

Relationship between Moxifloxacin Resistance Pheno- and Genotype of Moxifloxacin-Resistant *Mycoplasma hominis* Obtained *in vitro*

Indal Park^{1,2*} and Myungwon Choi²

¹Department of Microbiology and ²Research Institute for Antimicrobial Resistance, Kosin University College of Medicine, Busan 602-703, Korea
Received August 6, 2010 / Accepted October 7, 2010

Moxifloxacin (MF) - resistant mutants of *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) were generated by stepwise selection in increasing concentrations of MF, and six strains of MF resistant *M. hominis* mutants - M1, M4, M8, M16, M32, and M64 - in which MICs of MF were 0.5, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g/ml}$, respectively, were generated. Compared to the sequence of *M. hominis* PG21, all mutants harbored amino acid substitutions of Arg-163 Thr in GyrA, and Pro-445 Gln in ParE. While the concentrations were getting higher, an additional amino acid substitution was found at Ser-153 Lys in GyrA ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$), Ser-91 Ile in ParC ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$), and Val-450 Phe ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$) in GyrB. These substitutions seem to have an impact on resistance to MF, and GyrB change was found only in the highest concentration and seems to be associated with high-level resistance to MF. This, as far as we know, is the first description of a relationship between MF resistance phenotype and genotype.

Key words : *Mycoplasma hominis*, moxifloxacin, resistance, QRDRs, mutations

서 론

Mycoplasma hominis (*M. hominis*)는 세포벽이 없고, 에너지 원으로 arginine을 사용하며, 유전체의 크기가 700 kbp 정도이고, DNA의 GC 비율이 낮은(30%) 균으로써 돌연변이가 잘 일어나는 균이다[7,16]. 그리고 사람의 비노생식기에서 주로 분리되며, 골반염, 산후 패혈증, 자궁내막염 등을 유발하고 신생아에서 패혈증, 중추신경계 감염을 일으키며, 면역저하 환자에서 패혈증, 관절염, 복막염 등을 일으키는 균으로 알려져 있다[3,4,12,13]. Mycoplasmas는 세포벽이 없으므로 치료제로 penicillin과 같은 세포벽합성 저해제는 사용하지 않으며, tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones 등을 주로 사용하는데 tetracycline에 대한 내성 mycoplasmas가 많이 생겼고, 특히 *M. hominis*는 macrolides인 erythromycin에 대해서 자연내성을 갖고 있기 때문에 fluoroquinolones가 mycoplasma에 의한 감염에 유용한 약제로 사용된다. Fluoroquinolones는 그람 양성균이나 chlamydia, mycoplasma 등과 같은 균에 사용되는 약제로써 gyrase와 topoisomerase IV에 작용하여 DNA 복제가 되지 못하도록 한다. DNA gyrase와 topoisomerase IV는 A, B 두 개의 소단위로 되어 있는데 각각 *gyrA*, *gyrB*와 *parC*, *parE* 유전자에 의해 만들어진다[18]. 이 유전자에 돌연변이가 생기면 quinolone 제제에 대한 내성이 생기는 것으로 알려져 있으며[5,14,17,20,21], 특히 quinolone의 내성에 관여하는 유전자 부위를 quinolone resistance-determining region

(QRDR)이라고 한다[21].

그러나 최근에 quinolones에 대한 내성균이 출현하고 있는 실정이기 때문에 본 실험에서는 표준균주인 *M. hominis* PG21에 moxifloxacin (MF)을 작용시켜 인위적으로 돌연변이를 생성 시킨 후 유전자 상에 어떠한 변화가 생기는지 관찰하여 MF의 농도와 QRDR 유전자의 돌연변이와의 관계를 알아보고자 하였다.

재료와 방법

균 배양과 인공 돌연변이 유도

표준균주인 *M. hominis* PG21을 20% 마혈청, 10% 신선 효모 추출물, 5 mM arginine, 0.001% phenol red, 페니실린 200 U/ml이 함유된 Chanock's 액체배지에 접종하여 배양하고, 배양된 균은 MF의 농도를 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 부터 단계적으로 높여가면서 인위적으로 돌연변이를 유도하였다. 생성된 돌연변이 균주는 다음 실험을 할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

항생제

실험에 사용된 항생제는 amikacin (AK, 보령제약주식회사), clarithromycin (CL, 한국에보트주식회사), gentamicin (GM, 국제약품), ciprofloxacin (CF, 일동제약주식회사), levofloxacin (LF, 국제약품공업주식회사), moxifloxacin (MF, 바이엘코리아), ofloxacin (OF, 제일제당), sparfloxacin (SF, 제일제당)이다.

