

국내에서 분리되는 임균의
cephalosporin 내성 양상 및
감수성 저하 기전 규명

연세대학교 대학원
의 학 과
이 상 국

국내에서 분리되는 임균의
cephalosporin 내성 양상 및
감수성 저하 기전 규명

지도교수 이 경 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 국

이상국의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 관심과 사랑으로
지도해주신 존경하는 이경원 교수님과 조상래 교수님,
이혁민 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고
바쁘신 가운데도 아낌없는 조언으로 격려해 주신
정석훈 교수님, 용동은 교수님께 감사의 말씀을
드립니다. 또한 연구에 전념할 수 있도록 많은
시간을 할애하고, 실험을 도와주신 서영희 연구원과
진단검사의학과 미생물파트 선생님들께 감사드립니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법.....	8
1. 시험대상 균주.....	8
2. 항균제 감수성 시험.....	9
가. 한천 회석법	9
나. β -lactamase 생성시험	9
3. <i>penA</i> 유전자 분석.....	10
4. <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> , <i>porB</i> 및 <i>pilQ</i> 유전자 분석.....	11
5. Nucleotide sequence accession number.....	11
III. 결과	13
1. 항균제 감수성	13
2. PBP 2 아미노산 서열	15
3. PBP 2 아미노산 서열 형과 항균제 감수성.....	19
4. <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> , <i>porB</i> 및 <i>pilQ</i> 유전자 다형성.....	19
IV. 고찰.....	22
V. 결론.....	27

참고문헌.....	29
영문요약.....	35

그림 차례

- Figure 1. Frequency of the PBP 2 patterns according to isolation sites.....17
- Figure 2. MICs of penicillin G, ceftriaxone, and cefixime for the *N. gonorrhoeae* clinical isolates with various patterns of PBP 2 alterations.....18

표 차례

- Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing of the *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB* and *pilQ* genes12

Table 2. PCR conditions for <i>penA</i> , <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> , <i>porB</i> and <i>pilQ</i> gene amplication.....	13
Table 3. Proportion of <i>N. gonorrhoeae</i> isolates with decreased susceptibility to cephalosporins.....	14
Table 4. Amino acid substitutions identified in PBP 2 of the <i>N. gonorrhoeae</i> strains	16
Table 5. Polymorphisms of <i>penA</i> , <i>mtrR</i> , <i>ponA</i> , <i>porB</i> and <i>pilQ</i>	21

국문요약

국내에서 분리되는 임균의 cephalosporin 내성 양상 및
감수성 저하 기전 규명

근래 다제 내성 임균의 증가로 cephalosporin 항균제 사용이 증가하였고 이로 인해 cephalosporin 항균제에 감수성이 저하된 균주들이 국외에서 보고되기 시작하였다. Cephalosporin 항균제 사용이 증가한 국내의 환경을 고려하면 임균의 cephalosporin 내성에 대한 감시가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 전국 주요 지역에서 2001년부터 2007년까지 특수직업 여성 및 일반 환자로부터 임균을 수집하였고 연도별도 20-50주씩 임의로 선택하여 총 208주의 항균제 감수성을 한천희석법으로 시험하였다. 이 중 cephalosporin계 항균제에 대하여 감수성이 저하된 균주 46주 (실험균)와 감수성 균주 2주 (대조균)를 대상으로 *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자의 염기서열을 분석하였다.

Penicillin binding protein 2 (PBP 2)유전자인 *penA* 분석을 통해 PBP 2 아미노산 서열 형 8가지를 관찰하였고, 그 중 PBP 2 XXIV형 (GenBank accession number FJ465093)은 이전 보고들에서 발견되지 않은 새로운 형이었다. 대조균의 경우 PBP 2 XIV형을 가지고 있었고, 실험군 중 1 주에서만 PBP 2 모자이크 (X)형이 발견되었다. PBP 2 모자이크 형을 가진 균에 대한 cefixime MIC는 0.5 µg/ml로 가장 높았다.

*mtrR*의 경우 대조군에서는 불완전 MtrR단백이 생성되었고 실험군 중 44주에서는 promoter 영역의 변이가, 2주에서는 *mtrR* ORF 내의 점변이 (Ala39Thr, Leu47Pro)가 관찰되었다. *porB*의 경우 대조군 1주를 제외한 모든 균주가 101번, 102번 위치에서 아미노산 치환을 보였다. *ponA*의 경우 대조군에서는 돌연변이가 발견되지 않았고 실험군 중 44주에서 Leu421Pro의 아미노산 치환이 관찰되었다. 그러나 *ponA*의 변이 유무에 따라 cephalosporin에 대한 감수성 저하 정도에 차이는 없었다. 한편 *pilQ*의 돌연변이는 발견되지 않았다.

본 연구에서 *penA* 모자이크 형 변이를 가진 균주는 cephalosporin, 특히 경구용 제제 (cefixime)에 더 높은 내성을 보였다. 그러나 모자이크 형이 아닌 *penA* 변이를 가진 균주도 *mtrR*, *porB* 및 *ponA*의 유전자 다형성을 함께 가질

경우 주사제뿐만 아니라 경구용 제제에 대해서도 비슷한 수준의 감수성 저하를 나타내었다.

핵심되는 말: 임균, *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *pilQ*, 모자이크
형 변이, cephalosporin, 감수성 저하

국내에서 분리되는 임균의 cephalosporin 내성 양상 및
감수성 저하 기전 규명

<지도교수 이경원>

연세대학교 대학원 의학과

이 상 국

I. 서론

임균은 그람음성 쌍구균으로 임질, 요도염, 골반염 등 다양한 감염 질환을 일으키며 불임, 자궁외 임신 등의 합병증을 유발할 수 있다. 질병관리본부의 임균 표본 감시 보고에 따르면 (http://stat.cdc.go.kr/Index_List.aspx) 임균 감염 보고 건수는 2001년 18,520건에서, 2004년 10,845 건, 2007년 3,115건으로 감소하였으나 아직도 적지 않은 환자가 발생하고 있다. 2004년 성매매 금지법의 제정 이후로 특수직업 여성의 국가적인 관리가 어려워졌다. 이로 인해 임균 등의 성병이 음성적으로 전파될

위험성이 높아졌음을 감안할 때, 임균 감염 건수는 실제보다 낮게 보고되었을 가능성이 많다.

