정하였다.

3. 항균제 감수성 시험

ESBL 유전자를 가지고 있는 44주의 *K. pneumoniae*를 MacConkey 배지에 계대배양하여 35°C 항온기에서 하룻밤 배양한 후, CLSI 기준에 따라 액체 배지 미량 희석법으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다[17]. 시험한 항균제는 amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefepime, cefotaxime, ciprofloxacin 및 norfloxacin이다. 정도관리를 위해서 참조 균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

4. 접합에 의한 내성 전달

Azide에 내성인 *E. coli* J53을 내성 수여자로 사용하였으며, Jacoby 및 Han의 방법[18]을 참조하여 시험하였다. 내성 공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (Difco, Detroit, MI, USA) 액체 배지에 접종하여서 3시간 진탕 배양하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37°C로 1시간 배양 후, ceftazidime 2 μ g/mL와 azide 100 μ g/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. 37°C에서 18시간 배양 후 피전달접합균주(transconjugant)를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위해서 피전달접합균주의 amikacin, gentamicin, cefotaxime, ceftazidime과 ciprofloxacin에 대한 감수성을 CLSI 기준에 따라 액체 배지 미량 희석법을 이용하여 검사하였다[17].

Table 1. Oligonucleotides used as primers for amplification and sequencing in this study

Enzymes	Primer pairs	Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
β -lactamase	TEM F*	<i>bla</i> _{TEM} and variants	ATGAGTATTCAACATTTCCGT	861	28
	TEM R†		TTACCAATGCTTAATCAGTGA		
	SHV F	<i>bla</i> _{SHV} and variants	CCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT	831	28
	SHV R		TAGCGTTGCCAGTGCTCG		
	CTX-M1F	<i>bla</i> _{CTX-M-1} cluster	AGTTCACGCTGATGGCGACG	676	23
	CTX-M1R		AACCCAGGAAGCAGGCAGTCC		
	CTX-M9F	<i>bla</i> _{CTX-M-9} cluster	GATTGACCGTATTGGGAGTTT	947	28
	CTX-M9R		CGGCTGGGTAATAAGGTCA		
Qnr	qnrA F	<i>qnrA</i>	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	660	29
	qnrA R		CTAATCCGGCAGCACTATTA		
	qnrB F	<i>qnrB1-qnrB6</i> variants	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	29
	qnrB R		TTTGCYGYCGCCAGTCGAA		
	qnrS F	<i>qnrS</i>	AGTGATCTCACCTTCACCGC	550	29
	qnrS R		CAGGCTGCAATTTTGATACC		
16S rRNA methylase	armA F	<i>armA</i>	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	776	23
	armA R		TCTCTTCCATTCCTTCTCC		
	rmtA F	<i>rmtA</i>	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	635	23
	rmtA R		TTTGCTTCCATGCCCTTGCC		
	rmtB F	<i>rmtB</i>	CCCAAACAGACCGTAGAGGC	769	23
	rmtB R		CTCAAACCTCGGCGGGCAAGC		
	rmtC F	<i>rmtC</i>	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	700	30

*F, forward; †R, reverse.

5. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인

타 연구자가 고안한 primer를 사용하였다[23, 28-30](Table 1). Plasmid Purification Kit (SolGent Co., 대전, 한국)를 사용하여 세균의 플라스미드 DNA를 추출하였다. 10× Taq buffer (2.5 μ L), 10 mM dNTP mix (0.5 μ L), primer 각 10 pmol, 0.7U Taq DNA polymerase (SolGent Co.) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 μ L의 PCR 용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9,600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 20초, 59°C에서 40초, 72°C에서 30초의 반응을 30회 반복하였다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1% 우무겔에서 40분간 전기영동하여 띠를 확인하였다. 증폭 산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)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.

6. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR에 의한 역학적 연관성 조사

DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 대상 균주의 DNA를 추출하여 주형 DNA로 사용하였다. Primer로는 ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3')과 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')로 명명된 장내세균의 반복 서열을 사용하였다[19]. 증폭반응은 10×

Taq buffer (5.0 μ L), 10 mM dNTP mix (1.0 μ L), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (SolGent Co.) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 50 μ L의 혼합액으로 시행하였다. 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 92°C에서 50초, 52°C에서 55초, 70°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 70°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10 μ L)은 ethidium bromide가 포함된 2% 우무겔에 전기영동 한 후 BioDoc-14TM Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. 띠의 강도와 상관없이 띠의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 띠 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 결과

*K. pneumoniae*의 amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefepime, cefotaxime, ciprofloxacin 및 norfloxacin에 대한 내성률은 각각 72.7%, 75%, 93%, 13.6%, 36%, 81.8% 및 77.2%이었다(Table 2, 3).

2. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인

본 연구에 사용된 44주의 *K. pneumoniae*가 가지고 있는 β -lactamase를 유전형에 따라 분류하면 SHV-12형 37주, SHV-12/CTX-M-9형 3주, SHV-12/CTX-M-3형 2주 그리고 CTX-M-

Table 2. Characteristics of ESBL-producing *K. pneumoniae* harboring *qnrB*, *qnrS*, and *armA* genes

Isolates	MIC of agents ($\mu\text{g/mL}$)							β -lactamase	<i>qnr</i>	16S rRNA methylase	ERIC type
	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	CIP	NOR				
K-1	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-2	8	≥ 16	≥ 64	2	8	2	2	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-3	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	8	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-4	4	1	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-10	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	≥ 64	0.5	2	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	C
K-12	16	2	≥ 64	≤ 1	4	≤ 0.25	≤ 0.5	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-16	≥ 64	≥ 16	≥ 64	2	4	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-17	≥ 64	8	≥ 64	≤ 1	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-19	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-20	≥ 64	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12, CTX-M3	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-24	≥ 64	≥ 16	≥ 64	2	16	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	C
K-25	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		A
K-27	≤ 2	4	≤ 1	≤ 1	8	1	2	CTX-M9	<i>qnrB4</i>		D
K-32	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	32	≥ 4	≥ 16	CTX-M9	<i>qnrB4</i>		B
K-38	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	32	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-42	≥ 64	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12, CTX-M9	<i>qnrB4</i>		B
K-43	16	2	≥ 64	2	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-45	16	≥ 16	≥ 64	≤ 1	32	≤ 0.25	2	SHV-12	<i>qnrB4</i>		C
K-46	4	≤ 1	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-85	≥ 64	≥ 16	≥ 64	4	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-86	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-88	8	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	1	2	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-89	≥ 64	≥ 16	≥ 64	1	32	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-91	≥ 64	≥ 16	≥ 64	4	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-93	≥ 64	≥ 16	≥ 64	4	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-95	≥ 64	≥ 16	≥ 64	16	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-96	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-99	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-100	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-102	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-146	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>		E
K-148	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-150	≤ 2	≥ 16	≤ 1	≤ 1	≥ 64	2	8	SHV-12, CTX-M9	<i>qnrS</i> , <i>qnrB4</i>		B
K-152	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	4	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-153	≥ 64	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-154	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12, CTX-M3	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B
K-155	≥ 64	≥ 16	≥ 64	2	16	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-156	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-159	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-160	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-161	≤ 2	≥ 16	2	2	≥ 64	0.5	2	SHV-12, CTX-M9	<i>qnrS</i> , <i>qnrB4</i>		B
K-164	≤ 2	8	≥ 64	2	16	≥ 4	8	SHV-12	<i>qnrB4</i>		B
K-166	≥ 64	≥ 16	≥ 64	8	≥ 64	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	A
K-167	4	2	≥ 64	≤ 1	8	≥ 4	≥ 16	SHV-12	<i>qnrB4</i>	<i>armA</i>	B

Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin; ERIC, Enterobacterial repetitive intergenic consensus.

9형 2주였다. 이들을 대상으로 *qnr* 유전자 검출을 위해 수행한 PCR에서 *qnrB* 유전자에 대해 44주 모두가 양성반응을 보였다. 반면 *qnrS*는 SHV-12/CTX-M-9형 2주만 양성반응을 보였고 *qnrA*에 양성반응을 보인 균주는 없었다. 16S rRNA methylase 유전자 검출을 위한 PCR에서는 30주(SHV-12형 28주, SHV-12/CTX-M-3형 2주)가 *armA* 유전자에 양성반응을 보였고 그 외 *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*에 대해서는 양성반응을 보인 균주는 없었

다. *qnrB*, *qnrS*와 *armA* PCR 증폭산물의 염기서열분석 결과 각각 *qnrB*, *qnrS*와 *armA* 유전자와 일치하였다(Table 2, 4).

