

<겉표지, 속표지>

16S rRNA methylase 생성
그람음성 간균의 내성 양상과
분자유전학적 특성

연세대학교 대학원

의 학 과

이 혁 민

<제출서>

16S rRNA methylase 생성
그람 음성 간균의 내성 양상과
분자유전학적 특성

지도교수 이 경 원

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007년 11월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 혁 민

<인준서>

이혁민의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 이 경 원 _____ 인

심사위원 _____ 김 준 명 _____ 인

심사위원 _____ 조 상 래 _____ 인

심사위원 _____ 김 명 희 _____ 인

심사위원 _____ 최 종 락 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 11월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 많은 격려와 가르침을 주신 이경원 교수님과 바쁘신 중에도 많은 지도와 깨우침을 주신 김준명 교수님, 조상래 교수님, 김명희 교수님 및 최종락 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 본 연구에 많은 도움을 주신 정윤섭 교수님, 염종화 교수님께도 감사를 드리며, 논문의 실험을 도와 수고해 주신 기타 모든 선생님들께도 깊은 감사를 드립니다.

마지막으로 어려운 와중에서도 항상 옆에서 힘이 되어준 아내 은정기와 힘들 때마다 웃음을 선사해주었던 승준기와 예준기 두 아들에게도 진심으로 감사합니다.

이 혁 민

<차례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 시험 균주의 수집	8
2. 균종 동정 및 16S rRNA methylase 생성 선별 검사	8
3. 항균제 감수성 시험	8
4. β -lactam 항균제 내성 기전 규명	9
가. Extended-spectrum β -lactamase 생성 시험	9
나. Plasmid-mediated AmpC β -lactamase 생성 시험	9
다. Carbapenemase 내성 시험	10
(1) Imipenem-Hodge 변법	10
(2) Imipenem-EDTA+SMA double disk synergy 법	10
5. 16S rRNA methylase 유전자 검출	10
6. Plasmid-mediated quinolone 내성 유전자 검출	11
7. 16S rRNA methylase 생성 균주의 분자유전학적 연관성 규명	11
III. 결과	14
1. 16S rRNA methylase 양성율	14
2. 16S rRNA methylase 유전형 분포	16
3. 16S rRNA methylase 생성 균주의 항균제 내성 양상	18
4. 16S rRNA methylase 생성 균주의 다제내성 양상	20
5. 16S rRNA methylase 생성 균주의 유전적 연관성	20
IV. 고찰	25
V. 결론	31

참고문헌	32
영문요약	39

<그림 및 표 차례>

그림 차례

Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis pattern of *armA* and *qnrB*-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates showed polyclonal patterns. 24

표 차례

Table 1. Primers used for PCR detection of 16S rRNA methylase genes and *qnr* genes 13

Table 2. The rates of 16S rRNA methylase-producing isolates in Severance and Myongji hospital from 2006 to 2007 15

Table 3. Distribution of 16S rRNA methylase in gram-negative bacilli 17

Table 4. Comparisons of MICs ($\mu\text{g/mL}$) of antibiotics for 16S rRNA methylase-positive and -negative gram-negative bacilli 19

Table 5. Comparisons of the rates of β -lactam resistance and quinolone resistance in 16S rRNA methylase-positive and -negative gram-negative bacilli 22

Table 6. Comparisons of levofloxacin MICs in *qnr*-positive
and -negative gram-negative bacilli 23

국문 요약

16S rRNA methylase 생성 그람음성 간균의

내성 양상과 분자유전학적 특성

Aminoglycoside 항균제는 세균의 ribosome과 불가역적으로 결합하여 단백질 합성을 저해하는 살균성 항균제로, 단독 또는 병합 요법으로 흔히 사용된다. 근래에 aminoglycoside제의 작용 표적인 30S ribosome을 구성하는 16S rRNA를 methylation하여 임상적으로 유용한 모든 4, 6-substituted deoxystreptamine 항균제에 고도 내성을 보이게 하는 새로운 내성 기전이 보고되었으나, 이에 대한 국내의 연구는 드물다. 이에 본 연구에서는 서울과 경기도에 소재하는 2차와 3차 병원의 환자에서 분리되는 그람음성 간균 중에서 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 빈도와 그 내성 유전형, 또한 이들 세균 중에 β -lactam제와 fluoroquinolone제 등에 대한 다제 내성 양상을 규명하고자 하였다.

2006년 7월부터 2007년 6월까지 경기도 화정에 위치한 2차 병원과 2007년 4월부터 6월까지 서울에 위치한 3차 병원에 내원한 환자에서 분리한 일련의 균주, 즉 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* 균종 및 *Stenotrophomonas maltophilia*를 대상으로 하였으며, 중복 분리주는 제외하였다.

균종 동정은 전통적인 생화학적 방법과 상품화된 kit를 이용하였다. 수집한 균주는 디스크 확산법과 한천 희석법으로 β -lactam제, aminoglycoside제 및 fluoroquinolone제에 대한 항균제 감수성을 시험하였다. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성은 double disk synergy 법으로 시험하였고, plasmid-mediated AmpC β -lactamase

(PABL)생성은 cefoxitin 감수성 시험 결과로 추정하였다. Carbapenemase의 생성은 modified-Hodge 법과, imipenem-EDTA double disk synergy 법으로 시험하였다.

16S rRNA methylase 생성은 arbekacin 디스크를 이용하여 선별한 후, PCR로 유전자(*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD*)를 검출하였고 유전자 염기 서열을 분석하여 빈도와 유전형을 결정하였다. Plasmid-mediated quinolone 내성 기전은 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 및 *qepA* 유전자에 대한 PCR과 염기 서열 분석으로 시험하였다. 16S rRNA methylase와 *qnr* 유전자 양성인 균주의 유전적 연관성을 규명하기 위해 pulsed-field gel electrophoresis를 시행하였다.

16S rRNA methylase는 2007년 4월부터 6월에 세브란스병원에서 분리된 임상 균주 중, *E. coli* 2주 (<1%), *K. pneumoniae* 24주 (11%), *K. oxytoca* 1주 (2%), *Citrobacter* 4주 (10%), *Enterobacter* 2주 (4%), *S. marcescens* 2주(4%), *Achromobacter xylosoxidans* 1주 (20%), *Acinetobacter* 11주 (10%) 및 *S. maltophilia* 1주 (2%)에서 검출되었고, 2006년 7월부터 2007년 6월에 명지병원에서 분리된 균주에서는, *E. coli* 8주 (1%), *K. pneumoniae* 51주 (21%), *Citrobacter* 3주 (8%), *Enterobacter* 2주 (2%), *S. marcescens* 4주(8%), *P. mirabilis* 2주 (4%), *P. aeruginosa* 1주 (<1%)에서 확인되었다. *armA*는 세브란스병원 분리주 48주 중 43주 (90%)에서, 명지병원 분리주 75주 중 70주 (93%)에서 양성이었다. *E. coli* 2주, *K. pneumoniae* 2주, *Citrobacter* 균종 2주 및 *Providencia* 균종 3주에서는 *rmtB* 유전자가 분리되었으며, 이 중 4주에서는 동시에 *armA* 유전자가 분리되었다. *armA*와 *rmtB*가 동시에 분리되는 균주는 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 2주 및 *P. rettigeri* 1주였으며, 분리된 환자 사이

에 역학적인 연관성은 없었다. *A. xylosoxidans* 1주에서는 *rmtA* 유전자가 양성이었다. 16S rRNA methylase 생성 *Enterobacteriaceae*의 cefoxitin 및 levofloxacin에 대한 내성율은 85% 및 81%로 음성인 균주의 68% 및 36% 보다 높았다. 16S rRNA methylase를 생성하는 균주에 대한 aminoglycoside 항균제의 MIC는 모두 >128 µg/mL으로 높았고 감수성인 균주는 없었다. 16S rRNA methylase 생성 *K. pneumoniae*의 ESBL 및 PABL 양성율은 59% 및 92%로 음성 균주의 43% 및 64%에 비해서 높았으며, 특히 16S rRNA methylase를 생성하는 *K. pneumoniae*의 91%가 *qnrB*를 동시에 가지고 있었다. Plasmid-mediated quinolone efflux pump를 생성하는 *qepA* 유전자는 *rmtB* 유전자 양성인 *E. coli* 및 *C. freundii*와 16S rRNA methylase 음성인 1주의 *E. coli*에서 양성이었다. 16S rRNA methylase 양성인 *Pseudomonas* 및 *Acinetobacter* 균종에서 metallo-β-lactamase를 생성하는 균주는 없었다. 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 유전적 연관성을 알아보기 위해 시행한 PFGE에서는 다양한 양상을 보였다.

