

Analysis of Quinolone Resistance Determinants in *Escherichia coli* Isolated from Clinical Specimens and Livestock Feces

Ji Youn Sung

Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong, Korea

임상검체와 가축으로부터 분리된 대장균을 대상으로 Quinolone계 항균제 내성인자 분석

성지연

극동대학교 임상병리학과

The inappropriate and widespread use of quinolones in humans and animals may cause accelerated emergence and spread of antimicrobial-resistant determinants. In this study, we investigated quinolone resistance mechanisms in a total of 65 nalidixic acid-resistant *E. coli* isolated from swine rectal swabs (N=40) and clinical specimens (N=25). Antimicrobial susceptibilities were determined by the disk diffusion method. PCR and DNA sequencing were performed for investigations of genes and mutations associated with quinolone resistance. In our study, 62 of 65 nalidixic acid-resistant *E. coli* harbored mutations in *gyrA*, *parC*, and/or *parE* genes: of the 65 isolates, 62 (95.4%) had mutations in the *gyrA* gene, 35 (53.8%) had mutations in the *parC* gene, 7 (10.8%) had mutations in the *parE* gene. The 35 isolates harbored mutations in two genes, *gyrA* and *parC*. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants were investigated in the 65 isolates. Thirteen of 65 nalidixic acid-resistant *E. coli* contained the *qnrS* gene and 10 of those isolates had mutations in the *gyrA*, *parC*, and/or *parE* genes. We confirmed that an important mechanism of quinolone resistance in *E. coli* isolated from human and swine involves chromosomal mutations in the *gyrA*, *parC*, and/or *parE* genes with increasing use of quinolone for treatment or additives.

Key words: *E. coli*, *gyrA*, *parC*, Plasmid-mediated quinolone resistance

Corresponding author: Ji Youn Sung
Department of Biomedical Laboratory Science,
Far East University, 76-32 Daehak-gil,
Gangok-myeon, Eumseong 27601, Korea
Tel: 82-43-879-3668
Fax: 82-43-880-3876
E-mail: azaza72@naver.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2018 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: September 28, 2018
Revised 1st: October 18, 2018
Revised 2nd: October 24, 2018
Accepted: October 24, 2018

서론

Quinolone계열의 항균제는 의료관련 또는 다양한 지역사회 감염병을 일으키는 세균에 대해 효과적인 광범위항균제로 오랫동안 사용되어 왔으며 동물의 질병치료 및 예방목적으로 축산 분야에서도 널리 사용되고 있는 항균제 중 하나다[1, 2]. 그러나

최근 이 항균제에 내성을 나타내는 장내세균들이 급격하게 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다. 내성을 획득한 장내세균들은 직접적인 접촉이나 직업적 노출(도축업자) 또는 축산물을 통해 사람에게 감염될 수 있으며, 이때 내성유전자를 사람의 장내 세균으로 전이시키기도 한다. 내성 세균의 출현 및 확산은 항균제 사용량과 밀접한 관련이 있는데 국내의 경우 과도한 항균제

처방으로 인해 항균제의 사용량이 지속적으로 증가되어왔다[3, 4]. 항균제 사용량 증가에 따른 내성 세균의 증가 및 확산은 감염병 환자를 항균제 선택 압력에 놓이게 하기도 하고 치료의 실패를 야기하기도 한다[5].

Quinolone계열 항균제는 세균의 DNA 복제에 꼭 필요한 type II topoisomerase 효소인 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV의 기능을 억제함으로써 항균작용을 한다. 이 두 효소는 각각 두 종류의 소단위(subunit)로 구성되는데 DNA gyrase는 GyrA 및 GyrB로 그리고 DNA topoisomerase IV는 ParC 및 ParE로 이루어져있으며 GyrA는 ParC와 유사한 구조를, 그리고 GyrB는 ParE와 유사한 구조를 갖는다. Quinolone 계열 항균제는 DNA topoisomerase IV보다는 DNA gyrase와 결합했을 때 DNA 복제를 더 빠르게 억제하는 특징이 있다. 일반적으로 임상에서 사용하는 quinolone계열 항균제는 그람음성 세균의 경우에는 DNA gyrase에 더 효과적이며 그람양성세균의 경우에는 DNA topoisomerase IV에 더 효과적이라고 보고되고 있다[6]. 한편 DNA gyrases (*gyrA* 및 *gyrB*)와 topoisomerase IV (*parC* 및 *parE*) 효소를 암호화하는 유전자는 quinolone resistance determining regions (QRDRs)라고 불리는 영역을 포함하는데 QRDRs에 존재하는 염기들에 돌연변이가 생겨 아미노산이 치환될 경우 세균들은 세균은 quinolone계열 항균제에 내성을 나타내게 된다. 특히 두 효소에 치환된 아미노산의 수가 많을수록 quinolone계열의 항균제에 고도내성을 보인다고 한다[6].

