

Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Diseased Animals in Korea

Dong-Ho Shin, Ha-Young Kim, Jae-Won Byun, Dae Keun Kim, Suk Kyung Lim and Byeong Yeal Jung*

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-757, Korea

Received February 27, 2010 / Accepted April 5, 2010

Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants have been contributed to quinolone resistance of gram-negative bacteria worldwide. However, little data on the prevalence of these determinants in bacteria from animals are available in Korea. In this study, the prevalence of PMQR genes was investigated with *E. coli* originating from diseased animals. Among 55 *E. coli* tested, 11 showed PMQR genes by PCR. The most prevalent genotype was *qepA* (14.5%), followed by *aac(6′)-Ib-cr* (7.3%) and *qnrS* (1.8%). Interestingly, two isolates with PMQR genes did not show quinolone resistance in this study. The isolates exhibited higher fluoroquinolone resistance in *aac(6′)-Ib-cr* in combination with *qnrS* or *qepA* compared with *aac(6′)-Ib-cr* only. In a conjugal transfer test, PMQR genes were transferred from donor to recipient.

Key words : Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR), *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*

서 론

Quinolone계 항생제는 1962년 nalidixic acid의 형태로 처음 임상에 도입된 이후, 동물질병 치료에 광범위하게 사용되어 왔다[9]. 1980년대부터는 약효가 개선된 fluoroquinolone의 형태로 사용되어 왔지만[1,13], 과도한 사용으로 인해 quinolone과 fluoroquinolone에 내성을 가지는 세균이 점점 증가하고 있는 추세이다[16].

Quinolone계 항생제는 DNA gyrase와 topoisomerase IV를 억제하여 그람음성균에 항균력을 나타내는데, DNA gyrase와 topoisomerase IV를 encoding하는 chromosomal 유전자의 변화로 quinolone계 항생제에 내성을 유발하는 것으로 알려져 있다[6]. 한편, plasmid에 의한 quinolone 내성 *Klebsiella pneumoniae*가 처음 보고된 이후[11], 여러 종류의 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) 인자들이 보고되어 왔다 (Qnr, AAC(6′)-Ib-cr, QepA)[13]. Qnr 단백질은(QnrA, QnrB, QnrS) quinolone으로부터 DNA gyrase와 topoisomerase IV를 보호하며[15], AAC(6′)-Ib-cr은 AAC(6′)-Ib의 변이체로 ciprofloxacin과 norfloxacin의 항균력을 억제한다[14]. QepA는 efflux pump를 encoding하는 유전자의 변이로 내성을 나타내며 *E. coli*에서 처음 보고 되었다[17]. *qnrA*와 *aac(6′)-Ib-cr* 유전자는 사람의 장내세균에서 널리 분포하고 있지만[7,12], *qepA* 유전자는 상대적으로 보고가 적은 편이다[8].

사람유래 장내세균에서 PMQR 유전자에 대한 보고는 증가

하고 있지만, 동물유래 PMQR에 대해서는 연구가 미진한 편이다. 한편, 사람에서 보고된 PMQR 유전자가 동물에서도 확인되고 있으며[16], 이들 PMQR 유전자가 plasmid 매개로 다른 균주에 전파될 수 있기 때문에 공중보건학적인 측면에서 매우 중요하다.

이러한 내용을 배경으로 하여 본 연구에서는, 병성감정의 동물에서 분리된 *E. coli*를 대상으로 PMQR 유전자의 분포양상을 조사하고 PMQR 유전자의 전달여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 균주 및 minimum inhibitory concentration (MIC)

2008년 1월부터 12월까지 국립수의과학검역원에 병성감정의 동물에서 분리된 *E. coli* 55주를 시험 균주로 사용하였다. MIC측정은 agar dilution방법을 사용하였으며[14], nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENO), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFR) 등 5종의 항생제(Sigma, USA)를 이용하여 Clinical Laboratory Standard Institute [4] 기준에 따라 측정하였다. 대조균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였으며, 접합전달 실험의 수용체로 *E. coli* J53을 사용하였다.