Polymerase chain reaction (PCR)

-80°C 에 보관되어 있는 실험균주를 녹여서 계대배양하여

*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6423, Fax : +82-51-990-3081
E-mail : microdal@kosin.ac.kr

최종적으로 각각 3 ml를 배양 한 후 14,000 rpm에서 20분간 원심하고 균을 인산완충액(pH 7.2)으로 2번 세척하였다. 이 균들을 STE 완충용액(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA) 500 μ l에 잘 현탁 한 후 10% sodium dodecyl sulfate 25 μ l를 넣고, 65°C에서 15분 동안 가열하였다. 여기에 RNase 100 μ g을 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 phenol-chloroform으로 처리하고 에탄올로 DNA를 침전시켜 PCR 반응에 사용하였으며, 사용한 primers는 Table 1과 같다. PCR 반응은 추출한 DNA에 *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan)와 10 \times PCR buffer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphates, 1.5 mM MgCl₂를 첨가한 후 MiniCycler (MJ Research, USA)에서 94°C, 10분간 denaturation 시켰다. 그리고 94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초 동안 35회 반응시켰고, 마지막 주기에서 72°C로 10분간 더 반응시킨 후 그 산물을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액에서 염색하여 관찰하였다. 결과가 확인된 산물은 자동염기분석기인 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다.

항생제 감수성 검사

돌연변이주들에 대한 각 항생제들의 최저발육저지농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 액체 계단희석법을 사용하였으며, 각 항생제들의 최고농도는 128 μ g/ml, 최저농도는 0.06 μ g/ml 되도록 2배 계단희석법으로 희석하였다. 균 배양액은 각각 10⁴-10⁵ color changing units (CCU)/ml가 되게 접종하였으며, 18~24시간 배양한 후 관찰하여 색깔의 변화가 일어나지 않은 가장 낮은 농도를 최저발육저지농도로 하였다.

결 과

인공 돌연변이 유도

표준균주인 *M. hominis* PG21을 MF에 노출시켰을 때 최초의 돌연변이주는 0.5 μ g/ml (M1)에서 생성되었으며, 이 균을 단계적으로 항생제에 노출 시킨 결과 4, 8, 16, 32, 64 μ g/ml에

해당하는 M4, M8, M16, M32, M64 균들이 만들어졌다.

PCR과 염기서열분석

MF 농도 별로 생성 된 균들을 배양하여 DNA를 분리한 후 quinolones의 내성과 관계가 있는 QRDR부위의 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자를 PCR하였고, 그 산물의 염기 서열을 표준균주인 *M. hominis* PG21의 염기서열과 비교, 분석하였다. 그 결과 최초의 돌연변이주인 M1에서는 GyrA의 163번째 아미노산이 alanine에서 threonine으로, ParE의 445번째 아미노산이 proline에서 glutamine으로 치환되어 있었고, M4, M8에서는 GyrA의 153번 위치의 serine이 leucine으로, M16, M32에서는 ParC의 91번 위치의 serine이 isoleucine으로, M64에서는 GyrB의 450번째 valine이 phenylalanine으로 치환된 것이 추가로 관찰되었다(Table 2).

항생제 감수성 시험

표준균주인 *M. hominis* PG21과 농도별로 유도된 돌연변이 균주들을 배양하여 AK, CL, GM, CF, LF, MF, OF, SF에 대한 감수성 시험을 하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. AK에 대한 MIC는 표준균주와 돌연변이 균주 모두 4 μ g/ml였으며, CL에 대한 MIC범위는 표준균주의 경우 64 μ g/ml, 돌연변이 균주는 64-128 μ g/ml, GM에 대한 MIC는 각각 0.5 μ g/ml, 0.5-1 μ g/ml, CF는 0.5, 2-64 μ g/ml, LF는 0.5, 1-64 μ g/ml, MF는 0.25, 0.5-64 μ g/ml, OF는 0.5, 2-64 μ g/ml, SF는 0.25, 0.5-128 μ g/ml이었다.