임균 관리에 있어 중요한 점은 새로운 항균제 내성균 출현에 대한 지속적인 감시와 이에 대한 체계적인 대책 마련이라 할 수 있다. 임균의 전파를 효율적으로 통제할 수 있는 방법 중 하나는 진단 즉시 가장 효과적인 항균제를 투여하여 완치하는 것이다. 과거 임균은 penicillin G를 포함한 여러 가지 항균제에 감수성으로 치료에 어려움이 없었으나, 근래에는 다제 내성인 임균이 증가하여 문제가 되고 있다.¹ 임균에서 항균제 내성균의 출현과 확산에는 여러 요인들이 관련된다. 많은 경우 내성균이 출현하고 성병의 고위험군 집단에 전파되면서 이들을 통해 지역사회에 확산, 정착되는 과정을 갖는다. 또한 치료에 사용되는 항균제를 적절히 선택하는 것이 중요한데 이는 선택작용에 의해 사용 항균제에 대한 내성이 증가할 가능성이 높기 때문이다.²

국내에서는 1979년 penicillinase 생성주 (penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*, PPNG)가 분리된 이후, 1990년대에 급격히 증가하여 그 비율은 1991-1992년 약 50%에서 1999년 약 84%까지 증가하였고 이로 인해 penicillin G는 임균 감염의 치료제로 사용하기 어렵게 되었다.³ Fluoroquinolone은 대부분의 임균에 항균력이 있고, 요에 고농도로 농축되며, 경구

투여가 가능하다는 장점이 있어서, PPNG의 증가 이후 임균 감염의 치료제로 널리 사용되었다. 그러나 1994년 fluoroquinolone에 감수성이 저하된 임균이 최초로 보고되었고,⁴ 근래에는 이 약제에 고도내성인 임균까지도 보고되었다.⁵⁻⁷ 2004년에 용 등⁹이 보고한 바에 의하면 국내에서 분리되는 임균의 fluoroquinolone 내성은 처음 보고된⁸ 이후로 급격히 증가하여, 2000년에 수집된 190주의 임균 중 172주 (90%)가 fluoroquinolone에 중간 혹은 내성으로 국내의 fluoroquinolone 내성이 심각함을 알 수 있었다. Fluoroquinolone 항균제에 대한 내성은 국외에서도 심각하여, 미국 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)는 2007년 치료 지침에서 아시아 및 미국 전 지역에서 발생한 임균 감염에 대해 fluoroquinolone을 사용하지 말고, ceftriaxone 또는 cefixime을 사용할 것을 권장하였다.¹⁰

한편, ceftriaxone은 제 3세대 cephalosporin 항균제이며 대부분의 임균이 감수성이어서 임균 감염에 효과적인 약제이나 주사제로만 사용이 가능하다는 단점이 있다. 1991년 Handsfield 등¹¹은 임균에 감염된 333 명의 환자를 대상으로 경구로 cefixime을 투여 받은 군과 근주로 ceftriaxone을 투여 받은 환자군의 치료 효과를 비교하여, cefixime이 ceftriaxone과 동일한 치료 효과를 갖고 있고 (치료율; cefixime 400 mg, 96%; cefixime

800 mg, 98%; ceftriaxone, 98%), 주사제의 불편함이 없이 1회의 경구 투여로 임균을 치료할 수 있음을 보고하였다. 그러나 cefixime 사용이 증가 됨에 따라 감수성이 저하된 임균이 일본에서 처음 보고되었다.¹² Cefixime에 대한 감수성 저하 임균의 경우 penicillin-binding protein (PBP) 2 유전자인 *penA*의 염기서열에서 감수성 균주와 많은 차이를 보였고, 오히려 transpeptidase 영역 일부는 다른 *Neisseria* spp.의 염기서열과는 매우 유사하였다. 이러한 *penA* 유전자의 변이는 다른 *Neisseria* 균종의 *penA* 일부가 삽입된 것으로, 모자이크 형 변이 (mosaicism)로 보고되었다.¹²

2005년 Ito 등¹³은 cefixime에 감수성이 저하된 균주들을 대상으로 *penA*의 염기서열을 분석하였고, PBP 2 아미노산 서열에 따라 10가지 형을 보고하였다. 이 중 X형은 모자이크 형 변이였고, 나머지 I - IX형은 모자이크 형 변이가 아닌 다른 형의 변이었다. I - IX형은 mutation selection에 의한 것으로 생각되며 공통적으로 345번과 346번 아미노산 사이에 aspartic acid의 삽입이 있었고 transpeptidase 영역 C 말단 아미노산 잔기의 변화양상이 각각 달랐다. 그 후 Whiley 등¹⁴이 13가지 형을 추가적으로 보고 하여 23가지 형 (I - XXIII)이 보고 되었다. 2006년 Tanaka 등¹⁵은 ceftriaxone에 감수성이 저하된 균주에서 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자의 돌연변이를 처음 보고하였고, 이후 Lindberg 등¹⁶은

cephalosporin 감수성저하와 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 다형성 (genetic polymorphism)의 연관성을 보고하였다.

본 연구에서는 전국 주요 지역에서 2001년부터 2007년 사이에 특수직업 여성 및 일반 환자로부터 임균을 수집하고, 근래에 사용이 증가한 cephalosporin계 항균제에 대한 내성 양상 및 주요 내성 기전 등을 규명하여 임균 감염증 환자의 치료 및 내성균의 확산을 막기 위한 중요한 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험대상 균주

2001-2007년에 전국 10여 개의 의료기관과 서울의과학연구소 및 녹십자 검사센터에서 분리된 일반 환자 분리 임균과, 전국 5개 지역에 위치한 보건소에서 분리된 특수직업 여성 분리 임균을 수집하였다. 임균 분리를 위한 선택배지는 modified Thayer-Martin 배지 (BBL, Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA)를 사용하였고, 균종 동정은 전통적인 방법과, 필요에 따라서 상품화된 kit를 이용하였다. 동정된 균주는 -70°C 이하의 냉동고에 보관하였고 수집된 865주 중 연도별도 20-50주씩 임의로 선택하여 총 208주에 대해 주요 항균제 감수성을 시험하였다.

2. 항균제 감수성 시험

가. 한천 희석법 (Agar dilution method)

동결 보관 균주를 초콜릿 한천에 접종하여 양초단지에서 35℃, 24-48시간 배양한 후, Mueller-Hinton broth에 현탁하여 10⁴ CFU/mL으로 희석하였다. GC agar base (BBL)에 1% hemoglobin과 1% IsoVitaleX (BBL)을 첨가하고, 규정된 희석액으로 녹인 항균제를 넣어 2배수 단계 희석된 농도가 되도록 평판을 만들었다. 항균제는 penicillin G (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA), cefixime (동아제약, 서울), ceftriaxone (한미약품, 서울)을 사용하였다. 세균부유액을 Steers' replicator (Craft Machine Inc., Woodline, PA, USA)를 이용하여 배지에 접종하고 35℃, 5% CO₂ 항온기에 24시간 배양 후 세균의 증식을 관찰하였다. 세균의 증식을 완전히 억제시킨 최소한의 농도를 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)로 정하였다. 결과의 정도관리를 위해서 *N. gonorrhoeae* ATCC 49226을 같이 시험하였다.

