

*Mycoplasma pneumoniae*의 macrolide 내성과 연관된 유전자 변이의 검출

서울대학교 의과대학 소아과학교실

오지은 · 최은화 · 이환중

= Abstract =

Detection of genetic mutations associated with macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae*

Chi Eun Oh, M.D., Eun Hwa Choi, M.D. and Hoan Jong Lee, M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : The aim of this study was to identify mutations associated with macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* (MP) and to establish a cultural method to determine antimicrobial susceptibility.

Methods : Nasopharyngeal aspirates (NPAs) were collected from 62 children diagnosed with MP pneumonia by a serologic method or polymerase chain reaction. The 23S rRNA and L4 ribosomal protein genes of MP were amplified and sequenced. To identify mutations in these 2 genes, their nucleotide sequences were compared to those of the reference strain M129. MP cultivation was carried out for 32 (28 frozen and 5 refrigerated) NPAs and M129 strain using Chanock's glucose broth and agar plate in a 5% CO₂ incubator at 37°C and examined at 2-3 day intervals for 6 weeks.

Results : Among the 62 specimens, 17 had M144V mutations in ribosomal protein L4. The A2064G mutation was observed in 1 specimen; its 23S rRNA gene was successfully sequenced. Culture for MP was successful from the M129 strain and 2 of the 5 NPAs that were refrigerated for no longer than 3 days. However, MP did not grow from the 28 NPAs that were kept frozen at -80°C since 2003.

Conclusion : We found the M144V mutation of L4 protein to be common and that of domain V of 23S rRNA gene was relatively rare among MP. Studies on the prevalence of macrolide-resistant MP and the relationship between the mutations of 23S rRNA gene and ribosomal protein L4 will aid in understanding the mechanism of macrolide resistance in MP.

(Korean J Pediatr 2010;53:178-183)

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae*, Macrolides, Resistance, Mutation

서 론

*Mycoplasma*는 일반 세균과는 달리 세포벽이 없어 다형태성을 보이며 바이러스와는 달리 인공배지(cell-free medium)에서도 자랄 수 있는 원핵생물(prokaryote)이다¹⁾. *Mycoplasma pneumoniae*는 소아에서 상부 호흡기와 하부 호흡기 감염을 일으키며 다양한 폐외 합병증의 원인이 된다.

*M. pneumoniae*는 세포벽 합성을 저해하는 항균제인 penicillins과 cephalosporins에는 저항성이며, tetracyclines, macrolides, ketolides, 그리고 fluoroquinolones에 감수성을 보인다²⁾. 소아에서는 *M. pneumoniae*에 의한 폐렴의 치료에는 macrolide계 항균제가 사용되고 있고 일반적으로 *M. pneumoniae*가 macrolides에 감수성이라고 알려져 있으므로 항균제 감수성 검사를 실시하지는 않는다.

그러나 1970년대부터 macrolides에 내성인 *M. pneumoniae*에 대한 보고가 있었고, 최근 일본과 프랑스에서는 macrolides 내성인 *M. pneumoniae*가 증가 추세에 있다고 하였다³⁻⁶⁾. 또한 Chang 등의 보고에 따르면 국내에서도 2005년에 호흡기 질환 환자에서 분리된 *M. pneumoniae*의 erythromycin 내성이 48.8%라고 하였다⁷⁾.

M. pneumoniae 감염을 진단하기 위한 방법으로 혈청학적 검

Received : 30 November 2009, Revised : 16 December 2009

Accepted : 14 January 2010

Address for correspondence : Eun Hwa Choi, M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University Bundang Hospital 166 Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-707, Korea

Tel : +82.31-787-7283, Fax : +82.31-717-7283

E-mail : eunchoi@snu.ac.kr

*This study was supported by research fund of Seoul National University Hospital (04-2009-044-0).

사와 PCR이 사용되고 있고 배양 조건이 까다롭기 때문에 임상 미생물실에서 *M. pneumoniae*의 배양이나 항균제 감수성 검사는 거의 시행하지 않고 있다. *M. pneumoniae*는 일반 세균과는 달리 doubling time이 길기 때문에 배양되는데 5-20일이 걸리므로 배양과 항균제 감수성 검사가 치료에 직접적인 도움을 주기는 어렵다.

