

Incidence of Tetracycline Resistance Genes, *tet(M)* and *tet(O)*, in Streptococci Isolated from Dental Plaques of Koreans

Yeon-Hee Kim and Si Young Lee*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received January 09, 2014; revised January 28, 2014; accepted January 30, 2014)

Streptococci are among the normal human microflora that populate the oral cavity. However, oral streptococci are known as a major causative agent for dental caries and bacterial endocarditis. Tetracycline is a broad-spectrum antibiotic that is used for oral infections but two mechanisms of tetracycline resistance in streptococci have been reported. The *tet(K)* and *tet(L)* genes in these bacteria are related to the active efflux of tetracycline, whereas *tet(M)* and *tet(O)* confer ribosomal protection from this antibiotic. It has been reported that the tetracycline resistance of streptococci is related mainly to the activity of *tet(M)* and *tet(O)*. In our present study, we examined the prevalence of *tet(M)* and *tet(O)* in oral streptococci isolated from Korean dental plaques using PCR. One hundred and forty eight of 635 isolates (23.3%) were tetracycline resistant; 68 of these strains (46%) harbored *tet(M)* and 3 strains (2%) were positive for *tet(O)*. However, *tet(M)* and *tet(O)* did not co-exist in any of the resistant strains. Seventy seven of the 148 tetracycline resistant strains (52%) were negative for both the *tet(M)* and *tet(O)* genes.

Key words: tetracycline, resistance, streptococci

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.
Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410,
E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

연쇄구균은 인간의 구강에 상주하는 미생물총을 구성하는 세균 종류 중 한가지로 치아우식증과 세균성 심내막염의 주된 원인세균이며[1,2] 그밖에 호중구 감소증 환자에서 균혈증과 폐혈증을 일으키는 원인이기도 하다[3]. 테트라사이클린은 1940년대 처음으로 발견되었고, 광범위 스펙트럼 항생제로 1953년에 내성을 보이는 세균이 처음으로 발견되었다[4-6]. 일반적인 작용기전은 미생물 리보솜의 30S 소단위에 부착하여 aminoacyl-tRNA가 부착되는 것을 방해함으로써 단백질 합성을 억제하는 것이다.

연쇄구균에서 테트라사이클린 내성기전은 *tet(K)*와 *tet(L)*에 의한 능동수송(active efflux)으로 테트라사이클린이 세포내로 유입되는 것을 억제하는 기전과 *tet(M)*과 *tet(O)*가 형성되는 리보솜을 보호하는 단백질(ribosome protection proteins)에 의해 테트라사이클린이 리보솜에 결합하는 것을 억제하는 기전에 의해 나타난다고 보고되었다[7,8]. *tet(M)*은 많은 종류의 다른 구강 세균에서 발견되고 있으며[9], *tet(O)*는 그람 양성 세균에서 처음 발견되었고 그람 음성 세균으로 퍼지고 있는 양상을 보이고 있다[10]. 테트라사이클린에 대한 내성을 가지는데 필요한 세균의 내성 유전자는 많은 종류가 발견되었지만, *tet(M)*과 *tet(O)* 내성 유전자는 이미 여러 세균에서 광범위하게 발견되고 있다[11-13]. 연쇄구균의 테트라사이클린 내성은 일반적으로 30S 리보솜 소단위에서 테트라사이클린 내성을 부여하는 리보솜 보호 내성 유전자

인 *tet(M)* 또는 *tet(O)*에 의해 발현된다[10,14].

tet(M) 유전자의 대부분은 Tn916 및 Tn5253과 같은 트랜스포존에 위치하며, 이는 *tet(M)* 유전자가 여러 종류의 세균에 널리 분포하는 이유이기도 하다[4]. 진화 과정에서 *tet(M)* 유전자 간의 재조합으로 부분적 염기 변이가 나타나게 되고, 이로 인하여 테트라사이클린 내성은 다양한 양상을 보이게 된다[11,15].