나. β-lactamase 생성시험

PPNG가 의심되는 균주는 chromogenic cephalosporin 인 cefinase 디스크 (BBL)로 시험하여, 노란색이 분홍색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

3. *penA* 유전자 분석

penA 유전자는 cephalosporin에 감수성이 저하된 균주 (ceftriaxone 또는 cefixime MIC 0.12 µg/ml 이상) 50주 중 소실된 4주를 제외한 46주와 cephalosporin에 높은 감수성을 보인 대조균 2주에서 분석되었다. 균집락을 멸균증류수에 부유시킨 후 10분간 끓여서 2분간 13,000 rpm으로 원심 분리한 상층액 1 µl를 template로 사용하였다. PBP 2의 아미노산 서열을 분석하기 위해서 *penA* 유전자 전체를 3부분으로 나누어 각각의 primer set를 사용하였다 (Table 1). 1U의 *Taq* DNA polymerase가 들어있는 PreMix (Bioneer, 창원)에 상층액 1 µl, 20 pmol의 primer 각각 1 µl, 증류수 17 µl를 첨가하여 총 20 µl로 Master Cycler gradient 5331 (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 PCR을 시행하였다 (Table 2). PCR 산물은 전기영동한 후 각 primer set에 적합한 크기의 PCR 산물을 DNA extraction kit을 사용하여 추출한 후 염기서열을 분석하였다.¹³

4. *mtrR*, *ponA*, *porB* 및 *pilQ* 유전자 분석

Cephalosporin에 감수성이 저하된 균주 46주와 대조군 2주를 대상으로 *mtrR*, *ponA*, *porB* 및 *pilQ* 유전자를 분석하였다. 추출한 DNA는 *mtrR*, *ponA*, *porB* 및 *pilQ* 유전자의 돌연변이 분석을 위해 PCR을 시행한 후 염기서열을 분석하였다 (Table 1, 2).

5. Nucleotide sequence accession number

PBP 2 XXIV형을 부호화하는 *penA* 유전자 염기서열 (accession number FJ465093), 불완전 MtrR 단백을 부호화하는 *mtrR* 유전자 염기서열 (FJ465094), 새로운 아미노산 치환 (Ala39Thr, Leu47Pro)을 갖는 MtrR 단백을 부호화하는 *mtrR* 유전자 염기서열 (FJ465095)을 GenBank nucleotide sequence database에 등록하였다.

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing of the *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB* and *pilQ* genes

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Reference
<i>penA</i> -A1	CGGGCAATACCTTTATGGTGGAAAC	13
<i>penA</i> -B1	AACCTTCCTGACCTTTGCCGTC	13
<i>penA</i> -A2	AAAACGCCATTACCCGATGGG	13
<i>penA</i> -B2	TAATGCCGCGCACATCCAAAG	13
<i>penA</i> -A3	GCCGTAACCGATATGATCGA	13
<i>penA</i> -B3	CGTTGATACTCGGATTAAGACG	13
<i>mtrR</i> -F	GCCAATCAACAGGCATTCTTA	32
<i>mtrR</i> -R	GTTGGAACAACGCGTCAAAC	32
<i>ponA</i> -F	GAGAAAATGGGGGAGGACCG	32
<i>ponA</i> -R	GGCTGCCGCATTGCCTGAAC	32
<i>porB</i> -F	CCGGCCTGCTTAAATTTCTTA	17
<i>porB</i> -R	TATTAGAATTTGTGGCGCAG	17
<i>pilQ</i> -F	CGTTACGCCGAACATCACG	GenBank No. AE004969
<i>pilQ</i> -R	TGACCGAAACTGAACGGACTG	GenBank No. AE004969

Table 2. PCR conditions for *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB* and *pilQ* gene amplification

Target	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension
<i>penA</i> -A1	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	58 °C, 1 min	72 °C 1 min
<i>penA</i> -A2	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	56 °C, 1 min	72 °C 1 min
<i>penA</i> -A3	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	52 °C, 1 min	72 °C 1 min
<i>mtrR</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C 30 s
<i>porB</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 30 s	46 °C, 30 s	72 °C 1 min
<i>ponA</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 30 s	56 °C, 30 s	72 °C 30 s
<i>pilQ</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 30 s	52 °C, 30 s	72 °C 30 s

III. 결과

1. 항균제 감수성

임균 208주 중 cefixime의 MIC가 0.12 µg/ml 이상으로 감수성이 저하된 균주는 43주 였고 이중 MIC 0.5 µg/ml 이상의 비감수성 균주는 1주 였다. Ceftriaxone에 감수성이 저하 (MIC 0.12 µg/ml 이상)된 균주는 30주 였고 비감수성 (MIC 0.5 µg/ml 이상) 균주는 없었다. Cefixime 또는 ceftriaxone에 감수성이 저하된 균주는

50주이었고, 두 항균제에 동시에 감수성이 저하된 균주가 많았다. 감수성이 저하된 균주의 비율은 분리연도에 따라 달라서 8.3–34.9% 였다 (Table 3). β -lactamase를 생성하는 균주는 모두 50주 (24%)이었고 47주는 penicillin MIC가 16 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 고도 내성을 보였다.

Table 3. Proportion of *N. gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to cephalosporins

Year	No. of isolates	No. (%) of isolates with decreased susceptibility ¹
2001	24	2 (8.3)
2002	22	7 (31.8)
2003	24	2 (8.3)
2004	20	5 (25.0)
2005	21	3 (14.3)
2006	43	15 (34.9)
2007	54	16 (29.6)
Total	208	50 (24.0)

¹Cefixime or ceftriaxone MIC \geq 0.12 $\mu\text{g/ml}$.

2. PBP 2 아미노산 서열

본 연구에서는 PBP 2 아미노산 서열 형 8가지가 발견되었다 (Table 4). PBP 2 아미노산 서열 형은 Ito 등¹³과, Whiley 등¹⁴이 이전에 보고한 분류에 따랐다. XIII형이 28주에서 발견되어 가장 많았고, IV형 9주, V형 4주 순이었다. XXIV형은 본 연구의 1주에서 처음 발견되었다. XXIV형은 기존의 V형과 유사하였고, 551번째 아미노산이 proline에서 serine으로 치환된 것이 유일한 차이였다. 모자이크 형 변이인 X형은 cefixime에 비감수성인 1주에서 발견되었다.