고 찰

MF의 농도를 단계적으로 높여가며 만든 최초의 돌연변이 균주인 M1의 MF MIC는 0.5 μ g/ml이었으며, GyrA 단백질에서 Ala163Thr, ParE 단백질에서 Pro445Gln 아미노산 치환이 관찰되어 DNA gyrase와 topoisomerase IV 모두 영향을 받는 양상을 보였다. 이러한 결과는 MF가 SF (\rightarrow gyrase)나 OF (\rightarrow topoisomerase IV)와 다르게[10] DNA gyrase와 topoisomerase IV 모두 영향을 주며, Pestova 등[15]이 *Streptococcus pneumo-*

Table 1. PCR primers used for PCR

Target gene	Name	Primer sequence (5'→ 3')	Product size (bp)	GenBank accession no
<i>gyrA</i>	MgyrA-F	TATGGTATGAGTGAACCTGG	349	AF242654
	MgyrA-R	AATTAGGGAAACGTGATGGC		
<i>gyrB</i>	MgyrB-F	CTTCCTGAAAATTAGCAGAC	223	X77529
	MgyrB-R	CTGTGCCTAAGGCGTGAATCA		
<i>parC</i>	MparC-F	TATTCAATGTGAAATTTAC	310	AF036961
	MparC-R	CAGAGTCATCAAAGTTTGG		
<i>parE</i>	MparE-F	CITTCAGGAAAATTAACCTCT	297	AF036961
	MparE-R	ATCAGTGTGAGCATCTGTCAT		

Table 2. Mutations that appeared during the selection of mutants derived from *M. hominis* PG21

Strain	MIC of MF ^a (µg/ml)	Amino acid change in the QRDR of:				
		GyrA		GyrB	ParC	ParE
		153	163	450	91	445
<i>M. hominis</i> PG21	0.06	Ser	Ala	Val	Ser	Pro
M1	0.5	None	Thr	None	None	Gln
M4	4	Ala	Thr	None	None	Gln
M8	8	Ala	Thr	None	None	Gln
M16	16	Ala	Thr	None	Ile	Gln
M32	32	Ala	Thr	None	Ile	Gln
M64	64	Ala	Thr	Phe	Ile	Gln

^aMF: moxifloxacin.

Table 3. MICs of moxifloxacin induced mutants of *M. hominis* PG21

Reference strain, or induced mutant	MIC (µg/ml) of ^a :							
	AK	CL	GM	CF	LF	MF	OF	SF
<i>M. hominis</i> PG21	4	64	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25
M1	4	64	0.5	2	1	0.5	2	0.5
M4	4	128	0.5	32	32	4	32	32
M8	4	128	0.5	32	32	8	32	32
M16	4	128	0.5	64	64	16	64	64
M32	4	128	1	64	64	32	64	64
M64	4	128	1	64	64	64	64	128

^aAK, amikacin; CL, clarithromycin; GM, gentamicin; CF, ciprofloxacin; MF, moxifloxacin; OF, ofloxacin; SF, sparfloxacin.

niae에서 MF로 실험 한 결과 DNA gyrase와 topoisomerase IV 모두 영향을 준다는 결과와 같았다. 그리고 그보다 높은 농도에서 만들어진 M4, M8에서는 M1에서 관찰된 아미노산 치환뿐만 아니라 GyrA에서 Ser153Leu 치환이 추가로 관찰되었고, M16, M32에서는 Ser91Ile (ParC), M64에서는 GyrB에서 Val450Phe 아미노산 치환이 추가로 관찰되었다. 이러한 결과로 MF의 MIC가 8 µg/ml 이하인 경우에는 *gyrA*, *parE* 유전자가, 8 µg/ml 이상 32 µg/ml 이하인 경우는 *parC* 유전자가, 64 µg/ml 이상일 경우에는 *gyrB* 유전자의 돌연변이가 관여함을 알 수 있었다. Gruson 등[8]은 *M. hominis*로 MF에 대한 인위적인 돌연변이를 유도하여 MIC 8 µg/ml인 2균주의 GyrA, GyrB, ParC 또는 GyrB, ParE 단백질에서 아미노산 치환이 있었고, 32 µg/ml인 1균주에서 QRDR의 모든 단백질에서 아미노산 치환이 관찰되었다는 보고를 하였으며, Bébéar 등[1]은 환자에서 분리한 *M. hominis*의 MF MIC가 4 µg/ml인 균주에서 *gyrA*, *parC*, *parE* 유전자의 돌연변이가 있었다고 보고 하였다. *M. hominis* 이외의 균에서는 Houssaye 등[9]이 *Streptococcus pneumoniae*에서 MF를 사용해서 돌연변이를 유발하여 MIC 2 µg/ml일 때는 *gyrA* 또는 *gyrA*, *parE*에 돌연변이가 있었고, 4 µg/ml일 때는 *gyrA*, *parC*에 돌연변이가 있었다는 보고를 하였다. 그리고 Walkty 등[19]은 환자에서 분리한 *Clostridium difficile*로 QRDR 부위의 유전자를 분석한 결과 MF의 MIC가 64 µg/ml 이상인 경우에는 GyrA와 GyrA의 또 다