PMQR 유전자 검출

시험 균주의 PMQR 유전자(*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*) 존재 유무를 확인하기 위해 PCR (Thermal Cycler Dice TP 600, TAKARA, Japan)을 실시하였다. Genomic DNA는 boiling방법으로 추출하여 사용하였으며, HotStart

*Corresponding author

Tel : +82-31-467-1756, Fax : +82-31-467-1868

E-mail : jungby@nvrqs.go.kr

PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 20 pmole/μl로 희석된 각각의 primer (Table 1)를 1 μl씩 첨가하여 최종 20 μl 반응용액을 만들었다. PCR 반응 조건은 predenaturation (94°C; 5분)을 실시한 후 denaturation (94°C; 30초), annealing (*qnrA* 48°C, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* 53°C, *aac(6′)-Ib-cr* 58°C; 30초), extension (72°C; 7분)을 30회 반복하였고 72°C에서 10분 동안 final extension하였다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel을 이용하여 확인하였고, 증폭산물의 염기서열을 분석은 National Center for Biotechnology Information web site에서 BLAST tool을 사용하여 비교 분석하였다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

접합전달 시험

PMQR 유전자가 확인된 균주를 공여체로 사용하고 수용체로서는 *E. coli* J53을 사용하여 Bradley 등의 방법[2]에 따라 유전자 전달 시험을 실시하였다. 즉, tryptic soy broth (TSB; Difco, USA)에 37°C, 20시간 호기배양된 공여체와 수용체를 각각 TSB에 재접종하여 37°C, 4시간 진탕배양한 후 이를 1:1의 비율로 TSB에 혼합하여 37°C, 18시간 진탕배양하였다. 이 혼합 배양액을 ciprofloxain (Sigma, USA)과 sodium azide (Sigma, USA)가 각각 0.125 μg/ml, 100 μg/ml의 농도로 함유된 MacConkey agar (Difco, USA)에 접종하여 37°C, 20시간 배양하였다. 형성된 집락에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 PMQR 유전자의 전달 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

동물에서 PMQR 유전자의 분포양상

동물에서 분리된 *E. coli*를 대상으로 5종의 PMQR 유전자 검출을 위한 PCR을 실시하고 증폭산물의 염기서열을 분석한 결과, *qnrS* (GenBank accession number: EU195834), *aac(6′)-Ib-cr* (EU077612), *qepA* (NC010558)가 확인되었다(Table 2). 국내 대학병원에서 사람유래 균주에 대해 PMQR 유전자의 분포율을 조사한 결과, *qnrA*가 10.2% 분포하였으며, *qnrB*가 6.8%, *qnrS*가 0.5%, *aac(6′)-Ib-cr*이 2.2%, *qepA*가 0.2%로 보고되었다[7,8]. 한편, Lei 등은 돼지와 조류유래 *E. coli*에서 *qnr* 유전자 양성률이 6%이었다고 보고하였고[9], Ma 등은 동물유래 *Enterobacteriaceae*를 대상으로 PMQR 유전자 분포를 조사하여 *qnr*이 7.9% 분포하였고, *aac(6′)-Ib-cr*이 18.8%, *qepA*가 15.8%로 보고하였다[10]. 이와 비교하여 본 연구에서는 *qnrA*, *qnrB*가 검출이 되지 않아 국내 사람유래 PMQR 유전자 분포율과 차이가 있었다. 한편, 본 연구에서 *aac(6′)-Ib-cr*에 대한 양성률이 7.3%로 나타나, Ma 등[10]의 성적과 유의한 차이가 인정되었지만($p < 0.05$), *qnrS* (1.8%), *qepA* (14.5%)에 대한 양성률에서는 유의한 차이를 관찰할 수 없었다($P > 0.05$).