하지만 *M. pneumoniae* 감염의 치료에 1차 선택약제로 사용되고 있는 macrolides계 항균제에 내성을 보이는 균주에 대한 보고가 국외에서 증가함에 따라 국내에서도 *M. pneumoniae*의 macrolides계 항균제에 대한 내성률을 평가할 필요가 있으며, 내성을 보이는 균주가 있는 경우 내성 기전을 밝히는 것이 중요하다. 이에, 본 연구는 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단된 소아의 비인두 흡인물에서 *M. pneumoniae*의 macrolide계 항균제 내성에 연관된 것으로 알려진 유전자 변이 유무를 확인하고, 내성유전자가 양성인 *M. pneumoniae*의 macrolide계 항균제에 대한 최소억제농도를 측정하기 위한 기초 연구로 *M. pneumoniae* 배양법을 구축하고자 시행되었다.

대상 및 방법

1. 대상

1) 연구 재료

2000년과 2003년 *M. pneumoniae* 감염의 유행기에 급성 호흡기 증상을 주소로 서울대학교 어린이병원과 분당서울대학교병원에서 치료받은 소아 중 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단받은 환자 62명으로부터 채취하여 -80°C 에 보관되었던 비인두 흡인물을 대상으로 하였다.

대상 환자들은 *M. pneumoniae* 감염에 대한 특이 항체검사(indirect particle agglutination antibody test)에서 단일항체가 1:640 이상이거나 반복 시행된 검사에서 초기에 비해 4배 이상의 항체가 증가를 보였다. 또한 환자들의 비인두 흡인물에서 QIAamp blood mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)로 DNA를 추출하여 *M. pneumoniae*의 P1 gene 일부를 증폭시키는 *M. pneumoniae* 특이 PCR을 시행했을 때 모두 양성 소견을 보였다⁸⁾.

또한 배양법을 구축하기 위하여 -80°C 에 보관되었던 비인두 흡인물 28개와 2009년 8월부터 9월까지 급성 호흡기 증상을 주소로 분당서울대학교 병원에서 치료받은 소아 중 *M. pneumoniae* 폐렴이 의심되는 5명에서 채취한 비인두 흡인물을 *M. pneumoniae* 배양의 재료로 이용하였다.

2) PCR

*M. pneumoniae*의 23S rRNA domain V (peptidyl transferase) 부위와 ribosomal protein L4를 *M. pneumoniae* 특이 PCR로 증폭한 후 염기서열분석을 시행하였다. PCR에는 *M. pneumoniae* 표준 균주, ATCC 29342 (ATCC, Rockville, MD,

USA)를 양성대조로, 증류수를 음성대조로 사용하였다. Table 1과 같은 시발체를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응은 20 μL reaction을 시행하였다. genomic DNA를 50-200 ng 사용하였으며 10 X reaction buffer 2 μL , MgCl_2 2.0 mM, dNTP mix 0.2 mM, 전시발체와 역시발체 각각 4 pmol, Takara Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) 1 unit를 혼합하여 시행하였고 양성대조와 음성대조를 항상 포함하였다. denaturation, annealing 그리고 elongation 온도와 시간은 각각 95°C 에서 30초, 각 시발체에 따라 $55-60^{\circ}\text{C}$ 에서 40초-1분, 그리고 72°C 에서 40초-1분이며 35회 실시하였다. 증폭된 PCR 생산물 5 μL 를 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 PCR 양성 여부를 확인하였다.

23S rRNA 특이 PCR의 MP23-333F - MP23-638R 시발체로 PCR 후 MP23S V-F - MP23-638R 시발체로 nested PCR을 시행하였고, ribosomal protein L4 특이 PCR의 경우 MPL4-26F - MPL4-523R 시발체로 PCR 후 MPL4-F - MPL4-R 시발체로 nested PCR을 시행하였다(Table 1).

3) 염기서열 분석을 통한 유전자 변이의 확인

증폭된 PCR 생산물 중 15 μL 를 취하여 AccuPrep[®] PCR Purification Kit (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea)로 정제하여 염기서열 분석에 사용하였다.

염기 서열 반응은 Standard protocol에 의해 BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 사용하여 dideoxy chain termination법으로 DNA Engine (MJ research, Waltham, MA, USA)에서 시행하였다. 반응 산물을 정제 후 후에 ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Inc, Foster City, USA)에서 전기영동한 후 자료는 Sequencing analysis v 3.3 (Applied Biosystems, Inc, Foster City, USA)으로 분석했다.