장내세균과에 속하는 세균들은 세포의 염색체 DNA 돌연변이에 의해 quinolone계열의 항균제에 내성을 나타내기도 하지만 quinolone 내성유전자를 포함하고 있는 plasmid를 획득함으로써 내성을 나타내기도 한다[6-9]. Plasmid를 통한 quinolone 내성유전자의 획득은 장내세균에서 지속적으로 보고되어 왔는데 이러한 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants는 같은 균종 뿐만 아니라 다른 균종에도 수평 확산될 수 있어 더욱 큰 문제가 되고 있다. 대표적인 PMQR determinants로는 Qnr, AAC(6')-Ib-cr, QepA, OqxAB 등이 있다. Onr은 type II topoisomerase 효소에 quinolone 항균제가 결합하는 것을 방해하여 항균제의 항균 능력을 저하시킨다[7]. AAC(6')-Ib-cr은 변형된 aminoglycoside acetyltransferase로 항균제의 piperazinyl amine을 acetylation 시켜서 ciprofloxacin 및 norfloxacin의 항균력을 감소시킨다[8]. QepA와 OqxAB는 quinolone 유출펌프단백으로 quinolone 항균제를 세균세포 바깥으로 유출시켜 항균력을 감소시킨다[6, 9].

최근까지 quinolone 계열 항균제에 대한 내성인자 분석은

많이 보고되어 왔으나 주로 사람에서 분리된 세균을 대상으로 이루어진 연구였으며 가축으로부터 분리된 세균을 대상으로는 한 연구는 드문 편이다. 다양한 경로로 항균제 내성 세균이 증가하고 있고 가축과 사람에게 사용되는 항균제 량이 증가하면서 가축유래 항균제 내성 세균이 가축으로부터 직접 또는 축산물 유통과정에서 사람에게 전달될 수 있어 문제가 될 수 있음에도 사람과 가축으로부터 분리된 세균을 대상으로 내성인자분석을 비교·분석한 연구는 매우 드물다. 본 연구에서는 사람과 가축으로부터 대장균을 분리하여 quinolone 계열 항균제에 대한 내성인자분석을 비교·분석하고자 하였다. 대장균은 장내세균과에 속하는 세균으로 가장 빈번하게 사람이나 동물의 위장관 검체로부터 분리되는데 의료관련 감염, 뿐만 아니라 지역사회 감염의 주된 원인균으로 알려져 있다. 특히 종합병원에 의뢰된 임상 검체로부터 분리된 대장균이라 하더라도 입원하기 48시간전에 지역사회에서 획득한 경우가 다수 있어 지역사회 감염 빈도가 매우 높을 것으로 여겨지고 있다[10]. 따라서 사람과 가축의 항균제 내성 양상을 모니터링하기에 가장 적합한 세균 중 하나라 판단된 대장균을 대상으로 QRDRs의 염색체 돌연변이와 PMQR determinants를 분석하였다. 본 연구는 사람과 가축에 모두 중요한 항균제인 quinolones 계열 항균제에 내성을 갖는 세균의 확산을 방지하기 위한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집 및 균종 동정

본 연구를 위한 대장균은 2017년 5월부터 2017년 9월까지 충청지역에 위치한 양돈농가에서 사육된 돼지(N=113)와 동일 지역에 위치한 일개의 대학병원에 의뢰된 임상검체로부터(N=54) 분리되었다. 돼지로부터 대장균을 분리하기 위해 멸균된 면봉을 돼지의 직장에 삽입한 후 면봉을 돌려가며 직장내의 면을 채취한 후 Stuart 수송배지(Oxoid, Basingstoke, UK)에 면봉을 넣어 검사실로 운반하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며 임상검체로부터 분리된 균주의 경우 동일대상에서 반복하여 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 각각의 검체로부터 분리배양된 균주를 Vitek 2[®] automated instrument ID system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 생화학적 방법으로 동정하였다.

