

Multiplex PCR을 이용한 Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 Quinolone 내성 *qnr*유전자 검출

진주보건대학 임상병리과

양 병 선

Multiplex PCR for Detection of Quinolone Resistance *qnr* Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Byoung-Seon Yang

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

To develop a rapid and reliable single-tube-based PCR technique for detection simultaneously the quinolone resistance *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes. After multiple alignment, primers were designed to detect known *qnr* variants. I was used for A total of 43 extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from university hospital were tested for screening, as with *qnr* genes. In optimized conditions, all positive controls confirmed the specificity of the PCR primers. Out of 43 isolates, *qnrA* genes were detected 19 (44.2%), *qnrB* genes 5 (11.7%), *qnrS* genes 15 (34.9%) and 8 (18.6%) isolates were not detected. I report here a fast and reliable technique for rapid screening of *qnr* positive strains to be used for epidemiological surveys.

Key Words : *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, Extended-spectrum β -lactamases, Multiplex polymerase chain reaction

I. 서 론

광범위 내성 β -lactamases 세균은 extended spectrum cephalosporin, aztreonam 및 oxyimino- β -lactams 뿐만 아니라, 이전 세대의 penicillin과 cephalosporins 항생제에 내성을 나타내는 세균이다(Pnaiara 등, 2000; Silva 등,

2001).

Quinolone계 항생제는 비노기계 감염 치료에 매우 효과적이어서 초기 quinolone계 항생제인 nalidixic acid는 그람음성간균 세균치료에 이용하였다. 그 이후 그람음성 세균 및 그람양성세균에 항균작용이 있는 광범위한 quinolone계 fluoroquinolone을 개발하여 사용하고 있다 (Cattoir 등, 2007).

Quinolone계 항생제 내성 *Klebsiella pneumoniae*균주가 미국에서 처음으로 발견되었고 quinolone계 항

교신저자 : 양병선, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142
진주보건대학 임상병리과
Tel : 055-740-1851, 016-835-7191
E-mail : ybseon@jhc.ac.kr

생제 내성 세균은 *qnr* 유전자(*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*)를 보유한다(Robicsek 등, 2006). *qnrA* 유전자는 pentapeptide과에 속하는 218개의 아미노산을 가지고 DNA복제 및 전사 시 gyrase와 topoisomerase IV 효소의 작용을 방해한다(Martinez-Martinez 등, 1998). *qnrA* 유전자를 가진 세균은 nadilixic acid에 저항성을 보이고 fluoroquinolone계 항생제에 대한 MIC가 높게 나타난다(Poirel 등, 2005; Robicsek 등, 2006). *qnrA* 유전자는 전 세계적으로 분포하고 *qnrA1*에서 *qnrA6*까지 6개의 변종을 가진다. 최근에 두 개의 다른 quinolone계 내성유전자 *qnrB*와 *qnrS*가 발견되었고, *qnrB*는 6개의 변종을 가지고 *qnrS*는 두 개의 변종을 가진다. 지금까지의 extended-spectrum β -lactamase(ESBL) 생성 quinolone계 내성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae*의 검출에는 표현형 특성을 이용하여 검출하는 방법이 널리 알려져 있다(Jacoby 등, 2006). 그러나 표현형적 방법은 검출에 시간이 많이 소요된다는 점과 접종량이 정확하지 않으면 정확한 결과를 얻기가 힘들다.

PCR을 기초로 하는 항생제 내성 유전자 검출 방법으로 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석은 보다 더 빠르고, 수행이 수월한 방법이나 재현성과 분석력 그리고 방법의 효율성의 전반적인 특성에 관한 연구가 필요하다. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) 유전자의 분석 방법은 표준화된 방법이나 기술적으로 어려움이 있으며, 시간이 많이 소모되고, 특수한 장비를 필요로 한다. 그러므로 ESBL 생성 quinolone계 내성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae*의 항생제 내성 유전형 검출에 있어 분석력이 좋은 방법이나 재현성을 나타내는 방법을 확립하여야만 한다. Multiplex PCR 방법은 ESBL 생성 quinolone계 내성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae*의 유전형 방법으로 ESBL 생성 quinolone계 내성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae* 임상 분리균주의 검출과 분석의 기술적인 어려움이나, 시간적인 소모 그리고 특수한 장비가 있어야 되는 문제점을 보완하고, 분석력이나 재현성이 좋은 방법으로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 ESBL 생성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae* 균주를 대학병원으로부터 분리하여 항생제 감수성 검사를 실시하고 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 유전자를 대상으로 하여 multiplex PCR을 실시하여 quinolone계 내성 유전자를 빠르고 정확하게 검출하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