염기서열의 변이 분석에는 Sequencher[®] 4.8 (Gene Codes Co, Ann Arbor, USA)를 이용하였다. macrolide계 항균제에 감수성인 *M. pneumoniae* 표준 균주(ATCC 29342)의 염기서열과 비교하여 대상 검체에서 23S rRNA domain V의 2063 혹은 2064 위치에 A→G 전환, ribosomal protein L4 영역의 아미노산 변이가 있는지를 확인하였다.

4) 비인두 흡인물에서의 *M. pneumoniae* 배양

M. pneumoniae 특이 PCR에서 양성되었던 62 검체 중 2003년 이후에 채취되어 -80°C 에 보관되었던 비인두 흡인물 28 검체를 Chanock's glucose 액체배지와 한천배지에 접종하고 37°C 의 5% CO_2 항온기에서 6주간 관찰하여 배양을 확인하였다^{7, 9)}. 또한 2009년 8월부터 9월까지 분당서울대학교 병원에서 *M. pneumoniae* 폐렴으로 치료받은 소아 5명에서 채취한 비인두흡인물을 액체배지와 한천배지에 접종하였다. 이 검체는 채취한 후 냉장보관하였고 당일 혹은 다음날 배지에 접종하였다.

액체배지의 조성은 다음과 같다[PPLO broth (Difco, Sparks, MD, USA) 70 mL, horse serum 20 mL, 25% yeast extract

Table 1. Oligonucleotide Primers used in this Study

Primer target and designation	Primer position (nucleotide no.)	Primer sequence	Product size
Domain V of 23S rRNA gene			
MP23-333F	1,873	CGCAAGCGAAGCTTTTAACT	306 bp
MP23-638R	2,178	ATTCCACCTTTCGCATCAAC	
MP23S V-F	1,916	TAACTATAACGGTCCTAAGG	263 bp
MP23-638R	2,178	ATTCCACCTTTCGCATCAAC	
Ribosomal protein L4			
MPL4-26F	26	TCGACGGTTCCTTTGAACT	498 bp
MPL4-523R	523	TGTTGCTGGTGCTTTGTTCT	
MPL4-F	46	GAACCAGTGAAACTAAGCCC	420 bp
MPL4-R	465	TTTGTCCAAGAGCTTGGCAC	

Table 2. Frequency of Mutation Associated with Macrolide Resistance in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia

Mutation	No. of positive (%)
23S rRNA*	
A2063G	0/61 (0)
A2064G	1/61 (1.6)
L4 ribosomal protein	
M144V	17/62 (27.4)

*Sequencing analysis of 1 specimen was not done because of the negative PCR result

10 mL, 20% glucose 2.5 mL, 1% phenol red 200 µL, 2.5% thallium acetate 1 mL, 200,000 units/mL potassium penicillin G 0.5 mL, 20,000 µg/mL cefotaxime 0.5 mL].

비인두 흡인물은 접종하기 전 충분히 흔들어 주었고 200 µL를 2 mL의 Chanock's glucose 배지가 들어있는 24 well plate에서 10⁻¹-10⁻⁶까지 계단 희석하였다. 각각의 희석액을 10 µL 취하여 Chanock's glucose 한천배지에 접종한 후 가슴상자에 넣어 집락의 형성 유무를 현미경(100×)으로 확인하였다. 배지의 색깔을 2-3일에 한번씩 관찰하여 적색에서 황색으로 변하면 *M. pneumoniae*가 자라는 것으로 보고 *M. pneumoniae* 특이 PCR을 시행하였다.

배양시 양성 대조로 *M. pneumoniae* 표준 균주를 이용하였고 새로운 배지를 만들 때 마다 2 mL를 덜어 15 mL conical tube에 넣어 음성대조로 이용하였다.

결 과

1. 23S rRNA gene의 염기서열분석

62 검체 중 61 검체에서 23S rRNA gene에 대한 염기서열 분석이 가능했다. 61 검체 중 1 검체(1.6%)에서 A2064G 변이가 확인되었고 60 검체(96.8%)는 2063, 2064 위치의 변이가 없었다. 나머지 1 검체(1.6%)는 반복 시행한 PCR에서 약양성 혹은 음성 결과를 보여 염기서열분석을 시행하지 못했다(Table 2).