른 부위나 GyrB에 아미노산 치환이 있었다는 보고를 하였으며, Drudy 등[6]도 환자에게서 분리한 *Clostridium difficile* 중 MF에 대한 MIC가 32 µg/ml 이상인 경우 GyrB에 아미노산 치환이 있었다고 보고 하였다. 이상의 결과들과 본 실험을 비교해보면 균마다 돌연변이와 내성과의 관계는 다를 수 있으며, 비교적 낮은 농도에서는 *gyrA* 유전자가, 높은 농도에서는 *gyrB* 유전자의 돌연변이가 관여하고 있음을 알 수 있어 본 실험의 결과와 유사하다고 할 수 있다. 실험방법에 있어서 대부분의 연구자들은 다양한 농도에서 자란 균 또는 농도를 단계적으로 높여가며 최종 농도에서 자란 내성균을 사용하거나, 환자에서 분리한 균을 사용하여 유전자 분석을 하였지만, 본 실험에서는 한 균주를 사용하여 단계적으로 농도를 높여가며 돌연변이를 유발한 후 각 농도 별로 균을 모아 그 유전자를 분석하였으므로 유전자의 돌연변이와 MF 항생제 농도 간의 상관관계를 좀 더 확실하게 알 수 있는 실험이라 할 수 있다.

항생제 감수성 검사를 한 결과 MF 내성균에 대해서 GM이나 AK 같은 aminoglycosides계제가 효과적이었으며, macrolides 계제나, 본 실험에 사용한 CF, LF, OF, SF와 같은 fluoroquinolones 계제는 효과가 없음을 알 수 있었다. Brenclaglia 등[2]은 환자에서 분리한 *M. hominis*를 대상으로 aminoglycosides로 실험한 결과 GM이 가장 효과적이라는 보고와 본 실험의 결과는 같았으며, 비교적 최근에 개발된 제4세대 fluoroquinolone계제인 MF가 CF, LF, OF, SF보다 효과적임을 알

수 있었고, Kim 등[11]도 MRSA로 실험한 결과 MF > GF (gatifloxacin) > LF > CF > OF의 순서로 효과가 있었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유의성이 있었다.

본 실험에서는 MF의 농도가 0.5 µg/ml일 때 *gyrA/parE* 돌연변이가, 4-8 µg/ml일 때 *gyrA/parE+gyrA'*, 16-32 µg/ml 일 때 *gyrA/parE/gyrA'+parC*, 64 µg/ml일 때 *gyrA/parE/gyrA'/parC+gyrB*의 돌연변이가 관찰되어 MF의 농도와 QRDR 유전자 부위의 돌연변이가 서로 연관성이 있음이 밝혀졌으므로 본 연구의 결과는 MF의 농도와 QRDR 유전자 부위의 돌연변이의 연관성을 밝힌 최초의 논문으로 생각된다. 앞으로 환자에서 분리한 MF 내성균과의 유전자 돌연변이의 분석, 비교에 대한 연구가 추가되면 좋을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 고신대학교 의과대학 자유과제 학술연구비(2009년)에 의해 수행되었습니다.