2007년 7월부터 10월까지 대학병원에서 VITEK기기 (Biomerieux, Marcy, France)로 ESBL 생성 *E. coli* 와 *K. pneumoniae*로 동정된 43개의 균주를 대상으로 하였다 (Table 1).

2. 항생제감수성 시험

세균을 McFarland No. 0.5 탁도를 맞춘 부유액을 Mueller-Hinton 한천(BD, Detroit, USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 nalidixic acid(NA)와 ciprofloxacin (CIP) 디스크를 2 cm 간격을 두고 올려놓고, 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 2 cm가 되도록 하였다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) 기준표를 참고하여 판독하였다.

3. 균주로부터의 DNA 분리

43균주의 *E. coli* 와 *K. pneumoniae* 균주를 QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

순수 분리된 43개 균주를 LB media(BD, Detroit, USA)를 이용하여 37°C 진탕배양기 에서 하루 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 후 상등액은 버리고 침전물을 이용하여 QIAamp DNA Mini Kit가 제시한 방법으로 DNA를 추출하였다.

4. Multiplex PCR을 위한 Primer의 합성

qnr 유전자의 특성을 분석하기 위한 primer(Bioneer Co., Korea)를 다음과 같이 제작하였다(Table 2).

5. Multiplex PCR을 이용한 *qnr* 유전자의 증폭

Multiplex PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각 2.5 mM),

10 × PCR buffer 2 μL, primer 10 pmol 각각 1 μL씩 넣었고, genomic DNA(25 μg) 1 μL, Taq DNA polymerase (2 unit) 1 μL, 최종 반응액은 증류수로 20 μL 되게끔 실시하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer, Wellesley, USA)에서 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 10분간 반응하였다.

6. PCR 산물의 확인

PCR 증폭산물을 2% agarose gel에 1× TAE buffer에서 70 volt, 100 mA로 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 ethidium bromide(0.5 μg/mL) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV trans-illuminator(Spectroline Co. New York, USA)로 관찰하고,

polaroid camera(Spectroline Co. New York, USA)로 사진 촬영하였다.

III. 결 과

1. 항생제감수성 시험

항생제 감수성 검사에서 Nalidixic acid에는 모두가 내성으로 나타났으며, Ciprofloxacin에는 E8, E11, E15 그리고 K10 4균주가 중등도내성로 나타났으며, 나머지는 모두가 내성을 보였다(Table 1).

Table 1. List of ESBL producing quinolone resistance *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates used in this study

Strains	AST		Quinolone resistance gene				Strains	AST		Quinolone resistance gene			
	NA	CIP	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	ND		NA	CIP	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	ND
E 1	R	R	+				K 1	R	R				+
E 2	R	R				+	K 2	R	R	+			
E 3	R	R	+				K 3	R	R	+			
E 4	R	R	+				K 4	R	R				+
E 5	R	R		+			K 5	R	R				+
E 6	R	R	+				K 6	R	R				+
E 7	R	R				+	K 7	R	R				+
E 8	R	I	+	+			K 8	R	R				+
E 9	R	R				+	K 9	R	R				+
E 10	R	R			+		K 10	R	I	+			+
E 11	R	I	+	+			K 11	R	R	+			
E 12	R	R		+			K 12	R	R				+
E 13	R	R	+				K 13	R	R	+			
E 14	R	R			+		K 14	R	R	+			
E 15	R	I	+	+			K 15	R	R				+
E 16	R	R			+		K 16	R	R	+			
E 17	R	R				+	K 17	R	R				+
E 18	R	R				+	K 18	R	R				+
E 19	R	R	+				K 19	R	R				+
E 20	R	R				+	K 20	R	R	+			
							K 21	R	R				+
							K 22	R	R	+			
							K 23	R	R	+			

