

< Original Article >

반려동물 유래 장내세균에서 plasmid 매개 퀴놀론 내성 유전자의 특성

조재근* · 김정미 · 김환득 · 김경희 · 임현숙 · 양창렬
대구광역시보건환경연구원

Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from companion animals

Jae-Keun Cho*, Jeong-Mi Kim, Hwan-Deuk Kim, Kyung-Hee Kim, Hyun-Suk Lim, Chang-Ryoul Yang

Health & Environmental Institute of Daegu, Daegu 42183, Korea

(Received 30 November 2018; revised 20 December 2018; accepted 31 December 2018)

Abstract

The aim of this study was to investigate the prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) gene in 79 *Enterobacteriaceae* isolated from dogs and cats. Of 79 isolates, PMQR genes were found in 10 (12.7%) isolates, including *aac(6′)-lb-cr*, *qnrB*, *qnrS* and *qnrA* detected alone or in combination in 8 (10.1%), 4 (5.1%), 2 (2.5%) and 1 (1.3%) isolates, respectively. Interestingly, two *qnrS* genes were detected in nalidixic acid and ciprofloxacin susceptible isolates. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) was detected in 90% (9 isolates) of PMQR positives isolates. Among ESBL genes, CTX-M, TEM and SHV were detected in 9, 8 and 3 isolates, respectively. Almost all PMQR genes were detected in co-existence with ESBL genes. All PMQR positives isolates were multi-drug resistance (i.e. resistant to five or more antibiotics). *qepA*, OXA and CMY-2 genes were not found. The six transconjugants were obtained by conjugation experiment. The *aac(6′)-lb-cr*, *qnrB* and *qnrS* were co-transferred with CTX-M, TEM and/or SHV, whereas *qnrA* was not observed among transconjugants. This is the first report of the presence of *aac(6′)-lb-cr* and *qnrA* gene among *Enterobacteriaceae* isolates from dogs in Korea. The prudent use of antimicrobials and continuous monitoring for companion animals are required.

Key words : *Enterobacteriaceae*, Dogs, PMQR, ESBL, Transconjugants

서 론

Quinolone계 항생제는 β -lactam 계열의 항생제와 더불어 가장 많이 사용되고 있는 항생제로, 이들 항생제의 사용에 따른 내성균의 출현은 점차 증가하고 있다. Quinolone계 항생제 내성은 DNA gyrase와 topoisomerase IV를 암호화하는 염색체 유전자의 돌연변이에 의한 내성이 주요 기전으로 알려져 있으나(Jacoby, 2005), 최근 plasmid 내에 있는 내성 유전자(plasmid-

mediated quinolone resistance, PMQR)에 의한 내성 기전이 존재함이 알려졌다(Rodríguez-Martínez 등, 2011). PMQR의 존재는 1994년 미국의 환자에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*에서 최초로 보고된 이후(Robicsek 등, 2006a), 최근 환경, 동물, 식품 등에서 다양하게 분리되고 있다(Poirel 등, 2012). Plasmid에 위치한 quinolone 내성에 관여하는 유전자로는 *qnr* 그룹에 속하는 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 등과 항생제의 변형에 관여하는 *aac(6′)-lb-r* 및 능동적 약물 유출펌프 유전자인 *qepA* 등이 알려져 있다(Rodríguez-Martínez 등, 2011).

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)와 AmpC β -lac-

*Corresponding author: Jae-Keun Cho, Tel. +82-53-760-1300, Fax. +82-53-760-1302, E-mail. salmonella00@korea.kr

tamase는 *Enterobacteriaceae*에서 3세대 cephalosporin 계 항생제에 내성을 나타내는 주요 내성 기전이다. ESBL은 *E. coli*와 *K. pneumoniae*, AmpC β -lactamase는 *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*의 주된 내성 기전으로 알려져 있으며(Kang, 2015), 다양한 종류의 ESBL (TEM, SHV, CTX-M 등) 및 AmpC β -lactamase (CMY, OXA 등)가 보고되고 있다(Ma 등, 2009; SO 등, 2012; Aslantaş와 Yilmaz, 2017; Cho 등, 2017). 한편 ESBL 유전자는 plasmids, transposons, integrons 같은 이동성 유전자 내에 위치하고 있고 내성 plasmid는 접합에 의해 다른 균으로 전달된다(Cantas 등, 2015). 더욱이 ESBL 산생균은 가끔 fluoroquinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole 또는 다른 종류의 항생제에 교차내성을 나타내며 다약제 내성을 보인다(Tian 등, 2012).