Table 3. No Association between 23S rRNA and L4 Ribosomal Protein Mutations

Mutations	No. of positive
23S rRNA (+), L4 protein (-)	1
23S rRNA (-), L4 protein (+)	17
23S rRNA (+), L4 protein (+)	0

2. Ribosomal protein L4의 염기서열분석

62 검체 중 17 검체(27.4%)에서 M144V 변이가 확인되었고 45 검체(72.6%)에서는 아미노산 변이가 없었다(Table 2).

23S rRNA gene의 변이가 확인된 1 검체에서 ribosomal protein L4의 변이는 없었고, ribosomal protein L4 변이가 있는 17개 검체에서 23S rRNA gene의 염기서열을 분석했을 때 변이는 없었다(Table 3).

3. 비인두 흡인물에서의 *M. pneumoniae* 배양

M. pneumoniae 표준 균주는 접종 4일째에 10⁻¹ 희석배지에서 배지의 색깔이 붉은색에서 노란색으로 변하였고 한천배지에서도 *M. pneumoniae*의 전형적인 집락이 현미경(100×)에서 150개 이상 관찰되었으며 접종 10일째에는 10⁻⁶ 희석배지까지 모두 배지의 색깔변화가 있었다. 액체배지에 배양된 *M. pneumoniae* 표준 균주에서 DNA를 추출하여 *M. pneumoniae* 특이 PCR을 시행하여 양성임을 확인하였고, *M. pneumoniae* 23S rRNA gene, ribosomal protein L4에 대한 염기서열분석에서 변이가 없음을 확인하였다. 2003년에 채취되어 -80°C에 보관되었던 28 검체는 배양 2주째까지 배지의 색깔 변화가 없어서 접종 10-21일 사이에 한천배지에 blind subculture를 시행하였으나 총 6주간의 관찰 기간 중 액체배지의 색깔 변화나 한천배지에서의 집락이 관찰되지 않았다. 2009년에 채취하여 4°C에 1-2일 보관하였다가 액체배지와 한천배지에 접종한 5 검체 중 2 검체는 액체배지와 한천배지에서 접종 4주째에 배양이 확인되었으며 *M. pneumoniae* 특이 PCR 양성임을 확인하였고, 나머지 3 검체는 6주간 관찰하였으나 배양되지 않았다.

고찰

Macrolides 항균제는 감수성이 있는 세균의 ribosome (50S subunit)에 가역적으로 결합하여 transpeptidation, translocation, peptide bond formation의 과정을 방해함으로써 세균의 RNA 의존성 단백질합성을 저해한다¹⁰⁾. macrolide계 항균제의 결합부위는 23S ribosomal RNA의 domain II와 V의 구조에 의해 형성된다¹¹⁾. *M. pneumoniae* genome에는 한 개의 rRNA operon이 있는데, 23S rRNA gene의 peptidyl transferase loop 2063, 2064 위치에서의 점 돌연변이(point mutation)에 의해 macrolides의 ribosome에 대한 결합력이 감소되어 내성이 생기는 것으로 알려져 있다^{12, 13)}. 이전의 보고에서 erythromycin으로 치료 후 고도의 macrolides 내성 균주가 분리된 환자에서도 임상 경과에는 영향이 없다고 하였으나^{3, 4)}, 최근 macrolides를 사용했음에도 불구하고 심하고 오래가는 폐렴 환자에서 분리된 *M. pneumoniae*에 대한 분석에서 23S rRNA gene의 A2063G, A2064G 변이가 보고되어 *M. pneumoniae*의 macrolide 내성과 임상경과와의 관계를 주목할 필요가 있을 것으로 보인다^{14, 15)}.

Macrolides에 내성을 보이는 *M. pneumoniae* 균주에 대한 국내외의 보고를 보면, 일본에서는 2002년부터 2006년까지의 한 연구에서 2002년에는 47 분리 균주가 모두 macrolides에 감수성이었지만 2003에는 120 균주 중에 6 균주(5%), 2005년에는 52 균주 중에 7 균주(13.5%), 그리고 2006년에는 121 균주 중에 37 균주(30.6%)가 macrolides 내성을 보였다고 보고하였고⁵⁾, 프랑스에서는 2005년 이전 분리 균주에서는 macrolides 내성 genotype이 확인되지 않았으나 2005년부터 2007년 사이에 채취된 51 검체 중 5 검체에서 A2063G 혹은 A2064G, C2616G 혹은 C2616A 변이가 확인되었고 이 중 3 검체에서는 *M. pneumoniae*가 분리 동정되어 시행한 항균제 감수성 검사에서 erythromycin과 azithromycin에 고도 내성을 보였다⁶⁾. 중국의 1개 어린이병원에서의 보고에 따르면 2005년에서 2008년 사이에 분리된 53 균주 중 44 균주(83%)가 erythromycin에 내성이었고, 44 균주 모두 A2063G 변이주였다고 보고하였다¹⁶⁾.