이상으로, 국내에서 16S rRNA methylase 유전자에 의한 aminoglycoside 고도 내성인 그람음성 간균은 외국에 비하여 흔하였고, 여러 균종에 널리 퍼져 있으며, 유전적 구조도 다양한 것으로 판단된다. 또한 이들 균주들은 ESBL, PABL 및 *qnrB* 같은 내성 유전자를 동시에 갖는 경우가 흔하였다.

핵심되는 말 : 16S rRNA methylase, *armA*, *rmtB*, aminoglycoside, 그람음성 간균

<본 문>

16S rRNA methylase 생성 그람음성 간균의
내성 양상과 분자유전학적 특성

<지도교수 이경원>

연세대학교 대학원 의학과

이 혁 민

I. 서론

그람음성 간균은 중요한 지역사회 및 원내 감염균으로, *Escherichia coli* 및 *Klebsiella pneumoniae* 등을 포함하는 *Enterobacteriaceae*와 *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Acinetobacter* 균종을 포함하는 포도당 비발효성 그람음성 간균 등의 다양한 균종으로 이루어져 있다. 그람음성 간균에 의한 감염증의 치료에는 세균의 penicillin-binding protein에 결합하여 항균 작용을 나타내는 β -lactam 항균제, 세균의 DNA gyrase와 topoisomerase에 결합하여 DNA 합성을 저해하는 fluoroquinolone 항균제 및 세균 ribosome의 30S subunit에 불가역적으로 결합하여 mRNA의 번역을 방해하고, peptide 연장을 저해함으로써, 살균 작용을 나타내는 aminoglycoside 항균제가 주로 사용되나, 근래에 이들 항균제에 대한 내성이 증가하여 임상적으로 큰 문제가 되고 있다. 2003년에 국내 44개 병원에서 수집하여 분석한 내성을 자료에 의하면¹, *K. pneumoniae*의 항균제 내성율은 ceftazidime 25%, cefoxitin 23%, fluoroquinolone 19% 및 amikacin 13%로, 1997년의

25%, 16%, 7% 및 8%에 비해 일부 증가하거나 여전히 높았다. *Acinetobacter* 균종의 항균제 내성율은 2003년도에 ceftazidime 54%, imipenem 13%, fluoroquinolone 58% 및 amikacin 56%로 외국에 비하여 높았다. 국내의 높은 항균제 내성율 중, β -lactam 항균제와 aminoglycoside 항균제에 대한 내성은 extended-spectrum β -lactamase (ESBL), plasmid-mediated β -lactamase (PABL) 및 metallo- β -lactamase (MBL) 같은 다양한 β -lactam 항균제 분해 효소와 aminoglycoside를 불활화하는 AAC(6')-I 등의 aminoglycoside-modifying enzyme의 확산에 의한 것으로 보고되었다².

Aminoglycoside-modifying enzyme은 임상 검체에서 분리되는 aminoglycoside 내성균에서 가장 흔한 내성 기전으로, acetyltransferase (AAC), phosphotransferase (APH) 및 adenytransferase (ANT 또는 AAD)의 3 종류가 있으며 작용하는 아미노기 또는 hydroxyl기의 위치에 따라 AAC(6')과 같이 표기한다². 각각의 효소는 다시 불활성화하는 항균제의 특이성에 따라서 AAC(6')-I 등과 같은 subgroup으로 분류되며, 임상 검체에서 분리되는 aminoglycoside 내성균은 생성하는 수식 효소의 종류에 따라, 내성을 보이는 aminoglycoside의 종류가 다르고, arbekacin에 고도 내성을 일으키는 효소는 아직까지 보고된 바 없다. 그러나 최근 들어 arbekacin 및 amikacin을 포함한 임상적으로 유용한 모든 aminoglycoside에 고도 내성을 일으키는 내성 기전이 보고되었다³⁻⁴. 새로운 내성 기전은 16S rRNA methylase 유전자로부터 생성된 methylase가 aminoglycoside제의 작용 표적인 30s ribosome을 구성하는 16S rRNA를 methylation하여 amikacin 및 gentamicin을 포함한 모든 4,6-disubstituted deoxystreptamine 항균제에 고도 내성을 보이는 것

으로, plasmid를 통해 다른 균주로 쉽게 전달된다. 그람음성 간균에서 16S rRNA methylase를 생성하는 내성 유전자로는 최근까지 *Serratia marcescens*에서 *armA*³, *P. aeruginosa*에서 *rmtA*⁴, *S. marcescens*에서 *rmtB*⁵, *P. mirabilis*에서 *rmtC*⁶가 각각 보고되었으며, 브라질에서는 metallo- β -lactamase의 일종인 SPM-1을 가진 *P. aeruginosa*에서 *rmtD*⁷가 보고되었다.

새로운 내성 기전에 대한 역학적인 조사는 매우 드물지만, Yan 등은 2004년에 대만에서 분리된 *E. coli* 2,559주와 *K. pneumoniae* 1,624주를 대상으로 16S rRNA methylase 유전자 검출을 시험하여, *armA* 양성 균주와 *rmtB* 양성 균주가 *E. coli* 중 각각 12주와 2주, *K. pneumoniae* 중 각각 16주와 5주 있었고, 16S rRNA methylase를 생성하는 균주 중, CTX-M, TEM 또는 SHV 등의 ESBL이나, CMY-2 등의 PABL을 생성하는 균주가 혼함을 보고하였고⁸, 임상 검체에서 분리된 16S rRNA methylase를 생성하는 많은 균주가 carbapenem을 제외한 대부분의 β -lactam, aminoglycoside 및 fluoroquinolone 항균제에 다제 내성을 보인다고 하였다. 국내에서는 일부 제한된 균종에서 16S rRNA methylase에 대한 보고가 있었다. 이 등은 2003년과 2005년에 국내의 일개 대학 병원에서 수집한 일부 균주를 대상으로 시행한 연구에서, *armA* 유전자에 의한 aminoglycoside 고도 내성이 국내에도 드물지 않고, 대부분이 ESBL과 PABL 양성이면서 levofloxacin에 내성인 것을 보고하였다⁹.

한편, quinolone 항균제의 내성 기전은 크게 DNA gyrase와 topoisomerase IV의 변이에 의한 것과 능동적인 유출에 의한 것이 있다. 이 두 가지 기전은 모두 세균 염색체의 변이에 의해 일어나고 수직으로 전달되며, 전이성 인자에 의해서는 전달되지 않는다¹⁰. 그러나

최근 plasmid에 의해 전달되는 fluoroquinolone 내성 기전이 보고되었는데, Martinez-martinez 등에 의한 *qnr* 내성 기전과 Yamane 등에 의한 plasmid-mediated active efflux pump (*qepA*)이다¹¹⁻¹². 일부 보고에 의하면 *qnr* 내성 기전은 ESBL을 생성하는 세균에서 흔하다고 하였으나¹³, ESBL과 자주 동반되는 16S rRNA methylase와의 관계에 대해서는 명확하지 않으며, *qepA*에 의한 fluoroquinolone 내성은 16S rRNA methylase에 의한 내성과 연관이 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 없다.

이와 같이 16S rRNA methylase 생성 균주는 세균 감염증 환자 치료에 유용한 aminoglycoside제와 다른 중요 항균제에 다제 내성을 보여 임상적으로 매우 중요하나 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 서울과 경기도에 소재하는 2차와 3차 병원의 환자에서 분리되는 그람음성 간균 중에서 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 빈도와 그 내성 유전형, 또한 이들 세균 중에 β -lactam제와 fluoroquinolone제 등에 대한 다제 내성 양상을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 균주의 수집

2007년 4월부터 2007년 6월까지 서울에 위치한 세브란스병원과 2006년 7월부터 2007년 6월까지 경기도 화정에 위치한 명지병원에 입원한 환자에서 분리되는 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* 균종 및 *Stenotrophomonas maltophilia*를 대상으로 일련의 분리된 균주 모두를 수집하였으며, 한 환자에서 중복 분리된 균주는 제외하였다.