최근 ESBL 유전자와 PMQR 유전자를 동시에 보유하는 세균의 출현 빈도가 높아지고 있다(Briales 등, 2012; Liu 등, 2016b; Aslantaş와 Yilmaz, 2017). 더욱이 사람에서 보고된 PMQR 유전자가 동물에서 확인되고 있을 뿐 아니라 PMQR 유전자는 plasmid를 매개로 다른 균에 전달 될 수 있어 공중보건학적 측면에서도 매우 중요하다(Webber 등, 2001).

이번 연구는 대구지역 동물병원에서 의뢰된 개와 고양이 가검물로부터 분리된 *Enterobacteriaceae*을 대상으로 PMQR 유전자의 분포양상을 조사하고, 또한 PMQR 양성 균주에 대해서는 항생제 내성 양상, ESBL 유전자의 보유 유무 및 접합에 의한 PMQR과 ESBL 유전자 및 내성 전달여부를 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

2016년 1월부터 2017년 12월까지 대구지역 동물병

원에서 보건환경연구원으로 항생제 감수성 검사를 위해 의뢰된 가검물로부터 *Enterobacteriaceae* 79주(*E. coli* 40주, *Citrobacter freundii* 2주, *Enterobacter cloacae* 20주, *K. pneumoniae* 10주 및 *Proteus mirabilis* 7주)를 분리하여 실험에 공시하였다(Table 1). 균 분리 및 동정은 우선 가검물을 Blood agar (아산제약, Korea)와 MacConkey agar (Oxoid, UK) plate에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 의심되는 집락에 대해서는 순수 분리 후 VITECK 2 compac (BioMerieux, France)를 이용하여 최종 동정하였다.

Genomic DNA 및 Plasmid DNA 분리

공시균에 대한 genomic DNA의 추출은 boiling법으로 실시하였다. 즉 공시균을 tryptic soy broth (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 진탕 배양하여 얻은 균 부유액 1.0 mL를 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 상층 액을 제거한 다음 멸균 증류수 0.5 mL로 재 부유하였다. 균 부유액은 끓는 물에 10분 동안 가열한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 template DNA로 사용하였다. Transconjugants에 대한 plasmid DNA는 AccuPrep[®] Plasmid mini Extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다.

PMQR 및 β -lactamase 유전자 검출

PMQR 유전자(*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*) 및 β -lactamase (TEM, SHV, CTX-M, OXA, CMY-2)의 검출을 위해 사용된 primer는 Table 2와 같다. 우선 PCR 반응은 Maxime PCR PreMix *i*-StarTag (Intron, Korea)에 각각의 10 pmol primer 1 μ L와 template DNA 1 μ L를 넣은 후 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 반응량이 20 μ L 되게 하여 Tprofessional Thermal Cycler

Table 1. Isolated bacteria by the sampling sites

Isolates	Total	Ear	Skin	Urine	Uterus	Nose	Others*
<i>Escherichia coli</i>	40	9	4	6	17	2	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	20	1	6	4	6	2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	4	2	1	2	-	1
<i>Proteus mirabilis</i>	7	1	-	5	-	-	1
Total	79	17	12	16	25	4	5

*Annus, eye, gallbladder, kidney.

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence(5 to'3)	Annealing temp (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
qnrA-F	ATTTCTCAGCCAGGATTG	55	574	Jacoby et al (2009)
qnrA-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
qnrB-F	CGACCTKAGCGGCACTGAAT	55	513	Jacoby et al (2009)
qnrB-R	GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG			
qnrS-F	ACTGCAAGTTCATTGAACAG	53	431	Jacoby et al (2009)
qnrS-R	GATCTAAACCGTCGAGTTCG			
qepA-F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	58	596	Kim et al (2009)
qepA-R	GTCTACGCCATGGACCTCAC			
AAC(6)-lb-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	53	482	Kim et al (2009)
AAC(6)-lb-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTIT			
TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	60	1,150	Briñas et al (2002)
TEM-R	ACGCTCAGTGGAAACGAAAAC			
SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	52	885	Briñas et al (2002)
SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
OXA-F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	65	702	Briñas et al (2002)
OXA-R	TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG			
CMY-2-F	GATTCCTTGGACTCTTCAG	53	1,807	Briñas et al (2005)
CMY-2-R	TAAAACCCAGGTTCCCAGATAGC			
CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	50	593	Pagani et al (2003)
CTX-M-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA			