3. 접합에 의한 내성전달과 최소억제농도

SHV-12, *qnrB*, *armA*를 동시에 가지고 있는 30주의 *K. pneumoniae*를 대상으로 내성 수여자인 *E. coli* J53를 이용하여 접합

Table 3. Activities of antimicrobial agents against ESBL producing *K. pneumoniae* harboring *qnrB*, *qnrS*, and *armA* genes

Antibiotic resistant genes (N of isolate)	AMK			GEN			CAZ			CTX			CIP			NOR		
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>qnrB4</i> (9)	≤0.25- >64	>64	>64	2- >16	>16	>16	≥64	>64	>64	8- >64	32	>64	≤0.01- >4	>4	>4	≤0.01- >16	>16	>16
<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>qnrB4</i> , <i>armA</i> (28)	4- >64	>64	>64	≤0.1- >16	>16	>16	≥64	>64	>64	2- >64	8	>64	≤0.01- >4	>4	>4	≤0.01- >16	>16	>16
<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M3} , <i>qnrB4</i> , <i>armA</i> (2)	>64	>64	>64	8- >16	8	>16	≥64	>64	>64	≥64	>64	>64	>4	>4	>4	>16	>16	>16
<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M9} , <i>qnrB4</i> (1)	>64	>64	>64	8	8	8	≥64	>64	>64	≥64	>64	>64	>4	>4	>4	>16	>16	>16
<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{CTX-M9} , <i>qnrB4</i> , <i>qnrS</i> (2)	≤0.25	≤0.25	≤0.25	>16	>16	>16	≤0.15- 2	1	2	≥64	>64	>64	0.5-2	1	2	2-8	4	8
<i>bla</i> _{CTX-M9} , <i>qnrB4</i> (2)	≤0.25- >64	32	>64	4- >16	8	>16	≤0.15- ≥64	32	>64	8-32	16	>32	1- ≥4	2	>4	2- >16	8	>16
Total (44)	≤0.25- >64	>64	>64	≤0.1- >16	>16	>16	≤0.15- ≥64	>64	>64	≤0.1- ≥64	16	>64	≤0.01- >4	>4	>4	≤0.01- >16	>16	>16

Abbreviations: See Table 2.

Table 4. Distributions of *qnrB*, *qnrS* and *armA* determinants according to ESBL among clinical isolates of *K. pneumoniae*

ESBL type (N of isolate)	N (%) of isolates with		
	<i>armA</i>	<i>qnrB4</i>	<i>qnrS</i>
SHV-12 (37)	28 (75.7)	37 (100)	
SHV-12, CTX-M-9 (3)		3 (100)	2 (66.7)
SHV-12, CTX-M-3 (2)	2 (100)	2 (100)	
CTX-M-9 (2)		2 (100)	
Total (44)	30 (68.2)	44 (100)	2 (4.5)

Abbreviation: ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

에 의한 내성전달을 시험하였다. 그 중 10주의 피전달접합균주를 얻었다(33.3%). K12 균주의 *armA* 유전자를 제외하고는 모두 항균제 내성 유전자가 동시에 전달되었다. 공여자와 수여자의 항균제 감수성 결과도 표에 같이 기재하였다(Table 5).

4. ERIC-PCR을 이용한 역학적 연관성 결과

띠 양상을 분석한 결과 5가지 형이 관찰되었는데 그 중 1,000 bp 이하의 3개의 띠를 보여주는 A형이 21주로 가장 많았고, 약 700 bp의 굵은 1개의 띠를 보여주는 B형이 18주로 우세하였다(Fig. 1).