Cephalosporin에 감수성이 높았던 대조군 2주는 XIV형을 가졌다. 분리지역에 따른 PBP 2 형의 차이는 없었다 (Figure 1).

Table 4. Amino acid substitutions identified in PBP 2 of the *N. gonorrhoeae* strains

Patterns	No. of isolates	PBP 2 amino acid substitution in															
		345D Ins ¹	501A	504F	510A	512N	516A	541H	542G	545G	549A	551P	552P	555K	556I	566I	574A
IV	9	D	.	L	V	.	G	.	S
V	4	D	.	L	V	.	G	.	S	V	NV
X ²	1	-	.	L	V	Y	.	N	.	S	T	.	V	Q	V	V	NV
XII	2	D	.	L	V	.	G	S
XIII	28	D	V	L	V	.	G	S
XIV	2	D	.	L	V	.	G	N
XVII	1	D	V	L	V	.	G	.	S	V	NV
XXIV	1	D	.	L	V	.	G	.	S	.	.	S	.	.	.	V	NV

¹Insertion of a single aspartic acid codon between Arg345 and Asp346.

²Mosaic pattern.

A, alanine; F, phenylalanine; N, asparagine; H, histidine; G, glycine; P, proline; K, lysine; I, isoleucine; D, aspartic acid; L, leucine; V, valine; S, serine; Y, tyrosine; T, threonine; Q, glutamate

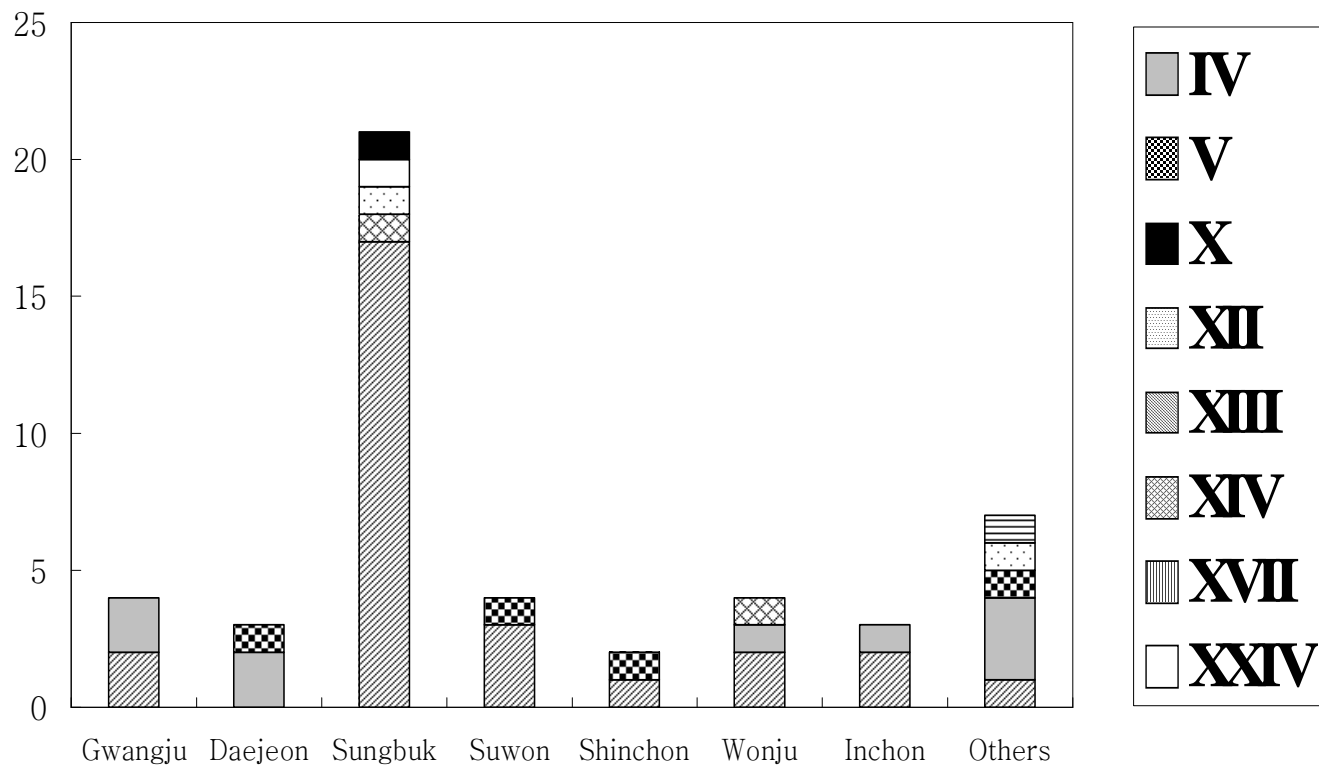


Figure 1. Frequency of the PBP 2 patterns according to isolation sites. The pattern XIII was the most common. No relation was found between PBP 2 patterns and isolation sites.