국내에서는 2005년 Chang 등⁷⁾의 연구에서 2002년부터 2005년 사이에 분리된 123 균주 중 60 균주(48.8%)가 erythromycin에 내성을 보였으며 내성 균주 모두에서 23S rRNA gene (A2063G, A2064G, A2063T, A2063C, C2616G, A2064C, G2063C)과 ribosomal protein L4 (M144V)의 변이가 있다고 하였다.

Macrolides 내성 *M. pneumoniae* 균주에서 확인된 23S rRNA gene의 점 돌연변이는 2063, 2064, 그리고 2616 위치에서 일어난다고 알려져 있으며 본 연구에서는 그 중 대다수를 차지하는 2063, 2064 위치의 변이를 확인할 수 있는 시발체를 사용하였다. 2000년과 2003년 *M. pneumoniae* 유행기에 채취된 검체를 이용한 본 연구에서는 61 검체 중 1 검체(1.6%)에서만 A2064G

변이가 확인되어 예상했던 것보다는 변이주의 검출률이 낮았다.

실험실에서 clindamycin과 telithromycin에 내성이 유도된 균주¹⁷⁾와 macrolides 내성을 보이는 임상 분리 균주에서 ribosomal protein L4와 L22의 아미노산 변이가 보고되었고, 특히 국내의 한 연구⁷⁾에서 내성 균주 모두가 ribosomal protein L4의 변이를 보였기 때문에 본 연구에서는 대상 검체에서 ribosomal protein L4의 아미노산 변이를 확인하고자 하였다. 그 결과 62 검체 중 17 검체(27.4%)의 M144V 변이를 확인하였다. 하지만 호흡기 검체에서의 *M. pneumoniae* 분리 동정을 성공하지 못했기 때문에 항균제 감수성 검사를 시행하지 못했고 ribosomal protein L4의 변이와 macrolides 내성과의 연관성에 대해 밝히지는 못했다.

비인두 흡인물에서 A2064G 변이주가 확인된 28개월 환아는 내원 한 달 전부터 기침, 콧물 등의 증상이 반복되었고 내원 하루 전부터 고열이 있어 입원하였고 흉부 방사선 사진 상 좌측 중엽의 폐침윤과 소량의 pleural effusion이 관찰되었다. 입원 이후 2 일째부터 clarithromycin을 사용하였으며 입원 5 일째까지 발열이 있었고 혈청학적 검사상 입원 당시 mycoplasma Ab 1:80, 추적 검사상 1:20,480으로 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단하였다. 이 환아의 비인두 흡인물을 이용한 *M. pneumoniae* 특이 PCR에서 23S rRNA gene의 변이가 관찰되었으나 ribosomal protein L4의 아미노산 변이는 관찰되지 않아서 Chang 등⁷⁾의 연구 결과와는 다른 양상을 보였고, 임상적으로 clarithromycin에 대한 치료 실패를 생각할 만한 경과가 아니었던 것으로 보인다.

호흡기 검체를 이용한 *M. pneumoniae*의 배양 양성률은 Chang 등^{18, 19)}은 소아 검체에서 6.5–14%, Dular 등²⁰⁾은 14.2–45.9%, 그리고 Morozumi 등⁵⁾은 66.7–85.7%라고 보고하였는데 검체의 채취 및 처리 방법, 배지의 종류와 배양 조건에 따라 차이가 있을 수 있다⁷⁾. 본 연구에서는 비인두흡인물 채취 당일 혹은 다음날 집중한 2009년 5 검체 중 2검체에서 *M. pneumoniae*가 배양되었다. 하지만 -80°C에 보관되었던 비인두 흡인물 28 검체는 6주간 관찰하였으나 액체배지 및 한천배지 모두에서 *M. pneumoniae* 배양이 확인되지 않았는데, 이는 *M. pneumoniae* 배양을 위한 수송 배지를 사용하지 않았고 검체 채취 후 -80°C 냉동고에 보관하기까지 걸린 시간 및 보관기간이 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