본 연구 이전에 테트라사이클린 내성과 관련된 유전자에 대한 연구가 많이 진행되어왔으나[14-16], 테트라사이클린에 내성을 유발하는 유전자는 대부분 트랜스포존에 위치하여 변이가 많고 세균간의 전달이 쉬워서 분포의 변화가 많은 것으로 알려져 있다[17,18]. 이러한 이유로 테트라사이클린 내성 유전자의 종류 및 분포는 각 나라별로 차이가 있는 것으로 보고되고 있다[9,13,18].

본 연구에서는 한국인의 치태에서 분리한 구강연쇄구균을 대상으로 테트라사이클린 내성 관련 유전자 중에서 연쇄구균의 내성에 주로 관여하는 것으로 알려져 있는 *tet(M)*과 *tet(O)*의 분포를 조사하였다.

재료 및 방법

세균의 동정 및 배양 조건

본 연구에는 최근 2달 동안 항생제를 복용하지 않은 194명의 건강한 사람으로부터 제공받은 치태에서 분리한 구강연쇄구균을 사용하였다. 구강연쇄구균의 분리를 위하여 지원자로부터 치태를 제공 받았으며, 지원자는 이 연구의 목적과 과정에 대한 설명을 듣고 연구에 참여한다는 동의서를 제출하였다. 이 연구는 강릉원주대학교 치과병원의 임상시험심사위원회의 승인을 받았다(IRB2011-2). 채취한 치태 샘플은 멸균중류수에 현탁한 후 멸균된 면봉을 이용하여 Mitis Salivarius Agar (MSA) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 도말하고 37°C CO₂배양기에서 72시간 배양하였다. 각 지원자의 구강에서 채취한 치태 샘플을 도말한 MSA 배지에서 세균 집락 모양이 서로 다른 3-4개의 집락을 무작위로 분리하여 각 콜로니를 Brain Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 접종하여 37°C CO₂배양기

에서 24시간 액체배양 하였다. 무작위로 분리한 세균은 Rapid ID-32 strep system과 Mini API reader (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 9개의 특정 균종(*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*)으로 동정되었다.

항생제 감수성 검사

635개 균주에 대한 테트라사이클린(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 감수성을 조사하기 위해 액체배지 희석법으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다[19]. 감수성 여부의 농도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 권고하는 연쇄구균의 표준 해석 방법에 의해 결정되었다. 테트라사이클린을 5,120 µg/ml의 농도로 만들고 필터(0.22 µm)를 사용하여 멸균하였다. 2.5% laked horse blood (Oxoid limited, Basingstoke, England)를 첨가한 Mueller Hinton II Broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 1,024 µg/ml의 농도가 되도록 희석하였다. 96-well plate (SPL, Seoul, South Korea)에 Mueller Hinton II Broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 이용하여 농도가 0.0002 µg/ml이 될 때까지 2배씩 단계 희석하였다. 세균은 혈액한천배지(Komed, Seongnam, South Korea)에 도말하여 37°C CO₂배양기에서 24시간 배양하고, 생리식염수를 이용하여 0.5 McFaland (1 x 10⁸ CFU/ml)로 현탁하고 각 well에 최종 세균 농도가 5 x 10⁵ CFU/ml이 되도록 접종하였다. 96-well plate를 37°C 일반배양기에서 24시간 배양하고 MIC를 측정하여 항생제에 대한 감수성을 평가하였다.

Genomic DNA 추출 및 PCR 분석

테트라사이클린에 내성을 보이는 균주를 대상으로 DNA를 추출하였다. DNA 추출을 위해 Accuprep[®] Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 사용하였으며 DNA는 -70°C에 보관하였다. Bioneer HotStart Taq polymerase (Bioneer, Daejeon, South Korea)와 특정 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. 사용한 primer의 염기서열과 PCR 조건들은 표 1에 나열되어 있다.