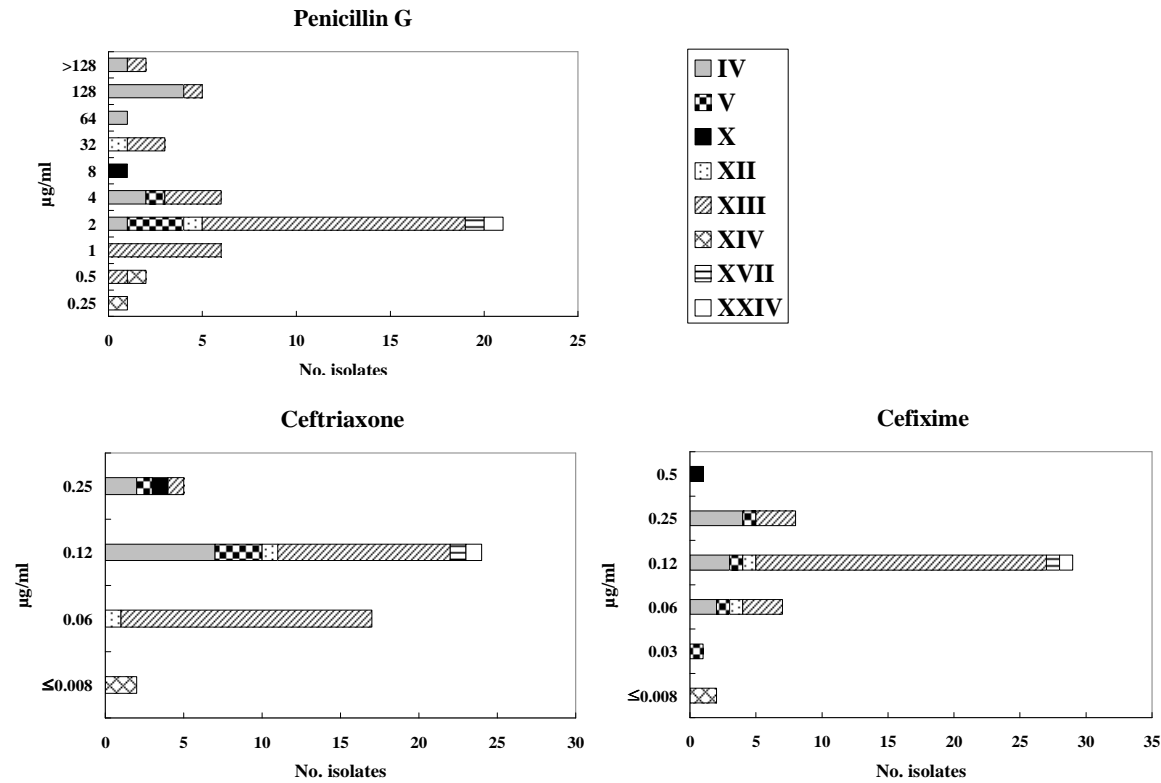


Figure 2. MICs of penicillin G, ceftriaxone, and cefixime for the *N. gonorrhoeae* clinical isolates with various patterns of PBP 2 alterations.

3. PBP 2 아미노산 서열 형과 항균제 감수성

PBP 2 형에 따른 MIC의 분포를 Figure 2에 나타내었다. XIV형을 가진 대조군의 경우 다른 형 균주에 비해 penicillin ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$), cefixime ($\leq 0.008 \mu\text{g/ml}$) 및 ceftriaxone ($\leq 0.008 \mu\text{g/ml}$)의 MIC가 낮았다. X형의 모자이크 형을 가진 균주에 대한 penicillin MIC ($8 \mu\text{g/ml}$)의 경우 다른 균주들에 대한 MIC의 값의 중간 정도 이었다. 그러나 cefixime과 ceftriaxone의 MIC는 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 와 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 로 다른 형을 가진 균주들에 비해 높았다. 나머지 IV, V, XII, XIII, XVII 및 XXIV형을 가진 균주들에 대한 penicillin, cefixime 및 ceftriaxone의 MIC 범위는 서로 비슷하게 분포하여 특정 형과 MIC를 연관시키기는 어려웠다.

4. *mtrR*, *ponA*, *porB* 및 *pilQ* 유전자 다형성

유전자 분석을 시행한 48주 중 44주에서 *mtrR* promoter의 -10과 -35 염기 서열 사이에 위치한 13-bp 역방향 반복 서열에서의 하나의 염기쌍 (A/T)의 소실을 보였다 (Table 5). 나머지 4주중 2주에서는 *mtrR* ORF 내의 아미노산 치환 (Ala39Thr, Leu47Pro)을 보였다. 그리고 나머지 2주는 대조군으로 41개의 아미노산으로 이루어진 불완전 MtrR 단백질이 생성되었다. PorB의 경우 48주 중 대조군 1주를 제외한 47주에서 101번째 아미노산 Gly와 102번째 아미노산 Ala의 치환을 발견할 수 있었다. 대다수인 42주는 Gly101Lys, Ala102Asp의 아미노산 치환을 보였고, 2주는 Gly101Lys, Ala102Asn, 나머지 2주는 Gly101Asn, Ala102Asp, 그리고 한 주는 Gly101Lys, Ala102Gly의 아미노산 치환을 보였다. PonA의 경우 48주 중 대조군 2주를 포함한 4주를 제외하고는 모두

Leu421Pro의 아미노산 치환을 보였다. 한편 *pilQ*의 경우 돌연변이¹⁷가 관찰되지 않았다.

Table 5. Polymorphisms of *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB* and *pilQ*

Isolates no.	BL	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Polymorphisms in				
		PEN	Cefixime	CRO	<i>penA</i>	<i>ponA</i>	<i>mtrR</i>	<i>porB</i>	<i>pilQ</i>
1	-	0.25	≤ 0.008	≤ 0.008	XIV	WT	truncated MtrR	WT, WT	WT
2	-	0.5	≤ 0.008	≤ 0.008	XIV	WT	truncated MtrR	G101K, A102D	WT
3	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
4	+	>128	0.125	0.06	XIII	WT	Deletion of A	G101K, A102D	WT
5	+	128	0.125	0.06	XIII	L421P	A39T, L47P	G101K, A102D	WT
6	-	4	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
7	-	4	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102N	WT
8	+	32	0.125	0.06	XII	L421P	A39T, L47P	G101K, A102D	WT
9	-	4	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
10	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
11	-	2	0.125	0.125	XXIV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
12	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
13	-	2	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
14	+	32	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
15	+	32	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
16	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102N	WT
17	-	8	0.5	0.25	X	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
18	-	1	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
19	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
20	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
21	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
22	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
23	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
24	-	2	0.125	0.06	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
25	-	2	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
26	-	1	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102G	WT
27	-	2	0.06	0.125	XII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
28	+	128	0.25	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
29	-	0.5	0.25	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
30	+	>128	0.25	0.25	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
31	-	2	0.06	0.125	V	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
32	-	4	0.25	0.25	V	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
33	-	2	0.125	0.125	V	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
34	-	4	0.125	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
35	-	2	0.25	0.25	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
36	+	128	0.125	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
37	-	2	0.25	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
38	-	2	0.125	0.125	XVII	L421P	Deletion of A	G101N, A102D	WT
39	+	64	0.06	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
40	+	128	0.25	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
41	-	1	0.125	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
42	-	1	0.06	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
43	-	1	0.06	0.125	XIII	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
44	+	128	0.125	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
45	-	2	0.25	0.25	IV	L421P	Deletion of A	G101N, A102D	WT
46	-	1	0.06	0.125	XIII	WT	Deletion of A	G101K, A102D	WT
47	-	4	0.06	0.125	IV	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT
48	-	2	0.03	0.125	V	L421P	Deletion of A	G101K, A102D	WT

PEN, penicillin; CRO, ceftriaxone; BL, β -lactamase; WT, wild type.