*M. pneumoniae*는 배양 조건이 까다롭고 배양되기까지 시간이 오래 걸리기 때문에 배양법에 의한 진단이나 항균제 감수성 검사가 환자를 진료하는데 있어 직접적인 도움을 주기는 어렵다. 하지만 균을 분리해야 항균제 감수성 검사가 가능하고 균의 항균제 감수성 결과의 분포나 추이를 아는 것은 감염증의 치료에 있어서 항균제의 유용성을 평가하고 향후 항균제를 선택하는데 정보를 제공하므로 중요하다.

Li 등¹⁵⁾은 배양법을 통한 감수성 검사가 시간이 오래 걸리는 점을 보완하기 위해 *M. pneumoniae* 감염 환자의 호흡기 검체를 이용하여 23S rRNA gene의 변이를 빠른 시간 내에 detection

할 수 있는 RT-PCR을 고안하였다. 하지만 Okazaki 등¹⁴⁾은 항균제 감수성 검사에서 erythromycin에 저항성이지만 23S rRNA gene의 변이는 없는 균주를 보고한 바 있으므로 항균제에 내성인 균주의 분포를 확인하고 내성기전을 규명하기 위해서는 배양법과 분자유전학적인 방법이 동시에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

M. pneumoniae 감염의 국내 유행 양상을 보면, 매년 산발적으로 학동기 소아의 폐렴의 주요한 원인이 되기도 하지만, 3-4년을 주기로 *M. pneumoniae* 폐렴의 유행이 보고되어 왔다²¹⁾. 최근에는 2000년, 2003년, 그리고 2006년에 각각 *M. pneumoniae* 폐렴이 유행하였다. *M. pneumoniae* 감염은 치명률이 높지는 않지만 *M. pneumoniae* 폐렴의 유행으로 지역사회에 미치는 영향이 크므로 호흡기 검체에서의 *M. pneumoniae* 배양법의 구축과 PCR 등의 분자유전학적인 방법을 통해 국내에서 분리되는 *M. pneumoniae*의 항균제 감수성과 macrolide계 항균제에 대한 내성균의 빈도와 기전을 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 계획 단계의 목적을 모두 달성하지는 못하였으나 본 연구를 통해 얻어진 *M. pneumoniae* 배양 기법과 PCR 기법으로 향후 국내 소아에서의 *M. pneumoniae* 관련 분야의 연구를 계획하고 진행하는데 기초를 제공할 수 있을 것으로 보인다.

요 약

목적: 최근에 macrolide계 항균제에 내성인 *M. pneumoniae* 균주가 증가한다는 외국의 보고가 있었으며, 국내에서 수행된 한 연구에서도 *M. pneumoniae*의 macrolide 내성률을 49% 정도로 보고한 바 있다. 이에, 본 연구는 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단된 소아의 비인두 흡인물에서 *M. pneumoniae*의 macrolide 계 항균제 내성에 연관된 것으로 알려진 유전자 변이 유무를 확인하고, *M. pneumoniae*의 macrolide계 항균제에 대한 최소억제농도를 측정하기 위한 기초 연구로 *M. pneumoniae* 배양법을 구축하고자 시행되었다.

방법: 2000년과 2003년 *M. pneumoniae* 감염의 유행기에 급성 호흡기 증상을 주소로 서울대학교 어린이병원과 분당서울대학교병원에서 치료받은 소아 중 혈청학적 검사와 *M. pneumoniae* PCR을 통해 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단받은 환자 62명으로부터 채취하여 -80°C에 보관되었던 비인두 흡인물을 대상으로 하였다. *M. pneumoniae*의 23S rRNA domain V의 peptidyl transferase 부위와 ribosomal protein L4를 *M. pneumoniae* 특이 PCR로 증폭한 후 염기서열분석을 시행하였다. 염기서열의 분석은 *M. pneumoniae* 표준 균주와 비교하여, 23S rRNA domain V의 A2063G, A2064G 변이와 ribosomal protein L4의 M144V변이 유무를 확인하였다. 또한, *M. pneumoniae* 표준 균주와 33개의 비인두흡인물(-80°C에 보관되었던 28검체와 1-2일간 냉장보관되었던 비인두흡인물 5 검체)을 Chanock's glucose 액체배지와 한천배지에 접종하고 37°C의 5% CO₂ 항온

기에서 6주간 관찰하여 배양을 확인하였다.