2. 균종 동정 및 16S rRNA methylase 생성 선별 검사

균종 동정은 전통적인 생화학적 방법과 상품화된 kit를 이용하였다. Arbekacin에 대한 감수성 선별은 arbekacin 디스크 (30 µg, Eiken Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 Clinical Laboratory Standards and Institute (CLSI) 디스크 확산법으로 시행하였고¹⁴, 디스크 억제대가 ≤13 mm 이면 내성으로, 억제대가 없으면 고도 내성으로 간주하였다⁹.

3. 항균제 감수성 시험

항균제 감수성은 CLSI 한천 희석법으로 시험하였다. 감수성 시험용 배지는 Mueller-Hinton II 배지 (BBL, Cockeysville, MD, USA)를 사용하였고, 항균제는 ceftazidime (GlaxoSmithKline, Greenford, United Kingdom), cefoxitin 및 imipenem (Merck/Sharp & Dohme, Rahway, NJ, USA), levofloxacin (Daiichi pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan), arbekacin (Meiji Seika, Tokyo, Japan), amikacin (Dong-A Pharmaceutical, Seoul, Korea), gentamicin 및 tobramycin (Dong Wha Pharmaceutical, Seoul,

Korea)을 사용하였다. 순배양한 시험 세균을 Steers replicator (Craft Machine Inc., Woodline, PA, USA)를 사용하여 약 10^4 colony forming unit을 접종한 후, 35°C에서 배양 후에 판독하여 minimum inhibitory concentration (MIC)을 결정하였다. Arbekacin의 breakpoint는 ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 감수성, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 중간, ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 내성으로 정하였고, 정도관리를 위해서 *E. coli* ATCC 25922 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853 균주를 동시에 시험하였다.

4. β -lactam 항균제 내성

가. Extended-spectrum β -lactamase 생성 시험

Cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 항균제의 억제대 지름이 각각 ≤ 27 mm, ≤ 22 mm 및 ≤ 27 mm 이면 ESBL 생성 균주를 의심하였다. ESBL 생성 균주가 의심되면 double disk synergy (DDS) 시험으로 ESBL 생성을 확인하였다. 즉, ESBL 생성이 의심되는 시험 세균을 McFarland 0.5 탁도로 Mueller-Hinton II 한천에 접종하고, amoxicillin-clavulanic acid (20/10 μg)를 중앙에 놓고 디스크 가장자리로부터 10 mm 되게 cefotaxime, ceftazidime, cefepime 등의 디스크를 놓은 후에, 디스크에 의한 억제대가 상승 작용에 의하여 확장되는 경우 양성으로 판단하였다.

나. Plasmid-mediated AmpC β -lactamase 생성 시험

*E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 PABL 생성 여부를 선별하기 위하여 cefoxitin 항균제의 MIC를 시험하였다. *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 AmpC β -lactamase가 발현되지 않거나 없으므로, cefoxitin에 대해서 내성인 균주는 PABL을 생성하는 것으로 판정하였다.

다. Carbapenemase 생성 시험

(1) Imipenem-Hodge 변법

지시 세균인 *E. coli* ATCC 25922를 McFarland 0.5관 탁도로 맞추고 Mueller-Hinton II 한천에 면봉으로 고루 접종하였다. 물기가 마른 뒤에 배지 중앙에 imipenem 디스크의 놓을 자리를 정하고 그곳으로부터 배지 접시 가장자리를 향해 carbapenemase 생성이 의심되는 시험세균을 진하게 희석 접종하였다. 35°C에 15분간 두었다가 imipenem 디스크를 중앙에 놓고 하루 밤 배양 후, 지시 세균의 억제대 안에 있는 시험 세균의 증식선에 따라서 지시 세균의 억제대가 들어가면 양성으로 판독하였다.

(2) Imipenem-EDTA+SMA DDS법

Carbapenemase 생성이 의심되는 세균을 식염수를 써서 McFarland 0.5관의 탁도로 희석하고 Mueller-Hinton II 한천에 면봉으로 접종하였다. 표면이 마른 뒤에 imipenem 디스크를 놓고, 적당한 두께의 여과지로 만들어 멸균한 디스크를 그 가장자리 사이의 거리가 10 mm 되게 놓은 후에, 빈 디스크에 0.5 M EDTA+SMA 용액 10 µL를 넣었다. 하루 밤 배양 후에 두 디스크 사이의 억제대가 커지면 양성으로 판독하였다.

5. 16S rRNA methylase 유전자 검출

Arbekacin 디스크 확산법에서 내성인 균주를 대상으로, 16S rRNA methylase 유전자 (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD*)를 PCR로 검출하였다(Table 1). 백금침으로 시험 세균을 채취하여 200 µl의 증류수에 부유한 뒤에 8분간 끓이고 2분간 13,000 rpm으로 원심분리한

상청액을 template로 사용하였다. 상청액 1 µl, 20 pmol의 primer 각각 1 µl, 1 U의 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 PreMix (Bioneer, Daejeon)에 증류수를 첨가하여 총 20 µl가 되게 하여 PCR을 시행하였다. 증폭은 Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하였고, 조건은 predenaturation 94°C 5분, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C (*armA*, *rmtA*, *rmtB*; Multiplex), *rmtC* 55°C 및 *rmtD* 62°C 30초, extension 72°C 1분의 조건으로 모두 동일하였다. PCR 증폭 산물은 1%의 agarose gel 100 ml에 0.005%의 농도로 ethidium bromide를 첨가하여 만든 gel에서 10 x loading buffer (Takara, Otsu, Japan) 1 µl를 첨가하여 Mupid system (Seoulin Bioscience, Seoul)으로 100 V에서 30분간 전기 영동하였다. 증폭 산물의 크기를 비교하기 위해서는 100 bp의 DNA ladder (Takara)를 사용하였고, band는 UVI pro (Uvitec Ltd., Cambridge, England)로 관찰하였다. 일부 균주는 필요에 따라서 gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하고 ABI 3700 장비 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.)로 methylase 유전자의 염기서열을 분석하여, methylase의 종류를 확인하고, 유전적인 변이형 (Genetic variant)이 존재하는 지를 선별하였다.

6. Plasmid-mediated quinolone 내성 유전자 검출

Plasmid에 의해 전달되는 quinolone 내성 유전자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 및 *qepA*를 PCR로 검출하였다¹⁵. DNA는 16S rRNA methylase를 검출하기 위해 추출한 것을 사용하였다. 상청액 1 µl, 20 pmol의 primer 각각 1 µl, 1 U의 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 PreMix (Bioneer)에 증류수를 첨가하여 총 20 µl가 되게 하여 PCR을 시행하

였다. 증폭은 Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하였고, 조건은 predenaturation 94°C 5분, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C (*qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS*: Multiplex), 및 *qepA* 61°C 30초, extension 72°C 1분의 조건으로 시행하였다. 일부 균주에서는 ABI 3700 장비로 염기 서열을 분석하여 유전형질을 확인하였다.

7. 16S rRNA methylase 생성 균주의 분자유전학적 연관성 규명

16S rRNA methylase를 생성하는 균주를 균종별로 모아 염색체 DNA를 추출한 후, 제한 효소로 절단하여 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 시행하여 clonality를 확인하였다. 실험 균주들을 각각 LB broth 5 ml에 접종하고 20시간 배양한 뒤, Lysozyme (10 mg/mL) 1 µl와 2% Incert agarose (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, U.S.A.) 140 µl를 섞어 mold에 넣고 굳힌 후에 4°C에 보관하였다. Plug를 mold에서 떼어낸 후, lysis solution 1 ml와 lysozyme 1 µl를 넣고 1시간 동안 rotator (Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL, U.S.A.)로 회전시키면서 용균하였다. TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)을 사용하여 lysozyme을 제거한 후에 *Xba*I (Takara) 제한 효소 30 U을 사용하여 DNA를 절단하였다. EDTA 100 µl를 사용하여 제한 효소의 작용을 중단시키고, 1% agarose gel (Sigma)을 사용하여, 전기 영동을 시행하였다. 전기 영동은 CHEF DR II (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)을 사용하여 6 V에서 시작 0.5초, 마지막 30초의 조건으로 시행하였다. Ethidium bromide 0.5 µl/ml로 30분간 염색한 후 UVI pro (Uvitec, Ltd.)로 band를 확인하였다.