Table 1. Primers and PCR conditions for amplification of *tet(M)* and *tet(O)*

Gene	Primer sequence (5'-3')	PCR condition	Reference
<i>tet(M)</i>	AGT TTTAGC TCA TGT TGA TG TCC GAC TAT TTG GAC GAC GG	95°C 5min, 35 cycle (95°C 1min, 50°C 1min, 72°C 30sec), 72°C 5min	[11]
<i>tet(O)</i>	GCG TTT TGT TTA TGT GCG ATG GAC AAC CCG ACA GAA G	95°C 2min, 35 cycle (95°C 2min, 52°C 30sec, 72°C 1min), 72°C 2min	[24]

PCR product를 1.5% agarose gel에 전기 영동하였고 ethidium bromide로 염색 후 ultraviolet (UV) transilluminator (COREBIO, Seoul, South Korea)로 관찰하였다. *tet(M)* DNA 크기는 1862bp 이고 *tet(O)*는 559bp이다. PCR에 의해 발견된 유전자가 *tet(M)*과 *tet(O)*가 맞는지 확인하기 위해 각각 증폭된 DNA 한 개씩을 *AccuPrep*® PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 정제하고 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 얻었다. 염기서열은 Blastn (genome database of the National Center for Biotechnology Information)를 이용하여 분석하였다.

결 과

건강한 성인의 치태로부터 얻은 구강연쇄구균에 대하여 액체희석법을 이용한 항생제 감수성 검사 결과 635 개의 분리균주 중에서 148개(23.3%) 균주가 테트라사이클린에 내성을 나타냈다. 148개 테트라사이클린 내성 구강연쇄구균을 대상으로 *tet(M)*과 *tet(O)*내성 유전자의 분포를 조사하였다. 테트라사이클린 내성 유전자 *tet(M)*과 *tet(O)* primer를 이용하여 얻은 각각의 DNA를 1.5% agarose gel에 전기영동 시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

*tet(M)*은 148개 내성 균주 중 68균주(45.9%), *tet(O)*는 3균주(2.0%)에서 발견되었다(Table 2). 분리된 균주 중에서 테트라사이클린에 내성을 보이는 균주는 *S. oralis*(42 균주)와 *S. mitis*(37균주)가 가장 많이 나타났으며, *tet(M)* 유전자는 *S. oralis*에서 22균주(52.4%), *S. mitis*에서는 17균주(45.9%)에서 발견되었다. 전체 내성 균주 중 *tet(O)*는 *S. anginosus* 2균주, *S. constellatus* 1균주로 확인되었다(Table 2). *S. salivarius* 7균주 중 4균주(57.1%)에서 *tet(M)*이 발견되었으며 *S. sanguinis* 20균주 중에서는 12

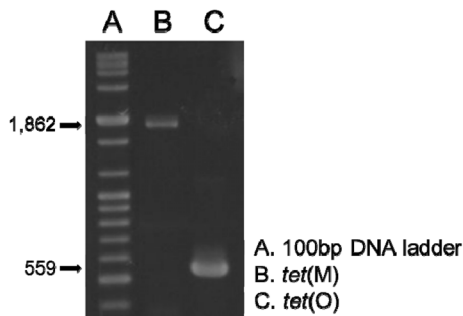


Fig. 1. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* with specific primers in tetracycline resistant oral streptococci *S. sanguinis* KN16 and *S. anginosus* KN11, respectively. PCR products were stained with ethidium bromide and visualized by ultraviolet (UV) transillumination.

Table 2. Incidence of *tet(M)* and *tet(O)* in tetracycline resistant oral streptococci

Species	No. of isolates	Number of isolates with tetracycline resistance gene			
		<i>tet(M) + tet(O) +</i>	<i>tet(M) + tet(O) -</i>	<i>tet(M) - tet(O) +</i>	<i>tet(M) - tet(O) -</i>
Mitis group					
<i>S. mitis</i>	37	0	17	0	20
<i>S. oralis</i>	42	0	22	0	20
Sanguinis group					
<i>S. sanguinis</i>	20	0	12	0	8
<i>S. gordonii</i>	10	0	3	0	7
Anginosus group					
<i>S. anginosus</i>	25	0	8	2	15
<i>S. constellatus</i>	2	0	0	1	1
<i>S. intermedius</i>	2	0	0	0	2
Salivarius group					
<i>S. salivarius</i>	7	0	4	0	3
Mutans group					
<i>S. mutans</i>	3	0	2	0	1
Total	148	0 (0%)	68 (45.9%)	3 (2.0%)	77 (52.0%)