본 연구에 사용된 55주의 *E. coli* 중에서 PMQR 양성균주는 총 11주이었는데, 그 중 9주는 1개의 유전자만이 확인되었고, 나머지 2주는 2개의 유전자를 동시에 보유하고 있었다. 또한, *qepA* 유전자를 보유한 균주는 8주로서 다른 유전자보다 동물

Table 1. Primer set used in this study

Name	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	Reference
<i>qnrA</i> F	TCA GCA AGA GGA TTT CTC A	627	[14]
<i>qnrA</i> R	GGC AGC ACT ATT ACT CCC A		
<i>qnrB</i> F	GAT CGT GAA AGC CGA AAA GG	469	[15]
<i>qnrB</i> R	ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC		
<i>qnrS</i> F	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	417	[15]
<i>qnrS</i> R	TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC		
<i>aac(6′)-Ib-cr</i> F	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482	[12]
<i>aac(6′)-Ib-cr</i> R	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		
<i>qepA</i> F	AAC AGG GAC TGG TGA AAT GC	583	In this study
<i>qepA</i> R	TGC TTC ATT AAT GCG TGC TC		

Table 2. Prevalence of PMQR genes in *E. coli* isolated from animals

PMQR	No. (%) of isolates with indicated PMQR genes					Total (n=55)
	Chicken (n=28)	Pig (n=11)	Duck (n=6)	Dog (n=5)	Other ¹⁾ (n=5)	
<i>qnrA</i>	0	0	0	0	0	0
<i>qnrB</i>	0	0	0	0	0	0
<i>qnrS</i>	0	1 (9.1)	0	0	0	1 (1.8)
<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	2 (7.1)	2 (18.2)	0	0	0	4 (7.3)
<i>qepA</i>	3 (10.7)	2 (18.2)	1 (16.7)	2 (40.0)	0	8 (14.5)

¹⁾Cattle, cat and pheasant.

Table 3. MICs of *E. coli* with PMQR genes and PMQR gene patterns of transconjugant

Strain ID	MIC (µg/ml)					PMQR genes	
	NAL ¹⁾	CIP	ENO	NOR	OFR	Donor	transconjugant
08D136	128	0.25	0.5	1	2	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08D291	>256	>64	>64	>64	>64	<i>qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>
08D345	>256	8	32	32	>64	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08D345-1	>256	16	16	>64	>64	<i>qepA, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qepA, aac(6')-Ib-cr</i>
08D389	>256	8	16	16	>64	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08D413	>256	16	16	16	>64	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08D431	>256	4	16	16	>64	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08Q233	128	0.125	0.125	0.62	1	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
08Q240	>256	8	8	16	>64	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
08Q420	>256	4	4	8	>64	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
08Q682	>256	4	4	>64	>64	<i>qepA</i>	<i>qepA</i>
ATCC 25922	4	0.031	<0.031	0.5	1		

¹⁾NAL; nalidixic acid, CIP; ciprofloxacin, ENO; enofloxacin, NOR; norfloxacin, OFR; ofloxacin,

에 널리 분포함을 알 수 있었다(Table 3).

PMQR 모니터링이 필요할 것으로 생각되었다.

MIC

PMQR 유전자는 DNA gyrase나 topoisomerase IV의 유전자 변이보다 쉽게 quinolone에 내성을 일으키는 것으로 알려져 있다[5]. 이에 본 연구에서는 PMQR 양성균에 대한 MIC를 측정하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 즉, 08D136과 08Q233은 PMQR 유전자를 가지고 있지만 NAL을 제외한 대부분의 항생제에 감수성을 나타내었다. 이러한 결과는 PMQR 유전자를 가지고 있더라도 quinolone에 감수성을 나타낼 수 있다는 Cavaco 등의 성적과 유사하였다[3]. 또한, *aac(6')-Ib-cr* 유전자는 단독으로 존재할 때(08Q240, 08D420) 보다 *qnrS* 또는 *qepA* 유전자와 함께 존재할 때(08D291, 08D345-1) quinolone에 전반적으로 높은 MIC를 나타내었다. 이는 *qnr*과 *aac(6')-Ib-cr*가 함께 존재할 때는 *qnr* 단독으로 존재할 때보다 CIP의 MIC가 2~4배 정도 증가하였다는 기존의 보고와 유사하였다[14].

PMQR 유전자 전달

PMQR 유전자의 전달능을 알아보기 위하여 접합전달시험을 실시한 후 수용체의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시한 결과, 공여체와 동일한 PMQR 유전자를 확인할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과로 내성 유전자가 쉽게 다른 균주로 이동할 수 있다는 것을 알았다.