Table 1. Primers used for PCR detection of 16S rRNA methylase genes, *qnr*, and *qepA* genes

Name	Nucleotide Sequence (5' -> 3')	Product size(bp)	GenBank Accession No.
<i>armA</i> F	AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG	590	AB116388
<i>armA</i> R	TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC		
<i>rmtA</i> F	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC	635	AB083212
<i>rmtA</i> R	TTT GCT TCC ATG CCC TTG CC		
<i>rmtB</i> F	CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC	584	AB103506
<i>rmtB</i> R	CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC		
<i>rmtC</i> F	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG	711	AB194779
<i>rmtC</i> R	ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT		
<i>rmtD</i> F	ATG AGC GAA CTG AAG GAA AAA CTG C	532	DQ914960
<i>rmtD</i> R	GCT CCA AAA GCG GCA GCA CCT TA		
<i>qnrA</i> F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580	qnrA1 - qnrA6*
<i>qnrA</i> R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
<i>qnrB</i> F	GGA ATT GAA ATT CGC CAC TG	264	qnrB1 - qnrB6*
<i>qnrB</i> R	TTT GCC GCC CGC CAG TCG AA		
<i>qnrS</i> F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428	qnrS1 - qnrS2*
<i>qnrS</i> R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG		
<i>qepA</i> F	CCG ACA GGC CCA CGA CGA GGA TGC	549	AB263754
<i>qepA</i> R	TCG GCG GCG TGT TGC TGG AGT TCT		

* Primers designed for multiplex PCR of various *qnr* genes by Cattoir V, et al¹⁵.

Ⅲ. 결과

1. 16S rRNA methylase 양성율

2006년 7월부터 2007년 6월 사이에 명지병원에서는 134주, 2007년 4월부터 6월 사이에 세브란스병원에서는 83주의 arbekacin 내성 그람 음성 간균이 분리되었다. 16S rRNA methylase 양성 균주는 세브란스병원 분리주 중, *E. coli* 2주 (<1%), *K. pneumoniae* 24주 (11%), *K. oxytoca* 1주 (2%), *Citrobacter* 균종 4주 (10%), *Enterobacter* 균종 2주 (4%), *S. marcescens* 2주(4%), *A. xylosoxidans* 1주 (20%), *Acinetobacter* 균종 11주 (10%) 및 *S. maltophilia* 1주 (2%)이었고, 명지병원 분리주 중에서는, *E. coli* 8주 (1%), *K. pneumoniae* 51주 (21%), *Citrobacter* 균종 3주 (8%), *Enterobacter* 균종 2주 (2%), *S. marcescens* 4주(8%), *P. mirabilis* 2주 (4%), *P. aeruginosa* 1주 (<1%)이었다. 그람음성 간균 전체에 대한 양성율은 세브란스병원 4% 및 명지병원 5%이었다(Table 2).

Table 2. The rates of 16S rRNA methylase-producing isolates in Severance and Myongji hospital from 2006 to 2007

Bacterial species	Severance Hospital			Myongji Hospital		
	No. isolated	Arbekacin Screening Positive	Methylase Positive (%)	No. isolated	Arbekacin Screening Positive	Methylase Positive (%)
<i>E. coli</i>	416	3	2 (<1)	646	11	8 (1)
<i>K. pneumoniae</i>	215	29	24 (11)	245	60	51 (21)
<i>K. oxytoca</i>	44	1	1 (2)		ND	
<i>Citrobacter</i> spp	45	4	4 (10)	37	3	3 (8)
<i>Enterobacter</i> spp	52	3	2 (4)	129	3	2 (2)
<i>S. marcescens</i>	48	3	2 (4)	52	5	4 (8)
<i>P. mirabilis</i>		ND		57	2	2 (4)
<i>M. morgani</i>		ND		27	1	1 (4)
<i>Providencia</i> spp		ND		21	3	3 (14)
<i>A. xylosoxidans</i> *	5	1	1 (20)		ND	
<i>P. aeruginosa</i>	248	9	0 (0)	257	14	1 (<1)
<i>Acinetobacter</i> spp	112	13	11 (10)		ND	
<i>S. maltophilia</i>	66	17	1 (2)		ND	
Total	1251	83	48 (4)	1471	134	75 (5)

* *A. xylosoxidans*: *rmtA* positive.

Abbreviations: ND, Not determined.

2. 16S rRNA methylase 유전형 분포

16S rRNA methylase 양성 균주 중에서 가장 흔한 것은 *armA*이었다. 세브란스병원 분리주 48주에서 43주 (90%), 명지병원 분리주 75주에서 70주 (93%)가 *armA* 양성이었다. *E. coli* 2주, *K. pneumoniae* 2주, *Citrobacter* 균종 2주 및 *Providencia* 균종 3주에서는 *rmtB* 유전자가 검출되었으며, 이 중 4주에서는 동시에 *armA* 유전자가 검출되었다. *armA*와 *rmtB*가 동시에 분리되는 균주는 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 2주 및 *P. rettigeri* 1주였으며, 균종별 및 분리 병원별 분포가 다양하였고, 분리된 환자 간의 역학적 연관성은 없는 것으로 판단되었다. *A. xylosoxidans* 1주에서는 *rmtA* 유전자가 양성이었다. 유전자의 변이형을 선별하기 위해서 세브란스병원에서 분리된 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 2주, *C. freundii* 1주, *A. baumannii* 1주 및 *S. maltophilia* 1주와 명지병원에서 분리된 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 3주, *C. freundii* 1주, *P. rettigeri* 1주, *M. morgani* 1주 및 *P. aeruginosa* 1주에서 *armA* 유전자 염기 서열을 분석하였으나 모든 균주에서 동일한 염기 서열을 보였다. *rmtB* 유전자가 검출된 9주에 대해서도 유전자를 증폭하여 염기 서열을 분석하였으나, 염기 서열의 변이는 관찰되지 않았다(Table 3).

Table 3. Distribution of 16s rRNA methylase in gram-negative bacilli

Bacterial species	Severance hospital			Myongji hospital		
	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>armA+rmtB</i>	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>armA+rmtB</i>
<i>E. coli</i>	0	1	1	8	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	24	0	0	49	0	2
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0		ND	
<i>Citrobacter</i> species	2	2	0	3	0	0
<i>Enterobacter</i> species	2	0	0	2	0	0
<i>S. marcescens</i>	2	0	0	4	0	0
<i>P. mirabilis</i>		ND		2	0	0
<i>M. morgani</i>		ND		1	0	0
<i>Providencia</i> species		ND		0	2	1
<i>A. xylosoxidans</i> *	0	0	0		ND	
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Acinetobacter</i> species	11	0	0		ND	
<i>S. maltophilia</i>	1	0	0		ND	
Total	43	3	1	70	2	3

* *A. xylosoxidans*: *rmtA*-positive.

Abbreviation: ND, Not determined.