2. 항균제 감수성 시험

분리된 대장균을 대상으로 Mueller-Hinton 한천배지(Difco, Cockeysville, MD, USA)를 사용하여 amikacin, ampicillin,

cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin, levofloxacin, nalidixic acid, streptomycin, trimethoprim 및 tobramycin (Oxoid)에 대한 감수성을 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 디스크 확산법으로 확인하였다 [11]. 정도관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위내에 있는지 확인하였다.

3. Quinolone 내성인자 검출

항균제 감수성 검사에서 nalidixic acid에 내성을 나타낸 대장균을 대상으로 quinolone 내성인자를 조사하였다. QRDRs에 위치한 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 돌연변이를 확인하고 PMQR determinants인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr*, *oqxA* 및 *qepA* 유전자를 검출하기 위해 기존의 primer (Table 1)를 사용하여 증합효소연쇄반응을 수행하였다[7, 8, 12-14]. 먼저 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 DNA purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 주형으로 사용할 DNA를 추출하였다. AccuPower PCR PreMix (Bioneer)에 DNA 추출액 (3 µL), primer 각 10 pmol 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. GenePro Thermal Cycler B48D (Hangzhou Bioer Technology Corp. Ltd, China)에서 95°C

에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 증폭산물을 PCR purification kit (Bioneer)을 이용하여 분리 한 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 결정된 각각의 염기서열을 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 각각의 참조 대장균 유전자와 비교 분석하였다.

결 과

1. Nalidixic acid 내성 대장균의 분리

수집기간동안 대장균 총 113균주가 돼지의 직장면봉검체 (Swine rectal swabs, SRSs)로부터 분리되었으며 이 중 nalidixic acid에 내성을 보인 균주는 40균주로 약 35.7%의 내성율을 보였다. 같은 기간 동안 임상검체(Clinical specimens, CSs)로부터는 총 54균주의 대장균이 분리되었는데 이중 25균주가 nalidixic acid에 내성을 보여 46.3%의 내성율을 나타냈다.

2. 항균제 내성 양상

수집기간동안 SRSs와 CSs로부터 총 65균주의 nalidixic

Table 1. Oligonucleotides used in present study for detection of quinolone resistance determinants

Primer	Sequence (5'-3')	Gene	References
QRDRs PCR detection			
<i>gyrA</i> -F	TCTGGATTATGCGATGTCGGTCAT	<i>gyrA</i>	[12]
<i>gyrA</i> -R	TCAGCCCTTCAATGCTGATGCTCT		
<i>gyrB</i> -F	GCTGAGCGAATACCTGCTGG	<i>gyrB</i>	[12]
<i>gyrB</i> -R	TCGGTCATGATGATGATGCTGTGAT		
<i>parC</i> -F	ACTACTCCATGTACGTCATCATGGAC	<i>parC</i>	[12]
<i>parC</i> -R	CGCCACTTCGCGCAGGTTAT		
<i>parE</i> -F	GCGGAAGATATCTGGGATCGCT	<i>parE</i>	[12]
<i>parE</i> -R	CTGGCTCAGATCGTCGCTGT		
PMQR gene detection			
<i>qnrA</i> -F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	[7]
<i>qnrA</i> -R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i> -F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	[7]
<i>qnrB</i> -R	TTTGCYGYCCGACGTCGAA		
<i>qnrS</i> -F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	[7]
<i>qnrS</i> -R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>aac(6)-Ib</i> -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	[8]
<i>aac(6)-Ib</i> -R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>qepA</i> -F	CCAGCTCGGCAACTTGATAC	<i>qepA</i>	[13]
<i>qepA</i> -R	ATGCTCGCCTCCAGAAAA		
<i>oqxA</i> -F	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>	[14]
<i>oqxA</i> -R	CCACTCTTCACGGGAGACGA		

Abbreviations: F, forward (sense) primer; R, reverse (antisense) primer; M, A/C; H, A/T/C; Y, C/T.