고 찰

*K. pneumoniae*는 임상 검체에서 흔히 분리되는 균주로 치료에는 β -lactam 항균제를 많이 사용한다. 그런데 최근 들어 중증 감

염을 일으키는 *K. pneumoniae* 중에 ESBL 생성균이 증가하고 있으며, ESBL 유전자는 플라스미드에 의해 다른 균종으로 전파될 수 있고 원내 감염을 일으킬 수 있기 때문에 심각한 문제가 되고 있다[20]. 홍 등[21]에 의하면 1999-2000년에 분리된 ESBL 생성균 364균주에 대한 내성 전달 시험 결과 그 중 204주(56%)에서 내성이 전달되었다고 한다.

Wang 등[10]에 의하면 *K. pneumoniae* 72주 중 8주에서 *qnr* 유전자가 발견되었고 그 중 7주에서 접합에 의한 내성 전달이 있었는데 ciprofloxacin에 대한 MIC가 공여자에서는 2-32 $\mu\text{g/mL}$ 이었으나 피전달접합균주에서는 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 감소되었으나 균일하게 전달된 것으로 보아 *qnr* 유전자가 비슷한 정도로 표현된 것으로 추측할 수 있다고 하였고, 수여자인 *E. coli* J53에서는 MIC가 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 였기 때문에 의미가 있다고 하였다. 상하이에서 *qnr* 유전자를 가진 *E. coli* 연구에서는 ciprofloxacin에 대한 내성이 16배 증가하였는데 이것은 *qnr* 유전자 표현 정도가 다른 것을 암시한다고 보고하였다[22]. Bogaerts 등[23]에 의하면 CTX-M-3와 *armA* 유전자의 접합에 의한 내성 전달 시험에서 amikacin에 대한 MIC가 공여자와 피전달접합균주에서 비슷한 정도로 나타났다. 그러나 본 연구에서는 30주 중 10주에서 접합에 의한 내성 전달이 확인되었는데 실험에 사용한 5가지 항균제 모두 피전달접합균주에서의 MIC가 공여자에서보다 대체로 낮게 나타났다. 이것은 아마도 공여자에서의 내성에는 *qnrB*, *armA*, SHV-12 이외의 요소가 관여하고 있기 때문일 것으로 추측된다. 즉 *qnr* 유전자가 있는 플라스미드가 단지 fluoroquinolone에 대해 낮은 수준의 내성만을 피전달접합균주에게 전달했다 하더라도 공여자 균주는 대부분이 높은 수준의 내성을 가지고 있었는데 이것은 아마도

Table 5. Resistance profile of donor strains and transconjugants

Isolates	MIC of agents (μg/mL)					β-lactamase	qnr	16S rRNA methylase
	AMK	GEN	CAZ	CTX	CIP			
Donors (state of origin)								
K-3	≥64	≥16	≥64	8	≥4	SHV	qnrB	armA
K-4	4	1	≥64	8	≥4	SHV	qnrB	armA
K-12	16	2	≥64	4	0.25	SHV	qnrB	armA
K-17	≥64	8	≥64	≥64	≥4	SHV	qnrB	armA
K-20	≥64	8	≥64	≥64	≥4	SHV	qnrB	armA
K-24	≥64	≥16	≥64	16	≥4	SHV	qnrB	armA
K-100	≥64	≥16	≥64	8	≥4	SHV	qnrB	armA
K-102	≥64	≥16	≥64	8	≥4	SHV	qnrB	armA
K-159	≥64	≥16	≥64	8	≥4	SHV	qnrB	armA
K-160	≥64	≥16	≥64	4	≥4	SHV	qnrB	armA
J53 transconjugants								
K-3′	≥64	8	≥64	4	≥4	SHV	qnrB	armA
K-4′	2	1	≥64	1	0.25	SHV	qnrB	armA
K-12′	4	2	16	2	0.01	SHV	qnrB	
K-17′	4	2	16	1	0.25	SHV	qnrB	armA
K-20′	4	2	16	1	0.25	SHV	qnrB	armA
K-24′	2	2	16	1	2	SHV	qnrB	armA
K-100′	8	0.1	≥64	16	0.01	SHV	qnrB	armA
K-102′	2	0.1	≥64	32	0.01	SHV	qnrB	armA
K-159′	1	0.1	16	1	0.1	SHV	qnrB	armA
K-160′	2	2	16	1	10	SHV	qnrB	armA
E. coli J53	0.25	0.1	0.15	0.06	0.01			

Abbreviations: See Table 2.