3. 16S rRNA methylase 생성 균주의 항균제 내성 양상

16S rRNA methylase를 생성하는 균주 중, *Enterobacteriaceae*에 속하는 133주와 *P. aeruginosa* 9주 및 *Acinetobacter* 균종 13주를 대상으로 항균제 감수성을 시험하였다. 16S rRNA methylase를 생성하는 *Enterobacteriaceae*에 대한 ceftazidime, cefoxitin 및 imipenem의 MIC₉₀은 >128 µg/mL, >128 µg/mL 및 4 µg/mL로 16S rRNA methylase 음성 균주의 >128 µg/mL, 128 µg/mL 및 1 µg/mL과 비슷하였으나, 내성율은 16S rRNA methylase 양성 균주에서 각각 66%, 85% 및 4%로 16S rRNA methylase 음성인 균주의 63%, 68% 및 0% 보다 높았다. 16S rRNA methylase 양성인 *Enterobacteriaceae*의 levofloxacin에 대한 내성율은 81%로 음성인 균주의 36%와 비교하여 매우 높았다. Aminoglycoside에 대해서는 16S rRNA methylase 양성인 균주는 arbekacin, amikacin, gentamicin 및 tobramycin의 MIC가 모두 128 µg/mL 이상이었으나, 음성인 균주는 arbekacin 및 amikacin에 50%의 균주가 감수성이었다. 16S rRNA methylase 양성인 *P. aeruginosa*와 *Acinetobacter* 균종 중에서 ceftazidime에 감수성이었다. 16S rRNA methylase를 생성하지 않고 arbekacin에 내성인 균주의 45%가 ceftazidime에, 72%가 imipenem에 내성인 것과 차이를 보였다. 16S rRNA methylase 음성인 균주의 levofloxacin에 대한 MIC₉₀과 내성율은 각각 128 µg/mL과 90%로 양성인 균주의 32 µg/mL과 63%에 비교하여 높았다. 16S rRNA methylase 양성인 균주의 aminoglycoside 항균제에 대한 MIC가 모두 >128 µg/mL으로 *Enterobacteriaceae*와 마찬가지로 높았고 감수성이었다 (Table 4).

Table 4. Comparisons of MICs ($\mu\text{g/mL}$) of antibiotics for 16S rRNA methylase-positive and -negative gram-negative bacilli

Antimicrobial agents	16S rRNA methylase-positive				16S rRNA methylase-negative			
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
<i>Enterobacteriaceae</i> (133)								
Ceftazidime	0.12 - >128	64	>128	66	1 - >128	32	>128	63
Cefoxitin	0.5 - >128	>128	>128	85	8 - >128	32	>128	68
Imipenem	0.06 - 32	0.25	2	4	≤ 0.06 - 4	0.25	1	0
Levofloxacin	0.06 - >128	64	128	81	0.12 - >128	2	128	36
Arbekacin	>128	>128	>128	100	2 - >128	16	>128	50
Amikacin	>128	>128	>128	100	8 - >128	16	>128	50
Gentamicin	>128	>128	>128	100	8 - >128	128	>128	100
Tobramycin	>128	>128	>128	100	32 - >128	64	>128	100
<i>Pseudomonas</i> (9) and <i>Acinetobacter</i> (13)								
Ceftazidime	128 - >128	>128	>128	100	2 - >128	16	>128	45
Imipenem	1 - 8	4	4	0	1 - 32	16	32	72
Levofloxacin	4 - 64	8	32	63	2 - >128	64	128	90
Arbekacin	>128	>128	>128	100	2 - >128	64	>128	63
Amikacin	>128	>128	>128	100	4 - >128	64	>128	90
Gentamicin	>128	>128	>128	100	2 - >128	>128	>128	90
Tobramycin	>128	>128	>128	100	0.5 - >128	128	>128	90

4. 16S rRNA methylase 생성 균주의 다제내성 양상

16S rRNA methylase 양성 *E. coli*의 ESBL, PABL 및 *qnr* 양성율은 각각 70%, 70% 및 30%로, 음성 균주의 50%, 25% 및 0%와 비교하여 높았으나, 균주 수가 각각 10주와 4주로 적었다. *K. pneumoniae*의 ESBL 및 PABL 양성율은 16S rRNA methylase 양성 균주에서 59% 및 92%로, 음성 균주의 43% 및 64%에 비해서 높았으며, 특히 16S rRNA methylase를 생성하는 *K. pneumoniae*의 91%가 *qnrB*를 동시에 가지고 있었다(Table 5). 기타 *Enterobacteriaceae*에서도 methylase의 유무에 따른 ESBL 생성율은 양성 균주 중, 50% 및 음성 균주 중, 25%로 양성 균주가 높았으며, *qnr* 양성율도 각각 43% 및 25%이었다. *qnr* 양성인 *K. pneumoniae*는 음성 균주에 비해 MIC₅₀, MIC₉₀이 2-4배 높았으며, 내성율은 각각 87% 및 70%이었다(Table 6). 기타 *Enterobacteriaceae* 균종에서 *armA*를 생성하는 균주는 26주였으며, *qnrB*를 동시에 생성하는 균주는 9주 (35%)이었고, 그중 7주가 *Citrobacter* 균종에 속하였다. Plasmid-mediated quinolone efflux pump인 *qepA* 유전자는 *rmtB* 유전자 양성인 *E. coli* 및 *C. freundii*와 16S rRNA methylase 음성인 1주의 *E. coli*에서 양성이었다(Table 5), 3주 모두의 염기 서열은 문헌에 보고된 것과 100% 일치하였으며, 각각의 유전적 연관성은 없는 것으로 생각되었다. 16S rRNA methylase 양성인 *Pseudomonas* 및 *Acinetobacter* 균종에서 metallo-β-lactamase를 생성하는 균주는 없었다.

5. 16S rRNA methylase 생성 균주의 유전적 연관성

16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 유전적 연관성을 알아보기 위해 세브란스병원과 명지병원에서 분리된 *E. coli*와 *K.*

*pneumoniae*를 대상으로 PFGE를 시행하였다. 8주의 *E. coli*는 A-G의 7개의 유형과 1개의 아형으로 분류되었으며, 각 병원과 분리주 간에 유전적인 연관성이 없었다. 17주의 *K. pneumoniae*는 A-J의 10개의 유형과 1개의 아형으로 분류되었다. C 유형과 G 유형은 세브란스병원 분리주와 명지병원 분리주에서 모두 관찰되었으나 역학적인 조사에서 연관성은 없었다. *armA*와 *qnrB* 양성인 *K. pneumoniae*는 세브란스병원 분리주에서 A, B, C, E 및 G 유형이었고, 명지병원 분리주에서는 C, G1, I, J, K, L 및 J 유형으로 다양하여 군주 간의 유전적인 연관성은 없는 것으로 생각되었다.

Table 5. Comparisons of the rates of β -lactam resistance and quinolone resistance in 16S rRNA methylases-positive and -negative gram-negative bacilli

Bacterial species (No. of isolates)	No. (%) of other resistance mechanisms					
	ESBL	PABL	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i> *
16S rRNA methylase-positive						
<i>E. coli</i> (10)	7 (70)	7 (70)	0 (0)	2 (20)	1 (10)	1 (10)
<i>K. pneumoniae</i> (75)	44 (59)	69 (92)	1 (2)	68 (91)	0	0
Other <i>Enterobacteriaceae</i> (26)	13 (50)	NT	2 (8)	9 (35) ^{\$}	0	1 (4)
<i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Acinetobacter</i> spp. (12)	0 [#]	NT	0	1 (8)	0	0
16S rRNA methylase-negative						
<i>E. coli</i> (4)	2 (50)	1 (25)	0	0	0	1 (25)
<i>K. pneumoniae</i> (14)	6 (43)	9 (64)	0	8 (57)	1 (7)	0
Other <i>Enterobacteriaceae</i> (4)	1 (25)	NT	0	1 (25)	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Acinetobacter</i> spp. (11)	NT	NT	0	4 (36)	0	0

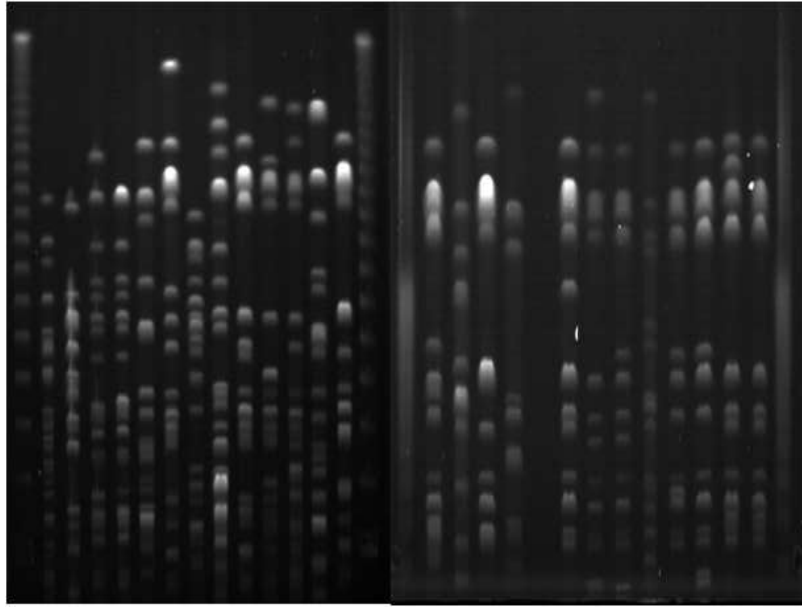
* 2 of 3 *qepA*-positive strains were *rmtB*-positive strains.