Amino acid abbreviations: see Table 4.

IV. 고찰

Cephalosporin에 대한 임균의 감수성 저하는 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 다형성과 연관되어 있다는 것이 최근 보고되었다.¹⁶ *penA* 유전자의 변이는 2가지 형으로 나타날 수 있는데, 하나는 모자이크 형 변이 (PBP 2 mosaicism)이고, 다른 하나는 345번과 346번 아미노산 사이에서 aspartic acid 삽입과 함께 5개 내외의 아미노산 잔기가 치환된 변이이다. 이중 *penA* 유전자의 모자이크 형 변이가 cephalosporin, 특히 경구용 제제인 cefixime에 대한 감수성 저하에 중요하였다. Takahata 등¹⁸은 유전자 변환 실험을 통해, 모자이크 형 *penA*를 획득한 균주에 대한 ceftriaxone MIC는 획득 전에 비해 4배 증가한 반면, cefixime MIC는 16배 증가하였음을 보고하였다. 그러나 모자이크 형 *penA*를 획득한 균주에 대한 cefixime MIC가 임상 분리주에 대한 MIC만큼 현저히 높은 것은 아니어서 임상 분리주에서 관찰되는 정도의 감수성 저하를 나타내기 위해서는 추가적인 유전자 돌연변이가 필요할 것으로 생각되었다.¹⁸

Penicillin의 염색체성 내성에 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 다형성이 관여한다는 것은 이미 많이 연구되었다.¹⁹ *penA* 유전자에 변이가 발생하면 PBP 2의 penicillin 친화성이 감소되어 임균의 penicillin 내성이 높아지게 된다.^{15, 20, 21} *ponA* 유전자 변이로 PBP 1의 421 번째 아미노산이 proline에서 leucine으로 치환되면 β -lactam제의 acylation율이 낮아져 내성이 유발된다.¹⁹ *mtrR* 유전자 변이로는 MtrCDE 유출 펌프계의 발현이 증가되어 소수성인 erythromycin, azithromycin 및 rifampicin 등에 내성이

유발된다.²²⁻²⁶ Penicillin에 내성인 임균에서는 *mtrR* ORF 내에 접변이 또는 promoter의 -10 과 -35 염기서열 사이의 13 bp 역방향 반복 서열 위치 (inverted repeat position)에 1개의 염기쌍 (A/T) 결손이 보고되었다.¹⁹ *porB* 유전자의 변이로 Gly101과 Ala102 위치에서 아미노산 치환이 발생하면 penicillin과 tetracycline등 친수성 항균제의 외막 투과 감소로 내성이 유발된다. *porB* 유전자의 변이로 인한 내성은 *mtrR*에 의한 내성이 있을 때 추가적으로 내성을 증가시킨다.²⁷⁻³⁰ 또한 *pilQ* 돌연변이는 *penA*, *mtrR* 및 *porB* 돌연변이가 이미 획득된 상태에서 페니실린 내성을 증가시킨다.^{17, 19} PilQ는 세포막에 구멍을 형성하는 역할을 하며, 이를 통해 항균제가 세포질내로 들어오게 된다. 돌연변이로 인하여 PilQ를 통한 항균제의 투과가 감소될 경우, 내성이 증가할 수 있다. 그러나 *pilQ* 돌연변이는 아직 임상 분리주에서 관찰된 적이 없으며, 실험실 균주에서 자발적으로 발생한 돌연변이 만이 보고된 상태이다.^{17, 19}

Ceftriaxone 내성에 대한 이들 유전자 다형성의 영향은 2006년 Tanaka 등¹⁵에 의해 처음 보고되었다. Lindberg 등¹⁶은 모자이크 형 *penA* 유전자 변이를 가진 균주들에 대한 cefixime MIC는 0.19-0.38 µg/ml로 다른 *penA* 유전자 변이를 가진 균주들에 대한 MIC (0.032-0.094 µg/ml)보다 높았음을 보고하였다. 본 연구에서는 1주 만이 모자이크 형 *penA* 유전자를 가지고 있었고, 이전 연구들에서 보고된 PBP 2 X형과 아미노산 서열이 일치하였다.¹³ 모자이크 형 *penA* 는 *N. perflava*, *N. cinerea* 등의 다른 *Neisseria* 균종의 유전자 서열을 부분적으로 가지고 있었으며 다른 종들 간의 유전자 재조합에 의한 것으로 생각되었다.¹³ 상기

균주에서는 모자이크 형 *penA* 외에 *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자의 돌연변이도 함께 발견되었다. 이 균주에 대한 cefixime MIC는 0.5 µg/ml로 다른 균주들과 비교하여 가장 높은 값을 보였으며 유일하게 cefixime에 비감수성이었다.

한편, ceftriaxone에 대한 감수성 저하의 경우, 모자이크 형 *penA* 변이를 가진 균주에 대한 ceftriaxone MIC는 0.25 µg/ml로 다른 *penA* 변이를 가진 균주들에 대한 MIC (0.06–0.25 µg/ml) 범위에 포함되었다. 이것으로 미루어 모자이크 형 *penA* 변이는 ceftriaxone보다는 cefixime에 대한 감수성 저하에 더 중요한 요소로 생각된다. 최근 Whiley 등³¹의 연구에서는 모자이크 형 *penA* 변이를 가지고 있지만 ceftriaxone MIC가 ≤0.008 µg/ml 인 균주가 보고되었다. 이 균주의 경우 모자이크 형 아미노산 서열이 기존에 보고된 X형이 아닌 새로운 XXIII형이었지만 ceftriaxone에 높은 감수성을 보인 점이 특이하였다.

또한 본 연구에서 다른 형태의 *penA* 변이와 *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 돌연변이를 가진 45주에 대한 cefixime MIC는 0.03–0.25 µg/ml이었다. 이 중 7주를 제외한 38주에 대한 cefixime MIC가 0.12 µg/ml–0.25 µg/ml로 모자이크 형 변이를 가진 균주의 0.5 µg/ml 보다는 낮았지만 Lindberg 등¹⁶이 보고한 모자이크 형 변이 균주에 대한 MIC 결과 (0.19–0.38 µg/ml)와 비슷하였다. 따라서 *penA* 유전자의 모자이크 형 변이뿐만 아니라 다른 형태의 *penA* 유전자 변이도 다른 여러 관련 유전자 변이와 동반될 경우 cefixime에 대한 감수성 저하를 유도할 수 있을 것으로 생각되었다.