염색체생의 돌연변이가 부가적으로 *qnr* 유전자에 대해 작용하기 때문일 것으로 추측되었다[24]. 또 Bogaerts 등[23]은 접합에 대한 시험시 배지에 rifampicin, streptomycin 또는 nalidixic acid와 amikacin을 넣어 aminoglycoside에 내성인 균만 선택적으로 자라게 하여 높은 MIC값을 얻었으나 본 연구에서는 처음부터 β -lactamase, *qnrB*, *armA* 유전자가 같은 플라스미드에 있을 것으로 가정하고 ceftazidime만 이용하여 실험하였기 때문에 상대적으로 내성 정도가 낮은 균주도 실험에 포함된 것으로 추정된다. 피전달접합균주에 대해서는 염기서열분석을 실시하여 유전자를 확인하였다.

armA 유전자는 운반가능한 요소에 의해 *bla*_{CTX-M}과도 관련되어 있어 광범위 cephalosporin제에도 동시 내성일 것으로 추정되었다[15]. 타이완에서는 *armA* 또는 *rmtB* 양성인 *Escherichia coli*와 *K. pneumoniae*의 94.3%가 CTX-M형 효소를 가진 것으로 보고하였다[25]. 그러나 Lee 등[26]은 *armA* 또는 *rmtB* 양성인 25주의 Enterobacteriaceae와 16주의 *Acinetobacter* spp. 중 *bla*_{CTX-M-14}가 단지 *K. pneumoniae* 한 균주에서만 검출되어 16S rRNA methylase 유전자와 *bla*_{CTX-M-14} 유전자가 항상 연계되어 있는 것은 아니라고 하였으며 16S rRNA methylase 생성 *K. pneumoniae*와 *Acinetobacter baumannii*가 다른나라에 비해 한국에서 상대적으로 많고 methylase를 생성하는 균주는 arbekacin과 amikacin에 고도 내성을 보이며 levofloxacin에도 동시에 내성을 나타낸다고 보고하였다. 또 Lee 등[27]의 연구에서도

armA 또는 *rmtB*를 지닌 *K. pneumoniae* 균주의 86.7 %, *A. baumannii*의 93.8%가 levofloxacin에 내성이었다. 본 연구에서도 *armA* 유전자를 가진 *K. pneumoniae* 30균주가 cirpofloxacin에 90% (27주), norfloxacin에 86.6% (26주)가 내성이었다.

본 연구에서 시행한 접합에 의한 내성 전달 시험에서도 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주에서 *qnrB*와 *armA* 유전자가 내성 전달을 하는 것을 알 수 있었다. ERIC-PCR 결과 A형(21주)과 B형(18주), C형(3주), D형 (1주), E형(1주)을 나타내었다.

결론적으로 ESBL을 생성하는 *K. pneumoniae*에서 quinolone과 aminoglycoside에 대한 동시 내성이 많이 존재하고, 2가지 형이 우세하게 존재함을 알 수 있었다.

요 약

배경 : 전세계적으로 다제 내성 장내 세균이 문제로 대두되고 있고 여러 가지 항균제에 대한 내성률이 증가하고 있으나 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성 *Klebsiella pneumoniae*에서의 ESBL, quinolone 및 aminoglycoside 제제에 대한 삼중 내성에 대한 보고가 없다. 이에 ESBL 생성 *K. pneumoniae*에서의 quinolone 및 aminoglycoside 제제에 대한 다제 내성 빈도를 알아보고자 하였다.