\$ 7 *qnrB*-positive strains were *Citrobacter* species.

Metallo- β -lactamase production tested in *P. aeruginosa*.

Table 6. Comparisons of levofloxacin MICs in *qnr*-positive and -negative gram-negative bacilli

Bacterial species (No. of isolates)	MICs of levofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)			
	Range	50	90	%R
<i>qnr</i> -positive				
<i>K. pneumoniae</i> (79)	0.12 - >128	64	128	87
Other gram-negative bacilli (103)	0.12 - >128	64	128	84
<i>qnr</i> -negative				
<i>K. pneumoniae</i> (10)	≤ 0.06 - >128	16	64	70
Other gram-negative bacilli (69)	0.12 - 64	4	64	46



PFGE type	Hospital	Strain No.	Species	Methylase	<i>qnr</i> gene
A	S	77	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	Negative
B	S	31	<i>E. coli</i>	Negative	Negative
C	M	1	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	Negative
C1	M	8	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
D	M	16	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	Negative
E	M	28	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	Negative
F	M	31	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
G	M	48	<i>E. coli</i>	<i>armA</i>	Negative
A	S	3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
B	S	7	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
C	S	11	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
D	S	33	<i>K. pneumoniae</i>	Negative	<i>qnrB</i>
A	S	37	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>

PFGE type	Hospital	Strain No.	Species	Methylase	<i>qnr</i> gene
E	S	43	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
F	S	44	<i>K. pneumoniae</i>	Negative	Negative
G	S	45	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
H	S	71	<i>K. pneumoniae</i>	Negative	Negative
			Failed		
G1	M	43	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
C	M	57	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	Negative
C1	M	61	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
I	M	78	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
J	M	81	<i>K. pneumoniae</i>	Negative	<i>qnrB</i>
K	M	83	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
L	M	84	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>
J	M	87	<i>K. pneumoniae</i>	<i>armA</i>	<i>qnrB</i>

Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis pattern of *armA* and *qnrB*-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates showed polyclonal patterns.

IV. 고찰

Aminoglycoside 항균제는 다양한 그람 양성과 음성 세균에 효과적인 항균제로 주요 감염 질환에 널리 사용되고 있으며, 구성 성분 중 cyclitol의 종류에 따라서 streptomycin 등의 streptidine 항균제와 kanamycin 및 gentamicin 등의 deoxystreptamine 항균제 등으로 분류된다². 세균의 aminoglycoside 내성 기전에는 작용 표적인 ribosome의 돌연변이¹⁶, 막 투과성의 저하¹⁷ 또는 active efflux¹⁸ 및 aminoglycoside의 일부 구조를 변경시켜 약제를 불활성화하는 aminoglycoside-modifying enzyme의 생성 등이 알려져 있었으나, 근래에 16S rRNA methylase에 의한 aminoglycoside 내성 기전이 보고되었다.

16S rRNA methylase에 의한 aminoglycoside 내성은 aminoglycoside를 합성하는 *Actinomycetes* 균종에서 처음 발견되었으며, 세균이 생성하는 aminoglycoside 항균제로부터 자신을 보호하는 역할을 한다. *Actinomycetes* 균종에 의해 생성되는 16S rRNA methylase는 N1 지역의 A1408 부위를 methylation하여, gentamicin을 제외한 kanamycin 및 tobramycin 등에 대한 내성을 유발하는 것과 N7 지역의 G1405 부위를 methylation하여 arbekacin, amikacin 및 gentamicin을 포함한 모든 4,6-disubstituted deoxystreptomine 항균제에 대한 고도 내성을 일으키는 것으로 분류된다¹⁹⁻²¹. 최근까지 16S rRNA methylation에 의한 aminoglycoside 내성은 그람음성 간균에 존재하지 않는 것으로 생각되었으나, Galimand 등에 의해서 *armA*가 Yokoyama 등에 의해서 *rmtA*가 각각 보고되었고³⁻⁴, 현재까지 보고된 모든 16S rRNA methylase는 N7 지역의 G1405 부위를 methylation하는 것으로 알려져 있다. 그람음성 간균에서 분리된 16S rRNA

methylase의 기원에 대해서는 아직 명확하지 않으나, 가장 처음 보고된 *armA*와 *Actinomycetes* 균종에서 보고된 16S rRNA methylase의 상동성이 37-47%로 상이하고, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* 및 *rmtD* 역시 마찬가지로 기존의 16S rRNA methylase와는 낮은 상동성을 나타내는 것으로 보아 알려지지 않은 기원으로부터 유래되었을 것으로 생각되고 있다³⁻⁷.

16S rRNA methylase 유전자의 전이에 대해서는 아직 알려진 바가 많지 않다. Galimand 등은 유럽 각지에서 분리된 다양한 *Enterobacteriaceae*에 *armA* 유전자가 존재하며, 내성 유전자가 IncL/M plasmid의 Tn1548에 위치하여 그람 음성 간균 사이에서 쉽게 전파될 수 있음을 보고하였다²¹. *rmt* 유전자 역시 일부에서 전이가 가능한 유전자 구조에 위치함이 알려졌는데, Yamane 등은 *rmtA* 유전자가 Tn5041 같은 일부 유전자 구조에 의해서 다른 균주로 전달됨을²², Wachino 등은 *rmtC*의 전파에 IS*EcpI*이 관여함을 보고하였다²³. 이러한 여러 내성 전달 기전에도 불구하고 16S rRNA methylase의 역학적 분포에 관한 보고는 많지 않다. Yan 등은 2004년에 대만에서 분리된 *E. coli* 2,559주와 *K. pneumoniae* 1,624주를 대상으로 *armA* 양성 균주와 *rmtB* 양성 균주가 *E. coli* 중 각각 12주와 2주, *K. pneumoniae* 중 각각 16주와 5주가 있었고, 양성율은 *E. coli* 0.5% 및 *K. pneumoniae* 1.3%로 보고하였다⁸. Bogaerts 등은 2000년부터 2005년 사이에 벨기에의 2개 병원에서 수집한 15,386주의 그람 음성 간균을 대상으로 시행한 연구에서 *K. pneumoniae* 10주, *E. coli* 4주, *E. cloacae* 1주, *E. aerogenes* 2주 및 *C. amalonaticus* 1주에서 *armA* 유전자를 *E. coli* 1주에서 *rmtB* 유전자를 검출하여 총 19주 (0.12%)의 16S rRNA methylase 생성 균주를 보고하였다²⁴. 또한 Yamane 등

은 일본 전역의 169개 병원에서 수집한 87,626주의 그람음성 간균 중, *P. aeruginosa* 14주 (0.08%), *E. coli* 3주 (0.02%), *Klebsiella* 균종 1주 (0.008%), *Enterobacter* 균종 2주 (0.03%), *Acinetobacter* 균종 4주 (0.13%) 및 *Proteus* 균종 2주 (0.08%)에서 26주 (0.03%)가 16S rRNA methylase를 생성하였고, 유전형 분포는 *rmtA* 14주, *armA* 9주, *rmtB* 1주 및 *rmtC* 2주이었음을 보고하였다²⁵. 본 연구에서는 2,722주의 그람음성 간균을 시험하여 123주의 16S rRNA methylase 양성 세균을 검출하였고, 양성율은 4.5%로 기존의 보고에 비해 높은 결과를 나타내었다. 특히 *K. pneumoniae*의 양성율이 세브란스병원 11% 및 명지병원 21%로 다른 균종에 비하여 높았으며, 기타 균종의 양성율은 병원별로 0.5%부터 14%까지 다양하였다. 16S rRNA methylase를 생성하는 균종의 종류는 기존에 보고되었던 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii* 및 *Acinetobacter* 균종이 대부분이었으나, *C. koseri* (*armA*) 및 *Morganella morganii* (*armA*) 같은 *Enterobacteriaceae*와 *Achromobacter xylosoxidans* (*rmtA*) 및 *S. maltophilia* (*armA*) 같은 포도당 비발효 그람음성 간균에서 처음으로 16S rRNA methylase 유전자를 검출하였다. 이는 국내에서 분리되는 임상 균주의 16S rRNA methylase 생성 균주의 비율이 외국에 비하여 월등히 높을 뿐 아니라, 기존의 보고보다 다양한 균종으로 확산되고 있음을 나타내는 것으로 생각되었다.