PBP 2의 아미노산 서열 형은 이전 연구들에서 23가지가 보고되었다.^{13, 14} 본 연구에서는 8가지의 PBP 2가 발견되었고, 그 중 XXIV형은 이전 보고에서는 발견되지 않은 새로운 형이었다. Cephalosporin에 감수성이 높았던 대조균의 경우 이전에 보고된 XIV형을 가지고 있었고, 당시 보고된 균주에 대한 ceftriaxone MIC는 $\leq 0.008 \mu\text{g/ml}$ 로 본 연구와 동일하였다.¹⁴

대조균 2주의 경우 *ponA* 유전자의 돌연변이는 발견되지 않았으며, *mtrR* 유전자에서는 promoter 영역의 변이가 아닌 81번째 염기 G의 소실로 인한 미성숙 stop codon 발생으로 41개 아미노산으로 구성된 불완전 단백질이 형성되는 변이가 발견되었다. 그러나 MtrR의 소실은 promoter 영역의 변이보다 항균제 내성에 미치는 영향이 적다고 보고되었다.²⁵ 이것은 *mtrR* promoter 영역의 변이는 *mtrR* 과 *mtrC* 유전자의 전사에 모두 영향을 주기 때문으로 설명되었다. *mtrR* promoter와 *mtrC* promoter의 위치는 서로 겹치는데 변이로 인해 *mtrR* promoter와 RNA polymerase의 결합은 감소하지만, 그와 반대로 *mtrC* promoter와 RNA polymerase의 결합은 증가하여 *mtrR*의 전사 감소와 동시에 독립적으로 *mtrCDE*의 전사가 증가할 수 있기 때문이었다.²⁵ 본 연구에서는 cephalosporin에 감수성이 높았던 대조균에서만 불완전 MtrR 단백질이 발견되었고 감수성이 저하된 실험군들에서는 promoter 영역의 변이가 관찰되어 이전 연구 결과를 뒷받침하였다. 임균에서 불완전 MtrR 단백을 유발하는 돌연변이는 본 연구에서 처음 보고되는 것이다. 대조균에서 공통적으로 불완전 MtrR 단백질이 생성되는 것으로 미루어 보았을 때 항균제 감수성 저하에 관련된 MtrR 단백질의 역할은 적을 것으로 생각되며, promoter 영역의

돌연변이에 의한 *mtrCDE*의 전사조절이 감수성 저하의 주요 기전으로 생각되었다. 하지만 정확한 MtrR 단백질의 역할을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 대조군 중 1주에서만 Gly101Lys, Ala102Asp 아미노산 변이를 일으키는 *porB* 유전자 돌연변이가 발견되었고, 이 균주는 다른 대조 균주보다 penicillin MIC (0.5 µg/ml vs. 0.25 µg/ml)가 조금 높았다.

Cephalosporin에 감수성이 저하된 46주 중 44주에서 PonA단백의 Leu421Pro의 아미노산 치환을 발견할 수 있었다. *mtrR*의 경우 46주 중 44주에서 *mtrR* promoter 영역의 변이를 발견할 수 있었고, 나머지 2주에서는 *mtrR* ORF 내의 점변이가 발견되었는데, 이전에 보고된 Gly45Asp가 아닌 새로운 Ala39Thr, Leu47Pro 돌연변이가 발견되었다.²⁴ *porB* 유전자분석에서는 감수성 저하를 보인 46주 모두가 101번, 102번 아미노산의 돌연변이를 가지고 있었다. 41주가 Gly101Lys, Ala102Asp의 아미노산 치환을, 2주가 Gly101Lys, Ala102Asn 치환을, 그리고 한 주는 Gly101Lys, Ala102Gly의 치환을 보였다. 그리고 나머지 2주에서는 이전에 보고된 적이 없는 새로운 Gly101Asn, Ala102Asp 아미노산 치환이 발견되었다.²⁷ *penA*, *mtrR* 및 *porB* 유전자의 돌연변이를 모두 가지고 있는 균주들에서 *ponA* 돌연변이의 유무는 cephalosporin의 감수성 저하에 영향을 주지 않았다. 한편 *pilQ* 유전자 돌연변이 (Gly666Lys)는 발견되지 않았다. PilQ는 pore 형성 단백질로 작용할 뿐만 아니라 type IV pilus의 생합성에도 관여한다.¹⁷ Pili는 임균의 감염에서 중요한 역할을 하기 때문에 *pilQ* 돌연변이가 임상 균주에서 발생하는 것은 어려울 것으로 보고되었다.¹⁷

Penicillin의 고도 내성에 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA*의 유전자 다형성이 관여한다는 것은 이미 잘 알려져 있다. Penicillin 내성과는 달리 cephalosporin 내성에 관련된 대부분의 연구들에서는 여러 관련 유전자의 다형성보다는 모자이크 형 *penA* 변이가 주요 연구대상이었다. 특히 모자이크 형 *penA*는 경구용 cephalosporin의 감수성 저하에 중요하게 생각되었다.

본 연구에서 모자이크 형 *penA* 돌연변이를 가진 균주는 cefixime에 가장 높은 내성을 나타내었다. 그러나 모자이크 형이 아닌 *penA* 변이를 가진 균주들도 *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 다형성을 동반할 경우 주사제뿐만 아니라 경구용 제제 (cefixime)에 대해서도 비슷한 수준의 감수성 저하를 나타내었다.

V. 결론

2000년대 초반부터 임균의 fluoroquinolone 내성으로 인해 cephalosporin 항균제 사용이 증가한 국내의 환경을 고려하여 임균의 cephalosporin 항균제 내성 양상과 감수성 저하 기전을 규명하였다.