AST, antibiotic susceptibility test; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; R, resistant; I, intermediate; ND, not detective; +, positive; -, negative

Table 2. Primer sets used in charactering qnr gene

Primer	Sequence(5'~3')	Gene	Position	Size of PCR-amplified product(bp)
<i>QnrA</i> -F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA1</i> to <i>qnrA6</i>	30-49	580
<i>QnrA</i> -R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		589-608	
<i>QnrB</i> -F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB1</i> to <i>qnrB6</i>	283-302	264
<i>QnrB</i> -R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA		526-545	
<i>QnrS</i> -F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS1</i> to <i>qnrS2</i>	137-156	428
<i>QnrS</i> -R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		543-563	

2. *qnr* 유전자형

Multiplex PCR에서는 전체 43균주 중 quinolone내성 *qnrA* 유전자가 19균주(44.2%), *qnrB* 유전자가 5균주(11.7%), *qnrS* 유전자가 15균주(34.9%) 그리고 8균주(18.6%)에서는 검출되지 않았다. *E. coli* 20개 균주에서는 *qnrA* 유전자가 9균주(45%), *qnrB* 유전자가 5균주(25%), *qnrS* 유전자가 3균주(15%)가 검출되었고, 6균주(30%)에서는 검출되지 않았다. *K. pneumoniae* 23균주에서는 *qnrA* 유전자가 10균주(43.5%), *qnrS* 유전자가 12균주(52.2%)가 검출되었고, 2균주(8.7%)에서는 검출되지 않았다. *E. coli*에서는 3균주(E8, E11, E15)가 *qnrA*, *qnrB* 유전자에 동시에 검출되었고, *K. pneumoniae*에서는 1균주(K10)가 *qnrA*, *qnrS* 유전자에 동시에 검출되었다(Table 2, Fig. 1, 2).

IV. 고 찰

최근에 β -lactam 항균제 내성인 세균에 의한 감염의 증가가 중요한 문제로 대두되고 있다. 세균이 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은 β -lactamase 생성, penicillin-binding protein의 변성, β -lactam 항균제의 세포막 투과성 저하, 세포 밖으로의 항균제 유출 등 다양하며, 장내세균은 흔히 β -lactamase 생성에 의하여 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다. 호흡기감염, 요로감염증, 패혈증, 수막염 등 다양한 감염증의 발생 원인이며, 화학요법에 저항성이 강하기 때문에 기회감염증과 균교대증의 원인이 된다. 또한 최근에는 임상에서 분리된 *K. pneumoniae*에서 quinolone 내성 세균이 발견되었다(Robicsek 등, 2006).

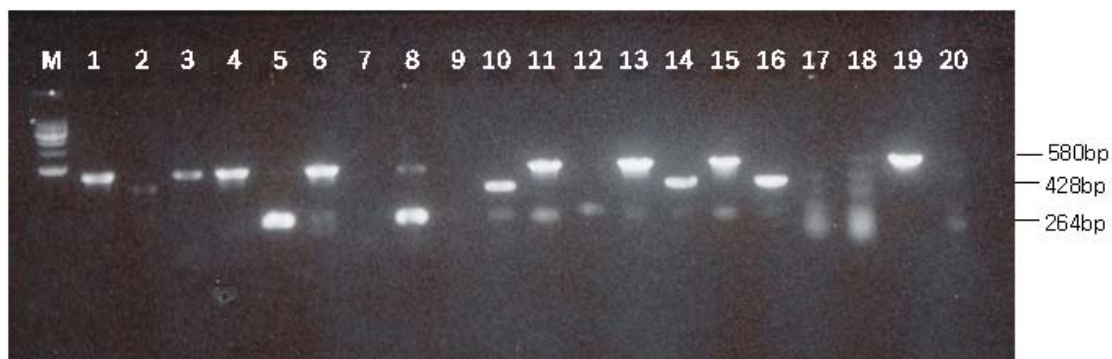


Fig. 1. Electrophoresis of the amplified products of *qnr* genes by mutiplex PCR in 2% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; lanes 1 to 20, *E. coli* university hospital isolates. The amplified products and their sizes are indicated on the left.