PCR 및 염기 서열 분석을 통해 확인한 16S rRNA methylase의 유전형은 123주 중, *armA* 113주 (92%), *rmtA* (0.8%) 및 *rmtB* 5주 (4%)으로, *armA* 유전자가 대부분을 차지하여 이 등⁹ 및 박 등²⁶이 보고와 일치하였고, *rmtA*가 주로 분리되는 일본과는 다르게 *armA*가 혼

한 유럽과 유사한 양상을 나타내었다. 16S rRNA methylase의 유전형이 지리적으로 가까운 일본보다 유럽과 유사한 양상을 나타낸 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 기존에는 국내에서 드물게 보고되던 *rmtB* 유전자^{9, 26}가 9균주 (8%)에서 검출되어 이전에 비해 *rmtB* 유전자의 확산이 증가했음을 알 수 있었다. *rmtB* 유전자의 확산 원인은 다양하나, 최근 중국에서 보고한 바에 의하면 aminoglycoside를 먹이에 혼합하여 사육한 돼지에서 분리된 *E. coli*의 32%가 *rmtB* 유전자를 가지고 있다고 하여²⁷, 환경에서 존재하는 *rmtB* 유전자의 전파를 주의해야할 것으로 생각되었다. 또한 16S rRNA methylase에 관한 기존의 모든 보고에서는 한 균주에서 하나의 16S rRNA methylase 유전자만이 보고되었으나, 본 연구에서는 4균주에서 *armA*와 *rmtB*를 동시에 생성하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 균주의 분자유전학적인 특성에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 유전형의 변이를 관찰하기 위해 10주의 *armA* 양성 균주와 9주의 *rmtB* 양성 균주에 대해 시행한 염기 서열 분석에서는 모두 동일한 염기 서열을 보여, 유전형의 분화는 아직 일어나지 않는 것으로 판단되었다.

16S rRNA methylase를 생성하는 균주는 임상적으로 유용한 모든 aminoglycoside에 고도 내성을 보이는 것 외에도 다양한 항균제에 다제 내성을 보이는 것으로 알려져 있다. 16S rRNA methylase와 흔히 동반되는 내성 기전은 ESBL과 PABL에 의한 β -lactam 항균제 내성이다. Galimand 등에 의하면 유럽에서 분리되는 *armA* 유전자 양성 균주의 모두에서 CTX-M 형의 ESBL 유전자가 검출됨을 알 수 있고²¹, Yan 등의 보고에서도 CTX-M-3, CTX-M14, SHV-5 등의 ESBL 유전자와 CMY-2 같은 PABL 유전자가 높은 빈도로 검출된다고 하

여⁸, 16S rRNA methylase를 생성하는 대부분의 균주가 β -lactam 항균제에 내성임을 보고하였다. Golebiewski 등은 CTX-M-3 유전자와 *armA* 유전자 양성인 균주에 대한 분자유전학적인 분석에서 두 내성 유전자는 동일 plasmid에 존재하지만 멀리 떨어진 위치에 존재함을 보고하였다²⁸. 본 연구에서도 16S rRNA methylase 양성 균주는 ceftazidime 및 cefoxitin에 대한 내성율과 ESBL 생성 양성율이 음성 균주에 비해서 높았다. 국내에서 분리되는 16S rRNA methylase 생성 균주가 CTX-M 형의 ESBL 생성주인지에 대해서는 추가적인 분석이 필요하지만, 국내에서 분리되는 *K. pneumoniae*에서 가장 흔한 ESBL 유전형이 SHV-12으로 외국과는 다른 양상일 수도 있을 것으로 생각된다²⁹. 한편 일부 균종에서는 carbapenemase와 16S rRNA methylase를 동시에 생성하는 균주가 보고되었다. Yu 등의 보고에 의하면 중국 전역의 19개 병원에서 수집한 carbapenem 내성 *A. baumannii* 342주 중에서 *armA* 생성 균주는 221주 (65%)이었고, 크게 3종류의 pulsotype으로 분류되었으나, MBL 생성 균주는 없었다³⁰. Doi 등은 미국 Pennsylvania에서 분리된 5주의 *armA* 생성 주 중에서 2주가 OXA-23을 생성하고 carbapenem에 고도 내성을 보였으며, 이 들은 유전적으로 연관되어 있다고 하였다³¹. 또한 MBL인 SPM-1과 *rmtD*를 동시에 생성하는 균주에 의한 집단 감염도 브라질에서 보고되어, 16S rRNA methylase를 생성하는 일부 균주가 carbapenemase를 동시에 생성할 수 있음을 증명하였다³². 본 연구에서는 carbapenem 내성인 *P. aeruginosa* 중 1주에서 *armA*가 분리되었으나, modified-Hodge 법과 imipenem-EDTA double disk synergy 법에서 음성으로 carbapenemase를 생성하는 균주는 없었으며, 16S rRNA methylase를 생성하는 *Acinetobacter* 균종 중에서 carbapenem에 내

성인 균주는 없었다. 그러나 국내에서 2003년과 2005년에 국내 1개 대학 병원에서 분리된 *Acinetobacter* 균종 중, 16S rRNA methylase를 생성하는 균주의 대부분이 carbapenem에 내성이었다는 보고도 있어⁹, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

16S rRNA methylase 생성 균주는 levofloxacin에 대해서도 높은 내성율을 나타내었다. Fluoroquinolone에 대한 내성 기전으로는 세균 염색체의 변이에 의한 quinolone-resistance determining region (QRDR)의 변화³³와 efflux pump의 증가³⁴ 및 porin의 감소³⁵ 등이 주로 알려져 있다. 그러나 최근에 plasmid를 통해 다른 균주로 전파 가능한 fluoroquinolone 내성 기전이 보고되었는데, pentapeptide repeat family에 속하는 Qnr 단백질에 의한 내성 기전¹¹과 plasmid-mediated active efflux (*qepA* gene)에 내성 기전¹²이 여기에 속한다. Qnr 단백질에 의한 내성은 *qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS* 유전자에 의해서 일어나며, 각 유전형 별로 호발하는 균종에 차이가 있으며, 일부에서는 ESBL 유전자와 함께 검출되는 경우가 흔하다¹⁰. 본 연구에서는 *armA*를 생성하는 *K. pneumoniae*의 91%에서 *qnrB* 유전자가 검출되어 매우 높은 연관성을 보여 주었다. 이는 *armA*와 *qnrB*를 동시에 갖는 *K. pneumoniae*의 확산에 의한 것으로 생각할 수도 있으나 PFGE에서 다양한 유형을 보여, *armA*와 *qnrB*의 확산이 내성 유전자에 의한 수평 확산일 가능성이 높음을 알 수 있었다. *qepA* 유전자는 *E. coli*에서 처음 보고되었으며, *rmtB* 유전자와 함께 transposable element에 존재한다. 본 연구에서도 *qepA* 유전자 양성인 3주의 균주 중, 2주에서 *rmtB*가 검출되어 유사한 양상을 보여 주었다. *qepA*에 의한 fluoroquinolone 내성은 현재까지는 매우 낮으나 *rmtB*가 확산될 경우, 동시에 확산될 가능성이 있어 주의가 필요할 것으로 판단되었다.