acid 내성 대장균이 분리되었는데 SRSs로부터 분리된 균주가 40균주, 그리고 CSs로부터 분리된 균주가 25균주였다. 이 균주들을 대상으로 항균제 감수성 시험을 한 결과 CSs로부터 분리된 균주들이 SRSs로부터 분리된 균주들에 비해 시험항균제들에 대해 모두 높은 내성률을 보였다(Table 2). 특히 cefotaxime의 경우에는 SRSs로부터 분리된 균주들은 모두 감수성을 보인 반면 CSs로부터 분리된 균주들은 모두 내성을 나타냈다. 한편 SRSs로부터 분리된 균주들의 경우 nalidixic acid (100%), streptomycin (70.0%) 및 ampicillin (62.5%)를 제외한 시험항

균제들에 대해서는 50% 미만의 내성률을 나타냈다.

3. Quinolone 내성인자 검출 및 분석

1) QRDRs에 위치한 유전자의 돌연변이 확인

돼지와 사람으로부터 분리된 nalidixic acid 내성 대장균을 대상으로 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자 돌연변이가 있는지를 조사한 결과 *gyrA*, *parC* 및 *parE* 유전자에서 다양한 점 돌연변이가 확인되었다(Figure 1). 본 연구에서 확인된 *gyrA* 유전자 돌연변이는 염기의 치환에 의해 83번째 아미노산(serine, S)이

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* strains isolated from swine rectal swabs and clinical specimens

Antimicrobial agent	No. (%) of SRSs			No. (%) of CSs		
	S	I	R	S	I	R
Amikacin	40 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (20.0)	19 (76.0)	1 (4.0)
Gentamicin	24 (60.0)	0 (0.0)	16 (40.0)	13 (52.0)	1 (40.0)	11 (44.0)
Tobramycin	27 (67.5)	4 (10.0)	9 (22.5)	12 (48.0)	3 (12.0)	10 (40.0)
Streptomycin	8 (20.0)	4 (10.0)	28 (70.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	23 (92.0)
Ampicillin	14 (35.0)	1 (2.5)	25 (62.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100.0)
Cefotaxime	40 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100.0)
Nalidixic acid	0 (0.0)	0 (0.0)	40 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100.0)
Levofloxacin	23 (57.5)	5 (12.5)	12 (30.0)	5 (20.0)	2 (8.0)	18 (72.0)
Ciprofloxacin	24 (60.0)	5 (12.5)	11 (27.5)	3 (12.0)	3 (12.0)	19 (76.0)
Trimethoprim	22 (55.0)	4 (10.0)	14 (35.0)	10 (40.0)	0 (0.0)	15 (60.0)

Abbreviations: SRSs, swine rectal swabs; CSs, clinical specimens; S, susceptible; I, intermediate resistant; R, resistant.



Figure 1. Amino acid variations of GyrA (A), ParC (B), and ParE (C) detected in *E. coli* isolates involved in this study and reference amino acid sequence with accession number CP028379.1, CP010344.1 and CP010230.1, respectively. SRSs and CSs mean swine rectal swabs and clinical specimens, respectively.

Table 3. Quinolone resistance determinants of *E. coli* isolates showing resistant to nalidixic acid

Isolate	Specimens	Phenotype*	Mutations in QRDRs			PMQR [†] genes
			GyrA	ParC	ParE	
SRS1	Swine feces	NA	Wild type	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
SRS2	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS3	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS4	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS5	Swine feces	NA	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS6	Swine feces	NA	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS7	Swine feces	NA	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS8	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS9	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS10	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS11	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	S458A	
SRS12	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80R	Wild type	
SRS13	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS14	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS15	Swine feces	NA, LEV	S83L	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
SRS16	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
SRS17	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS18	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS19	Swine feces	NA	D87Y	Wild type	Wild type	
SRS20	Swine feces	NA	Wild type	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
SRS21	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80R	Wild type	
SRS22	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
SRS23	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
SRS24	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS25	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
SRS26	Swine feces	NA	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS27	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS28	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS29	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS30	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS31	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS32	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS33	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS34	Swine feces	NA	S83L	Wild type	Wild type	
SRS35	Swine feces	NA	S83L, D87G	S80R	Wild type	
SRS36	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	S458T	
SRS37	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80R	Wild type	
SRS38	Swine feces	NA	S83L	S80R	Wild type	
SRS39	Swine feces	NA	S83A	Wild type	Wild type	
SRS40	Swine feces	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	S458A	
CS1	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	<i>qnrS</i>
CS2	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S57T, S80I	L416F	<i>qnrS</i>
CS3	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	<i>qnrS</i>
CS4	Body Fluid	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	Wild type	S458A	
CS5	Urine	NA	S83L	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
CS6	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	<i>qnrS</i>
CS7	Sputum	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	
CS8	Blood	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
CS9	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	<i>qnrS</i>
CS10	Blood	NA, CIP	Wild type	Wild type	Wild type	<i>qnrS</i>
CS11	Body fluid	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	<i>qnrS</i>
CS12	Blood	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	
CS13	Urine	NA	S83L, D87N	S57P, S80I	Wild type	