Table 3. Distribution of PMQR and ESBL genes in 79 *Enterobacteriaceae* isolates

species	MIC (mg/mL)		Resistance pattern*	PMQR genes	ESBL genes
	NA	CIP			
<i>E. coli</i> 16-35	>1,024	512	AM,AMC,GM,TC,SXT,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM	<i>qnrA, aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. coli</i> 16-59	8	1	AM,GM,TC,SXT,CM,CZ	<i>qnrS</i>	TEM,CTX
<i>E. coli</i> 17-45	>1,024	512	AM,TC,SXT,CM,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM,FEP	<i>aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. coli</i> 17-116	>1,024	512	AM,GM,TC,SXT,CM,LEV,MXF,CZ	<i>aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. cloacae</i> 16-56	>1,024	512	AM,AMC,GM,TC,SXT,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM,FEP	<i>qnrB, aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. cloacae</i> 17-80	16	1	AM,AMC,TC,SXT,CM,CZ,FOX	<i>qnrS</i>	**
<i>E. cloacae</i> 17-139	>1,024	512	AM,AMC,GM,TC,SXT,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM,FEP	<i>qnrB, aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>K. pneumoniae</i> 17-44	>1,024	512	AM,AMC,GM,TC,SXT,CM,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM	<i>qnrB, aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX,SHV
<i>K. pneumoniae</i> 17-103	256	512	AM,AMC,IPM,MPM,GM,TC,SXT,CM,LEV,MXF,CZ,FOX,CFM	<i>qnrB, aac(6)-lb-cr</i>	TEM,CTX,SHV
<i>K. pneumoniae</i> 17-122	>1,024	512	AM,TC,SXT,CM,LEV,MXF,CFM	<i>aac(6)-lb-cr</i>	SHV,CTX

*AM, ampicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; GM, gentamicin; TC, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole/ trimethoprim; LEV, levofloxacin; MXF, moxifloxacin; CZ, cefazolin; FOX, cefoxitin; CFM, cefixime; CM, chloramphenicol; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MPM, meropenem.
**Not detected.

(Biometra, Germany)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응조건은 초기 denaturation 후, denaturation, annealing, extension 과정을 반복하고 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 100 V로 30 분간 전기영동을 실시한 후 UV transilluminator (Biometra, Germany)를 이용하여 확인하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013)의 기준에 따라 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 대한 최소발육억제농도(MIC)는 평판희석법으로, ampicillin (10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), cefazolin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefixime (5 µg), cefepime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (10 µg), tetracy-

cline (30 µg), levofloxacin (5 µg), moxifloxacin (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) 및 chloramphenicol (30 µg) 등 14종의 항생제(Oxoid, UK)에 대해서는 디스크 확산법으로 실시하였다. 항생제 감수성 시험을 위한 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

접합 시험

접합시험은 Bradley 등(1980)의 방법에 따라 실시하였다. PMQR 양성 균주를 공여균으로 하고 sodium azide에 내성인 *E. coli* J53을 피전달균으로 하여 이들 공여균과 피전달균을 각각 4 mL 용량의 TSB에 접종하고 37°C의 항온수조에서 3~4시간 진탕 배양한 후, 공여균과 피전달균을 1:4의 비율로 혼합하여 37°C에서 18시간 배양하였다. 이 혼합액을 sodium azide (100 µg/mL)와 ampicillin (32 µg/mL)을 함유하는 MacConkey agar (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 형성된 집락(transconjugants)에 대해서는 PMQR 및 ESBL 유전자 및 약제내성 전달 유무를 확인하였다.

결 과

PMQR 유전자의 분포 양상

개와 고양이에서 분리된 *Enterobacteriaceae* 79주 중 PMQR 유전자는 *qnr*과 *aac(6′)-Ib-cr*이 단독 또는 조합으로 하여 *E. coli*에서 4주(10%), *E. cloacae*와 *K.*

*pneumoniae*에서 각각 3주(15% 및 30%) 등 10주(12.7%)에서 검출되었다(Table 1과 Fig 1). PMQR 유전자 중 *aac(6′)-Ib-cr*이 8주로 가장 많이 검출되었고, 다음 *qnrB* 4주, *qnrS* 2주 및 *qnrA*가 1주에서 검출되었다. *qepA* 유전자는 검출되지 않았다. 한편 PMQR 양성 균주 중 4주는 *qnrB*와 *aac(6′)-Ib-cr*, 1주는 *qnrA*와 *aac(6′)-Ib-cr*을 동시에 가지고 있었다.