V. 결론

국내에서 16S rRNA methylase 유전자에 의한 aminoglycoside 고도 내성인 그람음성 간균의 양성율은 세브란스병원 4% 및 명지병원 5%로 외국에 비하여 흔하였다. 또한 16S rRNA methylase를 생성하는 균종의 종류는 기존에 보고되었던 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii* 및 *Acinetobacter* 균종이 대부분이었으나, *C. koseri* (*armA*) 및 *M. morgani* (*armA*) 같은 *Enterobacteriaceae*와 *A. xylosoxidans* (*rmtA*) 및 *S. maltophilia* (*armA*)같은 포도당 비발효 그람음성 간균에서도 16S rRNA methylase 생성 유전자를 검출되어, 다양한 균종으로 여러 내성 유전자가 전파되고 있을 것으로 생각되었다. 또한 16S rRNA methylase에 의한 aminoglycoside 고도 내성 *E. coli*의 extended-spectrum β -lactamase와 AmpC β -lactamase 양성율이 각각 70% 및 plasmid-mediated quinolone 내성 유전자 양성율이 40%이었고, *K. pneumoniae*의 extended-spectrum β -lactamase 양성율 59%, AmpC β -lactamase 양성율 92% 및 *qnr* 내성 유전자 양성율 93%이었으며, 기타 *Enterobacteriaceae* 균종의 extended-spectrum β -lactamase 양성율이 50% 및 plasmid-mediated quinolone 내성 유전자 양성율이 47%로 16S rRNA methylase 생성 균주 중 다제내성 균주가 혼함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Lee K, Park KH, Jeong SH, Lim HS, Shin JH, Yong D, et al. Further increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, amikacin- and fluoroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: 2003 KONSAR surveillance. *Yonsei Med J* 2006;47:43-54.
2. Vakulenko SB and Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430-50.
3. 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.
4. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003;362:1888-93.
5. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:491-6.
6. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N,

Suzuki S, et al. 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;50:178-84.

7. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:852-6.

8. Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, et al. 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;54:1007-12.

9. 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.

10. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*

2006;6:629-40.

11. Martinez-Martinez L., Pascuala A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-99.

12. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3354-60.

13. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance QnrS determinant in enterobacteria isolates in Europe. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Nice, France; April 1-4 2006. Abstract O51.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. Wayne, PA, CLSI, 2006.

15. 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;60:394-7.

16. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496–514.
17. Hancock, RE. Aminoglycoside uptake and mode of action- with special reference to streptomycin and gentamicin. *J Antimicrob. Chemother* 1981;8:249–76.
18. Hooper DC. Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin Infect Dis* 2005;40:1811–7.
19. Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol Gen Genet* 1985;200:415–21.
20. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:207–33.
21. 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.
22. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata

N, et al. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2069-74.

23. Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, et al. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcpI*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3212-5.

24. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing 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.

25. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kato H, Shibayama K, Kimura K, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007;13:642-6.

26. 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.

27. Chen L, Chen ZL, Liu JH, Zeng ZL, Ma JY, Jiang HX.

Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. J Antimicrob Chemother 2007;59:880-5.

28. Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase (ESBL) gene bla_{CTX-M-3}. Antimicrob Agents Chemother 2007 Aug 13; [Epub ahead of print]

29. Bae IK, Lee YN, Jeong SH, Lee K, Yong D, Lee J, et al. Emergence of CTX-M-12, PER-1 and OXA-30 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Korean J Clin Microbiol 2006;9:102-9.

30. 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;60:454-5.

31. Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S Ribosomal RNA Methylase-Producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. Antimicrob Agents Chemother 2007 Sep 4; [Epub ahead of print]

32. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3388-90.
33. Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubenstein E, eds. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2003:41-67.
34. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007;39:162-76.
35. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1109-17.

<영문요약>

Abstract

Molecular and phenotypical characteristics of
16S rRNA methylase producing gram-negative bacilli

Hyukmin Lee

Department of Medicine or Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyungwon Lee)

Aminoglycoside antibiotics, widely used in clinical settings as monotherapy and combination therapy, bind to 16S rRNA of bacterial ribosome irreversibly and interfere with the protein synthesis. Recently a novel plasmid-mediated resistant mechanism that conferred methylation of 16S rRNA and high-level resistance to 4,6-substituted deoxystreptamine antibiotics was reported. But the report to this novel resistant mechanisms were rare in Korea. The aims of this study were to determine the prevalence of the 16S rRNA methylase genes in clinical isolates of gram-negative rods such as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species and to characterize the coresistance to other

antibiotics such as β -lactams and fluoroquinolones.

Consecutive non-duplicate gram-negative bacilli were isolated from clinical specimens at a Korean secondary hospital from July 2006 to June 2007 and a tertiary-care hospital from April to June 2007. The species were identified by conventional methods or by using the Vitek systems. The antimicrobial susceptibility was tested by the CLSI disk diffusion and agar dilution method using ceftazidime, cefoxitin, imipenem, arbekacin, amikacin, gentamicin, tobramycin and levofloxacin. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production was confirmed by double disk synergy test and the production of plasmid-mediated AmpC β -lactamase (PABL) was analyzed by cefoxitin susceptibility. Imipenem-nonsusceptible isolates were tested for carbapenemase production by the modified-Hodge and imipenem-EDTA double disk synergy test. Polymerase chain reaction was performed to detect the 16S rRNA methylase genes (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, and *rmtD*) in the arbekacin-resistant isolates and plasmid-mediated quinolone resistant genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *qepA*) were detected in 16S rRNA methylase-positive isolates. To analyze the genetic relationships, pulsed-field gel electrophoresis was performed in 16S rRNA methylase and plasmid-mediated quinolone resistance gene-positive isolates.

16S rRNA methylase genes were detected in 2 (<1%) isolates of *E. coli*, 24 (11%) *K. pneumoniae*, 1 (2%) *K. oxytoca*, 4 (10%) *Citrobacter* spp., 2 (4%) *Enterobacter* spp., 2 (4%) *S. marcescens*,

1 (20%) *Achromobacter xylosoxidans*, 11 (10%) *Acinetobacter* spp., and 1 *S. maltophilia* at tertiary-care hospital, 8 (1%) *E. coli*, 51 (21%) *K. pneumoniae*, 3 (8%) *Citrobacter* spp., 2 (2%) *Enterobacter* spp., 4 (8%) *S. marcescens*, 2 (4%) *P. mirabilis*, 1 (<1%) *P. aeruginosa* at secondary-care hospital. *armA* alleles were detected 90% of 16S rRNA producing isolates at tertiary-care hospital and 93% of isolates at secondary-care hospital. *rmtB* genes were detected in 2 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *Citrobacter* spp. and 3 *Providencia* spp., and 4 of *rmtB*-positive isolates were positive for *armA* genes, simultaneously. In 16S rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*, the resistance rates of cefoxitin and levofloxacin were very high (85% and 81%) compared with methylase non-producing isolates (68% and 36%). The positive rates of ESBL and PABL production were 59% and 92% in 16S rRNA methylase-positive isolates and 43% and 64% in 16S rRNA methylase-negative isolates and 91% of 16S rRNA methylase-producing *K. pneumoniae* were positive for *qnrB* genes. *qepA* genes, plasmid-mediated quinolone efflux pump, were detected in *rmtB*-positive *E. coli* and *C. freundii* and one 16S rRNA methylase-negative *E. coli*. There was no MBL producers in 16S rRNA methylase-producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Pulsed-field gel electrophoresis showed polyclonal patterns between 16S rRNA methylase-producing isolates.

In conclusion, the novel aminoglycoside resistant mechanisms by 16S rRNA methylase was more prevalent and widely distributed in

gram-negative bacilli in Korea, other resistant mechanisms such as ESBL, PABL and *qnr* were commonly associated with 16S rRNA methylase resistance in gram-negative bacilli in Korea.

Key Words : 16S rRNA methylase, *armA*, *qnrB*, aminoglycoside, gram-negative bacteria