Table 3. Continued

Isolate	Specimens	Phenotype*	Mutations in QRDRs			PMQR [†] genes
			GyrA	ParC	ParE	
CS14	Urine	NA	S83L	Wild type	S458A	
CS15	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	<i>qnrS</i>
CS16	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
CS17	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	
CS18	Urine	NA	S83L	Wild type	Wild type	
CS19	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84V	Wild type	
CS20	Urine	NA	D87N	Wild type	Wild type	
CS21	Blood	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
CS22	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84G	Wild type	
CS23	Urine	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I	Wild type	
CS24	Urine	NA	S83L	Wild type	S458A	
CS25	Pus	NA, LEV, CIP	S83L, D87N	S80I, E84G	Wild type	

Abbreviations: SRSs, swine rectal swabs; CSs, clinical specimens; AK, amikacin; CN, gentamicin; TOB, tobramycin; S, streptomycin; AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; NA, nalidixic acid; LEV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; W, trimethoprim; QRDR, quinolone resistance-determining regions.

*Antimicrobial resistant phenotypes about quinolones: nalidixic acid, levofloxacin and ciprofloxacin, [†]Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes: *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA* and *oqx4*.

alanine (A) 또는 leucine (L)으로 바뀌거나(S83A, S83L) 87번째 아미노산(aspartic acid, D)이 glycine (G), asparagine (N) 또는 tyrosine (Y)으로 치환된 돌연변이(D87G, D87N, D87Y)였다. *parC* 유전자 돌연변이는 *gyrA* 유전자 돌연변이보다 더 다양하였으며 57번째 아미노산(S), 80번째 아미노산(S) 그리고 84번째 아미노산(glutamic acid, E)에서 돌연변이들이 확인되었다. 57번째 S가 proline (P) 또는 threonine (T)으로 치환된 돌연변이(S57P, S57T), 80번째 S가 arginine (R) 또는 L로 치환된 돌연변이(S80R, S80L), 그리고 84번째 E가 G 또는 valine (V)로 치환된 돌연변이(E84G, E84V)들이 본 연구에서 확인되었다. *parE* 유전자분석을 통해 확인된 돌연변이는 416번째 아미노산(L)이 phenylalanine (F)로 치환된 돌연변이(L416F)와 458번째 아미노산(S)이 A 또는 T로 치환된 돌연변이(S458A, S458T)들이었다. 이번 연구에서는 quinolone 항균제에 내성을 나타내는 것으로 알려져 있는 돌연변이를 *gyrB* 유전자에 가지고 있는 대장균은 없는 것으로 나타났다.

한편, 본 연구에서는 조사된 대장균 총 65균주 중 3균주를 제외한 62개의 균주가 *gyrA*, *parC* 및/또는 *parE* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있었는데 62균주(95.4%)가 *gyrA* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있었고, 35균주(53.8%)가 *parC* 유전자에 돌연변이를 갖고 있었으며, 7균주(10.8%)가 *parE* 유전자에 돌연변이를 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 3). *gyrA* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 62균주 중 35균주가 *parC* 유전자에 동시에 돌연변이를 가지고 있었는데 이들 중 28균주가 본 연구에서 조사된 quinolone 계열 항균제(nalidixic acid, levofloxacin,

ciprofloxacin)에 모두 내성을 보였다. 덧붙여, 62균주 중 38균주는 두개 이상의 유전자에 동시에 돌연변이를 가지고 있음이 확인되었는데 사람에게서 유래한 대장균은 84.0% (21/25)가 두개 이상의 유전자에 돌연변이를 가지고 있었던 반면 돼지에서 유래한 대장균은 42.5% (17/40)가 두개 이상의 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 것으로 나타났다.