균주(60.0%)에서 *tet(M)*이 발견 되었다. *tet(M)*과 *tet(O)*를 동시에 가지는 균주는 없었다. 테트라사이클린에 내성을 보이는 균주 중에서 77개(52%)가 *tet(M)*과 *tet(O)* 유전자를 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

각각의 primer에 의해 증폭된 유전자의 염기서열은 Blastn 탐색 결과 *tet(M)*과 *tet(O)*로 확인되었다.

고 찰

테트라사이클린에 내성을 가지는 유전자의 분포가 지역마다 차이를 보인다는 사실은 이전 몇몇 연구에서 밝혀졌다[15,16,20]. Stapleton 등의 연구에서 런던의 22개 구강연쇄구균 균주에 대한 조사 결과 14균주(63.6%)에서

*tet(M)*이 발견되었다[15]. 스페인의 구강연쇄구균에서 테트라사이클린에 대한 내성은 35%를 나타내었으며, 36개 테트라사이클린 내성 균주 중에 28균주(77.8%)에서 *tet(M)*이 발견되었고, 2균주(5.6%)에서 *tet(O)*가 발견되었다[16]. 벨기에에서 분리된 157개 구강연쇄구균 중에서 테트라사이클린에 내성을 보이는 균주는 114개로 나타났으며, 이 중에 105개(92.1%)의 균주에서 *tet(M)*이 나타났고 2개(1.8%)의 균주에서 *tet(O)*가 발견되었으며, 하나의 균주에서 두 개의 유전자가 함께 발견되었다[20].

한국인에서 분리된 구강연쇄구균을 대상으로 한 본 연구에서는 635개 균주 중 148개의 테트라사이클린 내성 균주에서 *tet(M)*은 68개(45.9%)의 균주에서 발견되었는데, 이는 런던의 63.6%나 스페인의 77.8% 그리고 벨기에의 92.1%보다 낮은 빈도였다. *tet(O)* 유전자는 본 연구에서 2.0%가 발견되었고 스페인과 벨기에에서 각각 5.6%, 1.8%가 발견된 것과 같이 낮은 빈도를 나타냈다.

본 실험에 사용한 9개의 종(species)에 해당하는 구강연쇄구균 중 *S. constellatus*와 *S. intermedius*를 제외한 모든 균주에서 *tet(M)*을 확인할 수 있었다. 조사한 균주 중에서 *S. oralis* 42개와 *S. mitis* 37개가 테트라사이클린에 내성을 보였으며, *tet(M)*의 관찰 비율이 각각의 세균에서 52.4%와 45.9%로 나타났다. *S. anginosus*와 *S. sanguinis*에서 *tet(M)*의 발견 비율은 각각 32%와 60%로 나타났다.

테트라사이클린에 내성을 보이는 균주 중에서 *tet(M)* 혹은 *tet(O)*를 지니지 않는 77개 균주에 대한 내성기전은 아직 불확실하다. *tet(M)*과 *tet(O)* 이외의 테트라사이클린 내성 유전자가 이들 77개의 균주에 존재할 가능성이 있으나 이들 세균종의 테트라사이클린에 대한 내성기전은 추가 연구를 통하여 밝혀져야 할 것이다.

한국의 전반적인 항생제 내성율은 증가하고 있지만 [21-23], 본 연구 결과 테트라사이클린에 대한 한국에서 분리된 구강연쇄구균의 내성율은 23.3%로 스페인의 35%나 [16], 벨기에의 72.6% [20]보다 낮은 것을 확인하였다. 이러한 차이점이 생기는 원인은 본 실험에서는 치태에서 분리한 세균을 대상으로 하였고, 스페인에서는 혈액배양 세균을 대상으로 하였으며, 벨기에에서는 구강 인두에서 채취한 세균을 대상으로 한 것도 이유 중의 하나일 것으로 생각된다.