방법 : 2006년 3월부터 9월까지 충남대학교병원에서 분리된

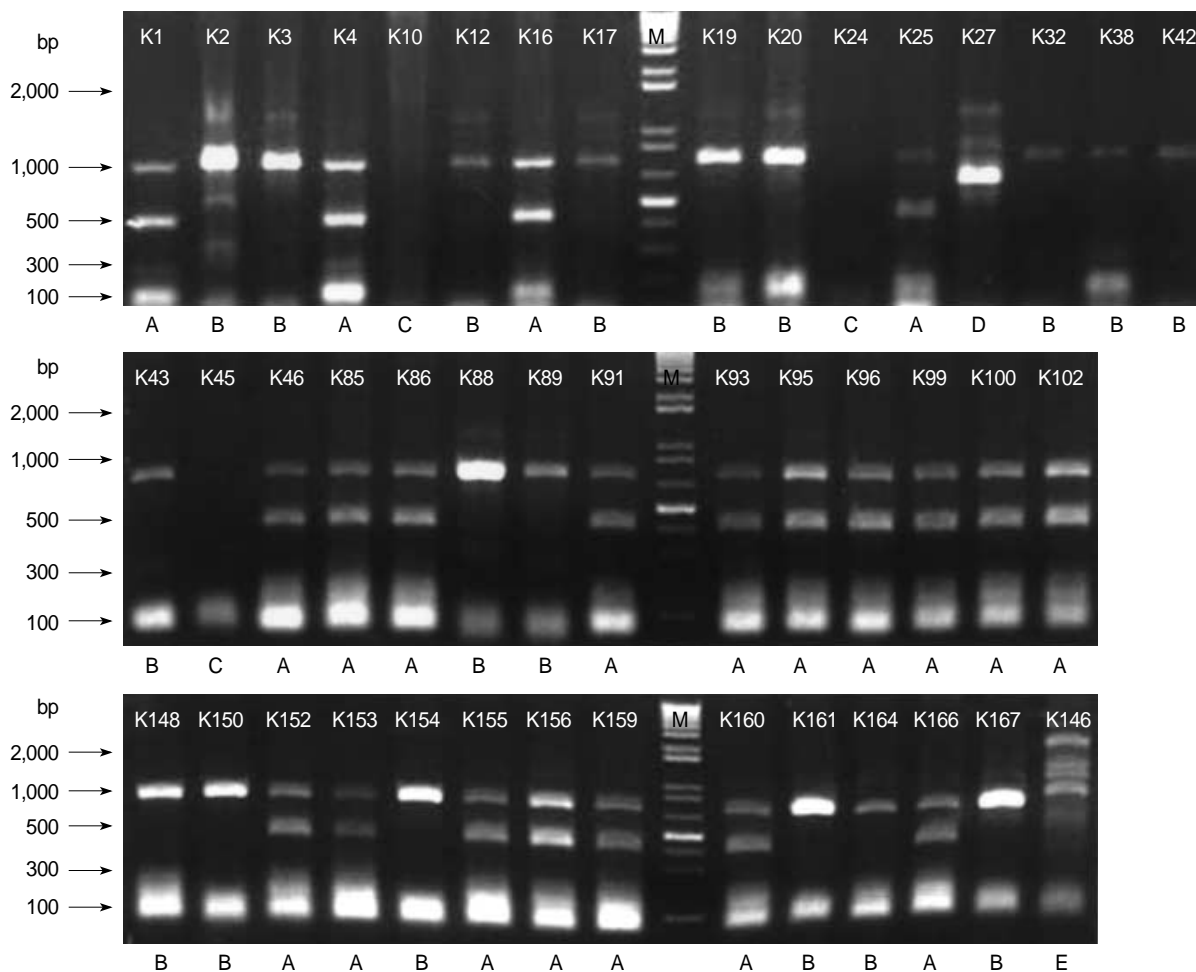


Fig. 1. Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR patterns of genomic DNA from clinical isolates of *K. pneumoniae* harboring ESBLs. Lane M is 1kb DNA size marker. Among the five different banding patterns (A, B, C, D, E), A and B patterns are dominant. Thirty nine of 44 extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates show A or B patterns.

ESBL 유전형을 가진 *K. pneumoniae* 44주를 대상으로 β -lactam 항생제의 최소 억제 농도를 액체 배지 미량 희석법으로 측정하였다. Azide에 내성을 갖는 *E. coli* J53을 이용하여 피진달접합균주에 대한 시험을 하였다. PCR을 시행하였고 그 증폭 산물로 직접 염기 서열 분석을 시행하여 quinolone 및 aminoglycoside 제제에 대한 내성 유전형을 결정하였다. 역학연구는 Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR)로 하였다.

결과 : ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주에서 *qnrB* 유전자는 100%에서, *armA* 유전자는 68.2%에서 검출되었고 따라서 3가지 유전자가 모두 검출된 균주는 68.2%였다. ERIC-PCR 결과 A, B형 두 가지가 우세하게 많았다.