Cephalosporin에 감수성이 높은 균주는 *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA* 및 *pilQ* 유전자의 돌연변이가 없거나 있더라도 감수성이 저하된 균주와 다른 형태의 돌연변이를 보였다. Cefixime에 비감수성인 1주에서만 모자이크 형 *penA*를 발견할 수 있었고 나머지 감수성 저하를 보인 균주들은 다른 형태의 *penA* 변이를 가지고 있었다. 모자이크 형 *penA* 돌연변이를 가진 균주가 cefixime에 가장 높은 내성을 보였지만 모자이크 형이 아닌 *penA* 변이를 가진 균주들도

mtrR, *porB* 및 *ponA* 유전자 다형성을 동반할 경우 주사제뿐만 아니라 경구용 제제 (cefixime)에 감수성 저하를 보일 수 있음을 알 수 있었다. 각각의 *penA*, *mtrR*, *porB* 및 *ponA* 유전자 돌연변이가 cephalosporin 내성에 어느 정도 기여를 하는 지는 더 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Tapsall J. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is diminishing available treatment options for gonorrhea: some possible remedies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006;4:619-28.
2. Seong WK, Chung KT, Kill JY, Kim SH, Oh HB. Antimicrobial Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Korea. *Korean J Infect Dis* 2001;33:338-45.
3. 항균제 내성 소식. 1999년 1-12월에 분리된 세균의 항균제 감수성. *항균제 내성 소식지* 2000;8:1-2.
4. Birley H, McDonald P, Carey P, Fletcher J. High level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med* 1994;70:292-3.
5. Trees DL, Sirivongrangson P, Schultz AJ, Buatiang A, Neal SW, Knapp JS, et al. Multiclonal increase in ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Thailand, 1998-1999. *Sex Transm Dis* 2002;29:668-73.
6. Dan M, Poch F, Sheinberg B. High prevalence of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Tel Aviv, Israel: correlation with response to therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1671-3.
7. Shultz TR, Tapsall JW, White PA. Correlation of in vitro susceptibilities to newer quinolones of naturally occurring quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains with

- changes in GyrA and ParC. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:734-8.
8. Lee K, Chong Y, Erdenechemeg L, Soon Song K, Hun Shin K. Incidence, epidemiology and evolution of reduced susceptibility to ciprofloxacin in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. Clin Microbiol Infect 1998;4:627-33.
 9. Yong D, Kim TS, Choi JR, Yum JH, Lee K, Chong Y, et al. Epidemiological characteristics and molecular basis of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Korea and nearby countries. J Antimicrob Chemother 2004;54:451-5.
 10. Centers for Disease Control and Prevention. Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2007;56:332-6.
 11. Handsfield HH, McCormack WM, Hook EW, 3rd, Douglas JM, Jr., Covino JM, Verdon MS, et al. A comparison of single-dose cefixime with ceftriaxone as treatment for uncomplicated gonorrhea. The Gonorrhea Treatment Study Group. N Engl J Med 1991;325:1337-41.
 12. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime.

Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3744-9.

13. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:137-43.
14. Whiley DM, Limnios EA, Ray S, Sloots TP, Tapsall JW. Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3111-6.
15. Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. Int J Antimicrob Agents 2006;27:20-6.
16. Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R, Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2117-22.
17. Zhao S, Tobiason DM, Hu M, Seifert HS, Nicholas RA. The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ

- secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol* 2005;57:1238-51.
18. Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3638-45.
 19. Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:769-77.
 20. Dowson CG, Jephcott AE, Gough KR, Spratt BG. Penicillin-binding protein 2 genes of non-beta-lactamase-producing, penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1989;3:35-41.
 21. Dougherty TJ. Genetic analysis and penicillin-binding protein alterations in *Neisseria gonorrhoeae* with chromosomally mediated resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:649-52.
 22. Mavroidi A, Tzouveleki LS, Kyriakis KP, Avgerinou H, Daniilidou M, Tzelepi E. Multidrug-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2651-4.

23. Lucas CE, Balthazar JT, Hagman KE, Shafer WM. The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 1997;179:4123-8.
24. Shafer WM, Balthazar JT, Hagman KE, Morse SA. Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. Microbiology 1995;141:907-11.
25. Hagman KE, Shafer WM. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 1995;177:4162-5.
26. Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. Microbiology 1995;141:611-22.
27. Liao M, Bell K, Gu WM, Yang Y, Eng NF, Fu W, et al. Clusters of circulating *Neisseria gonorrhoeae* strains and association with antimicrobial resistance in Shanghai. J Antimicrob Chemother 2008;61:478-87.
28. Unemo M, Olcen P, Berglund T, Albert J, Fredlund H. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae*: sequence analysis of the porB gene confirms presence of two circulating strains. J Clin Microbiol 2002;40:3741-9.
29. Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA. Identification and analysis

- of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2811-20.
30. Gill MJ, Simjee S, Al-Hattawi K, Robertson BD, Easmon CS, Ison CA. Gonococcal resistance to beta-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2799-803.
31. Whiley DM, Limnios EA, Ray S, Sloots TP, Tapsall JW. Further questions regarding the role of mosaic *penA* sequences in conferring reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:802-3.
32. Ilina EN, Vereshchagin VA, Borovskaya AD, Malakhova MV, Sidorenko SV, Al-Khafaji NC, et al. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2175-82.

Abstract

Prevalence and mechanism of reduced susceptibility to cephalosporin of *Neisseria gonorrhoeae* in Korea

Sang-Guk Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyungwon Lee)

The options for the effective treatment of *Neisseria gonorrhoeae* infections have been significantly reduced over time by the emergence and spread of gonococci resistant to the penicillins, tetracyclines, and quinolone groups of antibiotics. Cephalosporin antibiotics are now the mainstay of treatment in many settings. Therefore, the surveillance of cephalosporin resistance is required.

We undertook the primary isolation of *N. gonorrhoeae* from clinical samples from sexually transmitted disease clinics and public health centers during 2001–2007. Antimicrobial susceptibility was determined by agar dilution

method in randomly selected 208 isolates. Among these, 46 (22.1%) isolates with decreased susceptibility to cephalosporins and two highly susceptible isolates (controls) were tested for *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, and *pilQ* polymorphisms.

In present study, eight patterns in amino acid sequence of penicillin binding protein 2 (PBP 2) were found, and one of them was new one (XXIV). We found mosaic PBP 2 in only one isolate, and this exhibited the increased cefixime MIC (0.5 µg/ml). In *mtrR* gene analysis, control isolates had incomplete MtrR protein. In contrast, the isolates with reduced susceptibility to cephalosporins had deletions in promoter region (44 isolates) or point mutations (Ala39Thr, Leu47Pro) within *mtrR* ORF (2 isolates). All isolates except one control isolate had two amino acid substitutions at 101 and 102 position of PorB. Control isolates had no mutation in *ponA* gene. The isolates with reduced susceptibility had Leu421Pro in PonA except two isolates. However, cephalosporin susceptibility was not different between isolates with *ponA* mutation and without the mutation if other genetic polymorphisms were same. In addition, *pilQ* mutation was not detected in all isolates tested.

In present study, the isolate with mosaic *penA* showed

the highest resistance to cephalosporins, especially to oral cefixime. However, the isolates with other type of *penA* mutation can exhibit reduced susceptibility to both oral and injectable cephalosporins when accompanied by *mtrR*, *porB*, *ponA* polymorphisms.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *pilQ*, mosaic, cephalosporin, reduced susceptibility