Fig. 2. Electrophoresis of the amplified products of *qnr* genes by multiplex PCR in 2% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; lanes 1 to 23, *K. pneumoniae* university hospital isolates. The amplified products and their sizes are indicated on the left.

Quinolone계 내성유전자는 plasmid에 위치하고 transferable 다제내성을 나타내고 특히 ESBL 또는 AmpC β -lactamase와 관련이 있다. Quinolone 단백질은 pentapeptide이고 quinolone계 내성유전자는 임상에서 분리된 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella* 균주에서도 발견된다(Pai 등, 2005; Poirel 등, 2005). 특히 quinolone계 내성유전자는 ciprofloxacin감수성 균주에서도 발견되어 quinolone계 내성세균의 정확한 검출이 요구된다. Quinolone계 내성 *qnr* 유전자는 유전적 다양성을 보여 염기서열을 분석하면 *qnrA* 유전자는 94%-99%, *qnrB* 유전자는 85%-99%, *qnrS* 유전자는 90%정도 일치한다(Pnaiara 등, 2000).

본 실험에서 Multiplex PCR을 실시한 결과 *E. coli* 20개 균주에서는 *qnrA* 유전자가 9균주(45%), *qnrB* 유전자가 5균주(25%), *qnrS* 유전자가 3균주(15%)가 검출되었고, 6균주(30%)에서는 검출되지 않았다. *K. pneumoniae* 23균주에서는 *qnrA* 유전자가 10균주(43.5%), *qnrS* 유전자가 12균주(52.2%)가 검출되었고, 2균주(8.7%)에서는 검출되지 않았다. *E. coli*에서는 3균주가 *qnrA*, *qnrB* 유전자에 동시에 검출되었고, *K. pneumoniae* 에서는 1균주가 *qnrA*, *qnrS* 유전자에 동시에 검출되었다. 특히, 항생제 감수성 검사에서 ciprofloxacin에 중등도 내성으로 나타난 4개의 균주는 *qnrA* 와 *qnrB* 또는 *qnrA* 와 *qnrS* 유전자를 동시에 가지고 있는 것으로 나타나 세포막 투과성 저해 또는 유출펌프의 작용으로 quinolones계 항생제에 내성을 나타내는 것으로 사료된다. 그러므로 분자 생물학적 기법인 multiplex PCR을 이용한 *qnr* 유전자의 검출은 표현형

적 방법의 문제점 해결이나 원내감염의 역학조사에 아주 유용한 방법이고 quinolone계 내성유전자를 3시간 이내에 검출 가능한 빠르고 확실한 방법이라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cattoir V, Weill FX, Poirel L. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *J Antimicrobial chemother* 59:751-754, 2007.
2. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM. *QnrB* another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1178-1182, 2006.
3. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351:797-799, 1998.
4. Pai H, Seo MR, Choi TY. Association of *QnrB* determinants and production of extended-spectrum β -lactamase or plasmid-mediated AmpC β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:366-368, 2007.
5. Pnaiara E, Platouka H, Dimopoulou E, Tzelepi B, Miriagou, Tzouveleki LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Antimicrobial Chemother* 12:204-207, 2000.
6. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and

- genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3992-3997, 2006.
7. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammari H. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3523-3525, 2005.
 8. Poirel L, Van De Loo M, Mammari H. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum β -lactamase VEM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3091-3094, 2005.
 9. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6:629-640, 2006.
 10. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF. *Qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2872-2874, 2006.
 11. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, Miranda G, Leanos B, Solorzano F, Echaniz G. Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* 39:3193-3196, 2001.