결론 : *qnrB*, *armA*와 ESBL을 생성하는 *K. pneumoniae*가 널리 퍼져 있다.

참고문헌

1. Abbott S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter and Serratia*. In: Murray PR, Baron EJ, et al, eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM press, 1999:475-82.
2. Podschum R and Ullman U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11:589-603.
3. Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 β -lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 β -lactamase gene. J Antimicrob Chemother 2006;57:1259-61.
4. Quitilaiani R Jr, Sahm DF, et al. eds. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington:ASM press 1999;1505-25.
5. Shin KS and Son BR. Comparison of Vitek ESBL test and other me-

- thods for detecting extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. Korean J Clin Pathol 2002;22:21-6. (신경섭 및 손보라. *Escherichia coli*와 *Klebsiella* species에서 Extended-spectrum β -lactamase 검출을 위한 Vitel ESBL test와 그 외 방법의 비교. 대한임상병리학회지 2002;22:21-6.)
6. Hong SG, Kang MS, Choi JR, Lee KW, Chong YS, Kwon OH. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of enterobacteriaceae. Korean J Clin Pathol 2001;21:495-504. (홍성근, 강명서, 최종락, 이경원, 정윤섭, 권오현. 임상검체에서 분리된 Enterobacteriaceae 균종의 Extended-spectrum β -lactamase 유형 및 분자역학적 특성. 대한임상병리학회지 2001;21:495-504.)
 7. Lee BY, Jeong SH, Jeong TS, Nam HJ, Ji JH, Hong YR. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with the Vitek GNS 121 card. Korean J Clin Pathol 2001;21:350-4. (이보영, 정석훈, 정태식, 남희준, 지종현, 홍유라. Vitek GNS 121 Card를 이용한 Extended-spectrum β -Lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella* spp. 검출. 대한임상병리학회지 2001;21:350-4.)
 8. Lautenbach E, Strom BL, Nachamkin I, Bilker WB, Marr AM, Larosa LA, et al. Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among Enterobacteriaceae isolates from inpatients and outpatients, 1989-2000: differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms. Clin Infect Dis 2004;38:655-62.
 9. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:559-62.
 10. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1295-9.
 11. Itokazu GS, Quinn JP, Bell-Dixon C, Kahan FM, Weinstein RA. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. Clin Infect Dis 1996;23:779-84.
 12. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis 2001;33:1288-94.
 13. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000;30:473-8.
 14. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3249-56.
 15. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16s rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2565-71.
 16. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2949-53.
 17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006.
 18. Jacoby GA and Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996;34:908-11.
 19. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1999;19:6823-31.
 20. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
 21. Hong SG, Kim SJ, Jeong SH, Chang CH, Cho SR, Ahn JY, et al. Prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2003;6:149-55. (홍성근, 김선주, 정석훈, 장철훈, 조성란, 안지영 등. 국내에서 분리된 Extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도 및 유형. 대한임상미생물학회지 2003;6:149-55.)
 22. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2242-8.
 23. Bogaerts P, Galimand M, Baurang C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, et al. Emergence of *ArmA* and *RmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. J Antimicrob Chemother 2007;59:459-64.
 24. Martinez-Martinez L, Pascual A, Garcia I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. J Antimicrob Chemother 2003;51:1037-9.
 25. Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. J Antimicrob Chemother 2004;54:1007-12.
 26. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;56:305-12.
 27. Lee K, Lee M, Shin JH, Lee MH, Kang SH, Park AJ, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and

- Klebsiella pneumoniae* in Korea. Microb Drug Resist 2006;12:44-9.
28. Kang JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Lee JW, Lee WG, et al. Prevalence of Ambler Class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2005;8:17-25. (강지혜, 배일권, 권수봉, 정석훈, 이종욱, 이위교 등. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 국내 분리 현황. 대한임상미생물학회지 2005;8:17-25.)
29. Cattoir V, Weill FX, Poirer L, Fabre L, Soussy CJ, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. J Antimicrob Chemother 2007;59:751-4.
30. Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. J Antimicrob Chemother 2006;58:907-8.