2) PMQR determinants 검출

본 연구에서는 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균을 대상으로 PMQR determinants인 *aac(6′)-Ib-cr*, *oqx4*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB* 및 *qnrS* 유전자의 빈도를 조사하기 위해 증합효소 연쇄반응을 시행한 결과 *qnrS* 유전자를 검출하기 위한 반응액을 제외하고는 양성반응이 나타나지 않았다. 염기서열분석을 통해 *qnrS* 유전자임이 확인된 균주는 총 13균주였는데, 이들 중 QRDRs에 돌연변이를 포함하지 않는 균주는 SRS1, SRS20과 CS10으로 나타났다. 그리고 *qnrS* 유전자를 포함하는 총 13균주 중 9균주가 CSs로부터 분리된 대장균이었고 4균주만 SRSs로부터 분리된 대장균이었다.

고 찰

축산농가에서도 많이 사용하고 있고 임상에서도 환자의 치료를 위해 빈번하게 사용되고 있는 quinolone 계열 항균제에 내성을 나타내는 세균이 증가하고 있어 사람뿐 만 아니라 가축을 대상으로 quinolone 계열 항균제 내성 기전을 연구하는 것

은 중요하다. 따라서 본 연구에서는 가축과 사람에서 분리된 대장균을 대상으로 quinolone 계열 항균제에 대한 내성율과 어떠한 내성 인자를 포함하여 내성을 나타내는지 조사하였다.

연구기간 동안 총 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균이 수집되었고, 이 균주를 대상으로 QRDRs에 위치한 유전자의 돌연변이를 확인하였다. 대장균이 quinolone 계열 항균제에 내성을 나타내는 중요한 기전 중 하나가 DNA gyrase 및/또는 DNA topoisomerase IV의 QRDRs에 돌연변이를 가지는 경우인데 특이 이 경우 세균은 quinolone 계열 항균제에 고도 내성을 나타낸다고 한다[15]. 본 연구에서 분리된 nalidixic acid 내성 대장균은 *gyrB* 유전자를 제외한 나머지 *gyrA*, *parC*, *parE* 유전자에 다양한 점 돌연변이를 포함하고 있었는데 *gyrA* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 균주가 95.4%로 가장 많았고 *parC* 유전자에 돌연변이를 갖고 있는 균주가 53.8%로 그 다음으로 많았다. 이와 비교해 *parE* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 대장균은 10.8%로 상대적으로 돌연변이 비율이 낮았으며 *gyrB* 유전자에서는 돌연변이가 검출되지 않았다. 이전의 많은 연구자들도 quinolone 계열 항균제에 내성을 나타내는 세균들이 *gyrB* 및 *parE* 유전자 보다는 상대적으로 *gyrA* 및 *parC* 유전자에 빈번하게 돌연변이를 포함하고 있다고 보고하였다[6, 16, 17]. 국내에서 사육된 돼지의 분변에서 분리된 대장균을 대상으로 한 연구에서도 *gyrB* 유전자를 제외한 나머지 3개의 유전자에서만 돌연변이를 확인한 바 있으며, 독일에서 임상검체로부터 분리된 대장균을 대상으로 한 연구에서도 *gyrB* 유전자를 빼고 나머지 3개의 유전자에서 돌연변이를 확인했다고 보고하였다[16, 17].

한편, nalidixic acid 내성 대장균 65균주 중 QRDRs에 2개 이상의 돌연변이를 포함하는 균주의 비율이 CSs로부터 분리된 대장균은 84.0% 이었던 반면 SRSs로부터 분리된 대장균은 42.5% 인 것으로 나타나 사람에서 유래한 대장균의 돌연변이 비율이 돼지에서 유래된 대장균과 비교해 높은 것으로 확인되었다. 세균은 QRDRs 유전자 중 특히 *gyrA*와 *parC* 유전자에 동시에 돌연변이를 가질 경우 quinolone 계열 항균제에 고도 내성을 갖는다[17]. 본 연구에서 수집된 총 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균 중 35균주가 *gyrA*와 *parC* 유전자에 동시에 돌연변이를 가지고 있었는데 이들 중 80%에 해당하는 28균주가 quinolone 계열 항균제(nalidixic acid, levofloxacin, ciprofloxacin)에 모두 내성을 보였다(Table 3). 게다가 이 균주들은 돌연변이 개수가 3개~5개인 것으로 나타나 이전의 보고와 유사한 결과를 보였다[12]. 본 연구에서 확인된 QRDRs의 돌연변이는 SRSs로부터 분리된 대장균과 CSs로부터 분리된 대장