References

- Bébéar, C. M., H. Renaudin, A. Charron, M. Clerc, S. Pereyre, and C. Bébéar. 2003. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3323-3325.
- Brenclaglia, M. I., P. Cipriani, and C. Mancini. 1975. Antimicrobial activity of aminoglycosides against clinical strains of *Mycoplasma hominis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1**, 333-336.
- Cassel, G. H. and K. B. Waites. 1989. Venereal mycoplasmal infections, In Hoepflich, P. D., and M. C. Jordan, (eds.), Infectious diseases, a modern treatise of infectious processes. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Cassel, G. H. and K. B. Waites, and D. T. Crouse. 1991. Perinatal mycoplasmal infections. *Clin. Perinatol.* **18**, 241-262
- Cullen, M. E., A. W. Wyke, R. Kuroda, L. M. Fisher. 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 886-894.
- Drudy, D., T. Quinn, R. O'Mahony, L. Kyne, P. Ó'Gaora, and S. Fanning. 2006. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1264-1267.
- Dybvig, K. and L. L. Voelker. 1996. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 25-57.
- Gruson, D., S. Pereyre, H. Renaudin, A. Charron, C. Bébéar, and C. M. Bébéar. 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1190-1193.
- Houssaye, S., L. Gutmann, and E. Varon. 2002. Topoisomerase mutations associated with in vitro selection of resistance to moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2712-2715.
- Kenny, G. E., P. A. Young, F. D. Cartwright, K. E. Sjöström, and W. M. Huang. 1999. Sparfloxacin selects gyrase mutations in first-step *Mycoplasma hominis* mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2493-2496.
- Kim, E. C., P. Charukamnoetkanok, A. M. Poothullil, B. Paton, and R. I. Pineda. 2005. Second, third, and fourth generation fluoroquinolone susceptibilities of methicillin resistant staph aureus (MRSA) cultures collected at the Massachusetts Eye and Ear Infirmary. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, E-Abstract 2770.
- Madoff, S. and D. C. Hooper. 1988. Nongenitourinary infections caused by *Mycoplasma hominis* in adults. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 602-613.
- McMahon, D. K., J. S. Dummer, A. W. Pasculle, and G. H. Cassel. 1990. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults. *Am. J. Med.* **89**, 275-281.
- Pan, X. S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher. 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2321-2326.
- Pestova, E., J. J. Millichap, G. A. Noskin, and L. R. Peterson. 2000. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 583-590.
- Pollack, J. D. 1992. Carbohydrate metabolism and energy conservation, In Maniloff, J., R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (eds.), *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. pp. 181-200, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Raherison, S., P. Gonzalez, H. Renaudin, A. Charron, C. Bébéar, and C. M. Bébéar. 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 672-679.
- Reece, R. and A. Maxwell. 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 335-375.
- Walkty, A., D. A. Boyd, D. Gravel, J. Hutchinson, A. McGeer, D. Moore, A. Simor, K. Suh, G. Taylor, M. Miller, and M. R. Mulvey. 2010. Molecular characterization of moxifloxacin resistance from Canadian *Clostridium difficile* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 419-424.
- Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1647-1650.
- Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1271-1272.

초록 : 인위적으로 유도된 목시플로사신 내성 *Mycoplasma hominis*의 표현형과 유전자형의 연관성

박인달^{1,2*} · 최명원²

(¹고신대학교 의과대학 미생물학교실, ²항생제 내성연구소)

본 연구에서는 QRDRs의 유전자 돌연변이와 목시플로사신의 농도와 관계를 알아보기 위하여 목시플로사신의 농도를 단계적으로 높여가며 *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*)에 작용시켜 목시플로사신에 내성을 갖는 균주 6주(M1, M4, M8, M16, M32, M64)를 만들었고, 이 돌연변이주들의 MIC는 각각 0.5, 4, 8, 16, 32, 64 µg/ml이었다. 이 균들의 염기서열을 분석하였더니 모든 돌연변이주들에서 Arg163Thr (GyrA), Pro445Gln (ParE) 아미노산 치환이 관찰 되었고, 목시플로사신의 농도가 높아질수록 Ser153Lys (GyrA, ≥4 µg/ml), Ser91Ile (ParC, ≥16 µg/ml), Val450Phe (GyrB, ≥64 µg/ml) 등과 같은 아미노산의 치환이 추가로 관찰되었다. 이러한 아미노산의 치환이 목시플로사신의 내성과 연관이 있는 것으로 생각되며, 특히 GyrB 단백질의 아미노산 치환은 목시플로사신의 고도 내성과 연관이 있는 것으로 생각된다.