결과: 총 62 검체 중 23S rRNA gene에 대한 염기서열분석이 가능했던 61 검체 중 1검체(1.6%)에서 A2064G변이가 관찰되었고, 62 검체의 ribosomal protein L4에 대한 염기서열분석 결과 17검체(27.4%)에서 M144V 아미노산 변이가 확인되었다. *M. pneumoniae* 배양 결과, 표준 균주는 Chanock's glucose 액체배지와 한천배지 모두에서 배양되었고 2009년에 채취된 5검체 중 2검체에서 배양이 확인되었으나, -80°C에 보관되었던 28검체는 모두 배양되지 않았다.

결론: 본 연구에서 23S rRNA gene의 유전자 변이 빈도는 매우 낮았고, ribosomal protein L4의 M144V 변이는 좀 더 많은 검체에서 확인되었다. Macrolide계 항균제에 내성인 *M. pneumoniae*의 분포와 *M. pneumoniae*의 23S rRNA gene과 ribosomal protein L4의 변이에 대한 추가적인 연구들을 통해 *M. pneumoniae*의 macrolide 항균제에 대한 내성기전을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

References

- 1) Baum SG. Mycoplasma pneumoniae and atypical pneumonia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005:2271-8.
- 2) Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. In vitro activities of ABT-773 and other antimicrobials against human mycoplasmas. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:39-42.
- 3) Niitu Y, Hasegawa S, Suetake T, Kubota H, Komatsu S, Horikawa M. Resistance of Mycoplasma pneumoniae to erythromycin and other antibiotics. J Pediatr 1970;76:438-43.
- 4) Stopler T, Gerichter CB, Branski D. Antibiotic-resistant mutants of Mycoplasma pneumoniae. Isr J Med Sci 1980;16:169-73.
- 5) Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, Chiba N, Takayanagi R, Matsubara K, et al. Increased macrolide resistance of Mycoplasma pneumoniae in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:348-50.
- 6) Peuchant O, Menard A, Renaudin H, Morozumi M, Ubukata K, Bebear CM, et al. Increased macrolide resistance of Mycoplasma pneumoniae in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. J Antimicrob Chemother 2009;64:52-8.
- 7) Chang MW, Kim KH, Park ID, Song GY, Kim SW, Lee EY, et al. Isolation of Mycoplasma pneumoniae and antimicrobial susceptibilities of the isolates. J Life Science 2005;15:863-70.
- 8) Kim NH, Lee JA, Eun BW, Shin SH, Chung EH, Park KW, et al. Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children during two outbreaks. Pediatr Infect Dis J 2007;26:897-903.
- 9) Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, et al. Emergence of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob

- Agents Chemother 2005;49:2302–6.
- 10) Leclercq R, Courvalin P. Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2727–34.
 - 11) Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. The macrolide–ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Molecular Microbiology* 1999; 31:623–31.
 - 12) Gobel U, Butler GH, Stanbridge EJ. Comparative analysis of mycoplasma ribosomal RNA operons. *Isr J Med Sci* 1984;20: 762–4.
 - 13) Lucier TS, Heitzman K, Liu SK, Hu PC. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2770–3.
 - 14) Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, et al. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol* 2001;45:617–20.
 - 15) Li X, Atkinson TP, Hagood J, Makris C, Duffy LB, Waites KB. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:693–6.
 - 16) Liu Y, Ye X, Zhang H, Xu X, Li W, Zhu D, et al. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2160–2.
 - 17) Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:460–5.
 - 18) Chang MW, Kim KH, Park ID, Joh MH. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens of patients by PCR and culture method. *J Korean Soc Microbiol* 1995;30:517–25.
 - 19) Chang MW, Kim KH, Park ID, Kang KH, Kong EH, Jeong MH, et al. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* and antimicrobial susceptibilities of the *M. pneumoniae* isolates. *J Bacteriol Virol* 2003;33:183–91.
 - 20) Dular R, Kajioka R, Kasatiya S. Comparison of Gen-Probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1068–9.
 - 21) Eun BW, Kim NH, Choi EH, Lee HJ. *Mycoplasma pneumoniae* in Korean children: the epidemiology of pneumonia over an 18-year period. *J Infect* 2008;56:326–31.