균간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. *gyrA* 유전자 돌연변이는 83번과 87번째 아미노산에서 확인되었고, *parC* 유전자 돌연변이는 57번, 80번 및 84번 아미노산에서 확인되었으며, *parE* 유전자 돌연변이는 146번과 458번째 아미노산에서 확인되었는데(Figure 1) 이 돌연변이들은 이전에 사람과 동물에서 분리된 대장균에서 빈번하게 보고된 돌연변이였다[17-19].

본 연구에서 분리된 nalidixic acid 내성 대장균이 PMQR determinants인 유전자를 포함하고 있는지 조사한 결과 *qnrS* 유전자만 총 13균주(20%)에서 검출되었는데 이 13균주 중 10균주는 QRDRs에 돌연변이를 포함하고 있었다. QRDRs에 돌연변이가 없고 *qnrS* 유전자만 포함하는 3균주 중 2균주는 nalidixic acid에만 내성을 나타냈으며 나머지 한 균주는 nalidixic acid 및 ciprofloxacin에 내성을 나타냈다. 이 결과는 대장균이 *qnrS* 유전자만 포함할 경우 QRDRs에 돌연변이를 포함하는 경우보다 상대적으로 quinolone 계열 항균제에 대해 내성을 나타낼 확률이 낮음을 의미한다. 이전의 많은 연구들 또한 PMQR determinants인 유전자들은 quinolone 계열 항균제에 대해 낮은 수준의 내성을 담당한다고 보고한 바 있다[20, 21]. 그러나 *qnr* 유전자는 다양한 항균제에 내성을 나타낼 수 있는 유전자들을 포함하고 있는 plasmid에 위치해 있는 경우가 많아 *qnr* 유전자의 존재는 매우 중요한 의미를 갖는다[6]. 본 연구에서는 총 13균주(20%)가 *qnr* 유전자를 포함하는 것으로 나타났는데 이전의 fluoroquinolone 내성 장내세균과를 대상으로 한 연구에서도 19%가 *qnr* 유전자를 포함하고 있는 것으로 보고된 바 있다[9].

사람과 가축에서 quinolone 내성 대장균의 분리 빈도가 지속적으로 증가하고 있음에도 불구하고 사람과 가축으로부터 분리된 대장균을 대상으로 quinolone 내성 기전을 조사한 연구는 상대적으로 많지 않았다. 본 연구에서는 사람과 돼지에서 유래한 대장균을 대상으로 quinolone 내성 인자를 분석하였는데 사람과 돼지에서 유래한 대장균 모두 quinolone 계열 항균제에 대한 내성은 PMQR determinants인 유전자들의 획득 보다는 QRDRs 특히 *gyrA* 및 *parC* 유전자에 돌연변이 발생에 의해 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 quinolone 내성 유전자가 plasmid 등을 통해 수평확산되어 내성을 전파하기 보다는 세균이 quinolone 계열 항균제에 노출된 뒤 염색체의 돌연변이에 의해 내성을 획득하게 됨을 의미한다. Quinolone 항균제에 대한 내성 세균의 출현 및 확산은 quinolone 계열 항균제 사용량의 지속적인 증가와 무분별한 사용 때문인 것으로 사료되며 이를 방지하기 위해서는 지속적으로 항균제 사용량을 줄이고 항균제 내성 인자를 조사하여 내성 세균의 출현 및 확산 양상을 감

시해야 할 것이다.