PMQR 유전자가 고병원성 세균으로 전달될 경우 항생제의 선택이 매우 제한되어 질병치료에 많은 어려움을 초래할 것이며, 나아가 슈퍼박테리아의 출현 가능성이 한층 높아진다. 비록 사람유래주보다 동물유래주에서 전반적으로 PMQR 분포도가 낮았으나 ENO와 같이 가족전용 fluoroquinolone 항생제는 지속적으로 사용되고 있어 이들에 의한 교차내성 출현 가능성이 높아지므로 이에 대한 제도적인 장치 마련과 지속적인

References

- Ball, P. 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 17-24.
- Bradley, D. E., D. E. Taylor, and D. R. Cohen. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **143**, 1466-1470.
- Cavaco, L. M. and F. M. Aarestrup. 2009. Evaluation of quinolone for detection of acquired quinolone resistance including the new transmissible resistance mechanisms (*qnrA, qnrB, qnrS* and *aac(6')-Ib-cr*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determination of wild type distributions. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 456-463.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement, M100-S16.
- Hooper, D. C. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infect. Dis.* **7**, 337-341.
- Hopkins, K. L., R. H. Davies, and E. J. Threlfall. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25**, 358-373.
- Kim, E. S., S. J. Park, S. O. Lee, S. H. Choi, J. H. Woo, J. Y. Jeong, and Y. S. Kim. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in cefotaxime-resistance *Enterobacter cloacae* isolates in Korea. *Korean J. Infect. Dis.* **39**, 289-296.
- Kim, H. B., C. H. Park, C. J. Kim, E. C. Kim, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 639-645.
- Lei, Y., H. X. Jiang, X. P. Liao, J. H. Liu, S. J. Li, X. Y. Chen, C. X. Chen, D. H. Lü, and Y. H. Liu. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry

- and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **132**, 414-420.
10. Ma, J., Z. Zeng, Z. Chen, X. Xu, X. Wang, Y. Deng, D. Lü, L. Huang, Y. Zhang, J. Liu, and M. Wang. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agent Chemother.* **53**, 519-524.
 11. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **351**, 797-799.
 12. Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3953-3955.
 13. Paton, J. H. and D. S. Reeves. 1988. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs.* **36**, 193-228.
 14. Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper. 2005. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**, 83-88.
 15. Robicsek, A, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 629-640.
 16. Webber, M. and L. J. V. Piddock. 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* **32**, 275-284.
 17. Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, and Y. Arakawa. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1564-1566.

초록 : 환축에서 분리된 *Escherichia coli*의 plasmid-mediated quinolone resistance genes 분포도 조사

신동호 · 김하영 · 변재원 · 김대근 · 임숙경 · 정병열*
(국립수의과학검역원)

본 연구는 동물유래 *E. coli*에서 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) 유전자의 분포도를 조사하였다. 55주의 *E. coli*를 대상으로 PCR을 수행한 결과, PMQR 양성균은 11주이었으며 그 중 2주는 두 개의 PMQR 유전자를 동시에 가지고 있었다. PMQR 유전자의 염기서열 분석 결과, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*로 확인되었고 *qnrS* (1.8%)와 *aac(6′)-Ib-cr* (7.3%) 보다는 *qepA* (14.5%)가 높은 분포도를 나타내었으며, *qnrA*와 *qnrB*는 검출되지 않았다. 11주의 PMQR 양성균의 MIC를 측정된 결과, 대부분의 PMQR 양성균이 검사한 항생제에 내성을 보였지만 일부에서 감수성 균주도 확인되었다. 또한, *aac(6′)-Ib-cr* 유전자는 단독으로 존재할 때 보다 *qnrS* 또는 *qepA*와 함께 존재할 때 내성이 더욱 증가함을 알 수 있었다. 내성유전자 전달능 실험에서 11주 모두 PMQR 유전자를 전달하였으며, PMQR 유전자를 전달받은 수용체에서 공여체와 동일한 내성 phenotype 및 PMQR 유전자를 확인할 수 있었다.