종합적으로, 한국인 치태에서 분리된 구강연쇄구균의 테트라사이클린에 대한 내성 빈도와 *tet(M)*의 발견비율은 영국, 스페인, 벨기에 등 다른 나라보다 낮았고, *tet(O)*의 발견 비율은 유사하게 관찰되었다.

본 연구를 통하여 얻은 항생제 내성 유전자에 대한 실험 결과는 세균의 항생제 내성 기작에 대한 이해를 높여 새로운 항생제의 개발에 도움을 줄 수 있을 것이며, 세균

종간 항생제 내성의 확산 경로를 파악하는데 유용한 정보를 제공할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (2010-0025532)

References

1. Bochud PY, Calandra T, Francioli P. Bacteremia due to viridans streptococci in neutropenic patients: A review. *Am J Med.* 1994;97:256-264.
2. Roberts RB, Krieger AG, Schiller NL, Gross KC. Viridans streptococcal endocarditis: The role of various species, including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev Infect Dis.* 1979;1:955-966.
3. Rolston KV, Elting LS, Bodey GP. Bacteremia due to viridans streptococci in neutropenic patients. *Am J Med.* 1995;99:450.
4. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65:232,60 ; second page, table of contents.
5. Roberts MC. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends Microbiol.* 1994;2:353-357.
6. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996; 19:1-24.
7. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1992;29:245-277.
8. Roberts MC, Hillier SL. Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:261-264.
9. Lacroix JM, Walker CB. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant *tet(M)* in the microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995;66:102-108.
10. Olsvik B, Olsen I, Tenover FC. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1995;10:87-92.
11. Doherty N, Trzcinski K, Pickerill P, Zawadzki P, Dowson CG. Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:2979-2984.
12. Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of *tet(M)* genes in lactobacillus isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl*

- Environ Microbiol. 2003;69:1270-1275.
13. Jeric PE, Lopardo H, Vidal P, Arduino S, Fernandez A, Orman BE, Sordelli DO, Centron D. Multicenter study on spreading of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant streptococcus group G and C isolates in argentina. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:239-241.
 14. Villedieu A, Diaz-Torres ML, Hunt N, McNab R, Spratt DA, Wilson M, Mullany P. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:878-882.
 15. Stapleton P, Adams V, Pike R, Lucas V, Roberts G, Mullany P, Rowbury R, Wilson M, Richards H. Characterisation of viridans group streptococci with different levels of *tet(M)*-mediated tetracycline resistance. Int J Antimicrob Agents. 2004;24:439-443.
 16. Rodriguez-Avial I, Rodriguez-Avial C, Culebras E, Picazo JJ. Distribution of tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* and *tet(K)* in blood isolates of viridans group streptococci harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes. susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid. Int J Antimicrob Agents. 2003;21:536-541.
 17. Olsvik B, Tenover FC, Olsen I, Rasheed JK. Three subtypes of the *tet(M)* gene identified in bacterial isolates from periodontal pockets. Oral Microbiol Immunol. 1996;11:299-303.
 18. Luna VA, Roberts MC. The presence of the *tetO* gene in a variety of tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington State. J Antimicrob Chemother. 1998;42:613-619.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M07-A8, vol.29, no.2, 8th ed., CLSI. Wayne, PA, 2009.
 20. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Martel A, Mallettjer C, Chapelle S, Verhoeven J, Wijdooghe M, Haesebrouck F, Goossens H. Oropharyngeal carriage of macrolide-resistant viridans group streptococci: A prevalence study among healthy adults in Belgium. J Antimicrob Chemother. 2004;53:271-276.
 21. Chong Y, Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. J Infect Chemother. 2000;6:189-195.
 22. Song Y, Lee HK, Ji E, Oh JM. Patterns of antibiotic usage in clinics and pharmacy after separation of dispensary from medical practice. Kor J Clin Pharm. 2011;21:332-338.
 23. Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ, Song W. Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20:52-54.
 24. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect Immun. 2000;68:4384-4390.