요 약

퀴놀론 항균제가 사람과 동물에게 부적절하고 광범위하게 사용될 경우 항균제내성인자의 출현 및 확산이 가속화 될 수 있다. 본 연구에서는 돼지의 직장면봉 검체(N=40) 및 임상 검체로(N=25)부터 분리된 총 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균을 대상으로 quinolone 내성 기전을 조사하였다. 항균제 감수성은 디스크 확산법에 의해 결정되었다. Quinolone 내성과 관련된 유전자와 돌연변이를 조사하기 위해 PCR 및 DNA sequencing이 수행되었다. 총 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균 중 62균주가 *gyrA*, *parC*, *parE* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있었는데, *gyrA* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 균주는 62균주(95.4%)였고, 35균주(53.8%)가 *parC* 유전자에 돌연변이를 갖고 있었으며, 7균주(10.8%)가 *parE* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있었다. 35균주는 *gyrA*와 *parC* 유전자에 모두 돌연변이를 가지고 있는 것으로 나타났다. 총 65균주의 대장균을 대상으로 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants를 조사하였다. 65균주의 nalidixic acid 내성 대장균 중 13균주에서 *qnrS* 유전자가 검출되었으나 이 중 10균주는 *gyrA*, *parC*, *parE* 유전자에 돌연변이를 포함하고 있는 것을 나타냈다. 본 연구에서는 사람과 돼지로부터 분리된 대장균이 quinolone 계열 항균제에 내성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 기전이 *gyrA*, *parC*, *parE* 유전자에 염색체 돌연변이가 발생하는 경우임을 확인하였는데 이 돌연변이들은 치료목적 또는 동물의 성장촉진을 위한 항균제의 과다사용으로 유발될 수 있다.

Acknowledgements: This work was supported by the 2018 Far East University Research Grant (FEU2018R20).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Sung JY, Professor.

REFERENCES

1. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2000;31:S24-S28.
2. EMA. Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. Second ESVAC report. London; European medicines agency; 2012.
3. van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*. 1999;58:589-607.
4. Chae SM, Park EJ, Park S. Antibiotic consumption and expenditures for acute upper respiratory tract infections in outpatients. *Yakhak Hoeji*. 2013;57:199-204. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30266>.
5. Paltansing S, Kraakman ME, Ras JM, Wessels E, Bernards AT. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:40-45. <https://doi.org/10.1093/jac/dks365>.
6. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:a025320. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>.
7. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60: 394-397.
8. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3953-3955.
9. Majlesi A, Kakhki RK, Mozaffari Nejad AS, Mashouf RY, Roointan A, Abazari M, et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae strains in Hamadan, West of Iran. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25: 426-430. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.11.019>.
10. Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, et al. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis*. 2013;56:641-648. <https://doi.org/10.1093/cid/cis942>.
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. p52-53.
12. Aoike N, Saga T, Sakata R, Yoshizumi A, Kimura S, Iwata M, et al. Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan: relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1692-1698. <https://doi.org/10.1128/JCM.03049-12>.
13. Xia LN, Li L, Wu CM, Liu YQ, Tao XQ, Dai L, et al. A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7:207-215. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0378>.
14. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of 13 Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3582-3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>.
15. Zhao L, Zhang J, Zheng B, Wei Z, Shen P, Li S, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from patients with community-onset infections in 30 Chinese county hospitals. *J Clin Microbiol*. 2015;53:766-770. <https://doi.org/10.1128/JCM.02594-14>.
16. Hu YS, Shin S, Park YH, Park KT. Prevalence and mechanism of

- fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine feces in Korea. *J Food Prot.* 2017;80:1145-1151. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-502>.
17. Paltansing S, Kraakman ME, Ras JM, Wessels E, Bernards AT. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:40-45. <https://doi.org/10.1093/jac/dks365>.
 18. Yeh JC, Lo DY, Chang SK, Chou CC, Kuo HC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in Taiwan. *J Vet Med Sci.* 2017;79:730-735. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0463>.
 19. Park JM, Choi SS. Molecular characterization of quinolone antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail meat in Seoul. *Yakhak Hoeji.* 2016;60:1-7. <https://doi.org/10.1186/s13620-017-0095-8>.
 20. Sung JY. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among CTX-M-14 producing *Escherichia coli* strains isolated from a university hospital in the Chungcheong province. *Korean J Clin Lab Sci.* 2016;48:210-216. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2016.48.3.210>.
 21. Yang HY, Nam YS, Lee HJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2014;25:163-169.