β-lactamase 유전자 분포 양상

PMQR 양성 균주 중 ESBL 유전자는 *E. coli* 4주, *K. pneumoniae* 3주 및 *E. cloacae* 2주 등 총 9주(90%)에서 검출되었다. CTX가 9주로 가장 많이 검출되었고, 다음 TEM 8주, SHV 3주이었다. 한편 이들 ESBL 생성균 중 6주는 TEM과 CTX를, 2주는 TEM, SHV 및 CTX를, 1주는 SHV와 CTX 유전자를 동시에 보유하고 있었다. OXA와 CMY-2 유전자는 확인되지 않았다(Table 3과 Fig 2).

항생제 감수성 시험

PMQR 양성 균주 중 8주는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 각각 256~1024 µg/mL와 512 µg/mL 이상의 고도내성을 나타내었다. 반면 2주는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 대한 MIC가 각각 8 µg/mL과 1 µg/mL 및 16 µg/mL과 1 µg/mL로 감수성을 나타내었다. 또한 PMQR 양성 균주는 ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole에 각각 100%, cefazolin에 90%, levofloxacin, moxifloxacin에 각각 80%, genta-

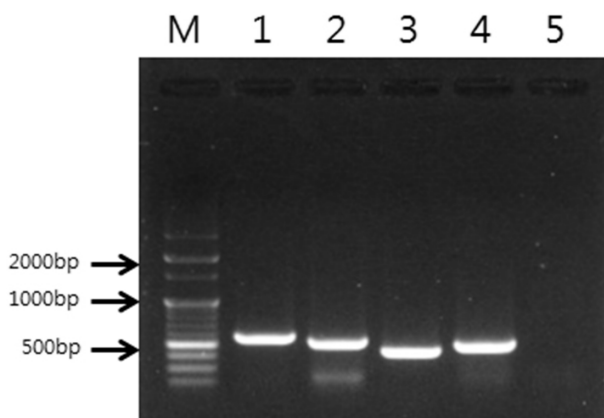


Fig. 1. Detection of PMQR genes. Lanes: M, 100 bp DNA marker; 1, *qnrA* (574 bp); *qnrB* (513 bp); *qnrS* (431 bp); 4, *aac(6′)-Ib-cr* (596 bp); 5, *qepA* (not detected).

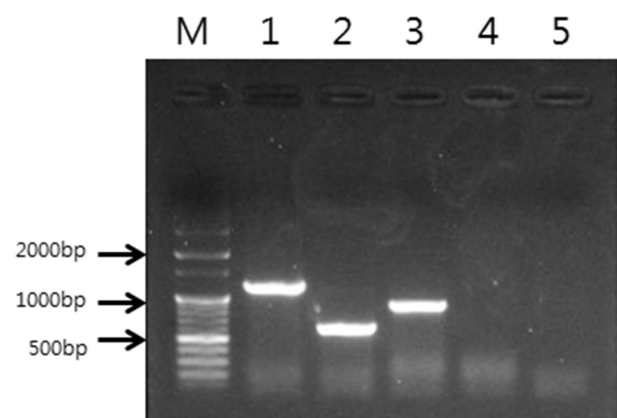


Fig. 2. Detection of ESBL genes. Lanes: M, 100 bp DNA marker; 1, TEM (1,150 bp); 2, CTX (593 bp); 3, SHV (885 bp); 4, OXA and 5, CMY (not detected).

Table 4. Distribution of PMQR and ESBL genes in 6 transconjugants

species	MIC (mg/mL)		Resistance pattern*	PMQR genes	ESBL genes
	NA	CIP			
<i>E. coli</i> T16-35	2	<1	AM,CZ	-**	TEM,CTX
<i>E. coli</i> T16-59	4	<1	AM,TC,CZ	<i>qnrS</i>	TEM,CTX
<i>E. coli</i> T17-45	2	<1	AM,TC,SXT,CM,CZ	<i>aac(6')-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. coli</i> T17-116	2	<1	AM,CZ	<i>aac(6')-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>E. cloacae</i> T16-56	16	<1	AM,TC,SXT,CZ,CFM	<i>qnrB, aac(6')-lb-cr</i>	TEM,CTX
<i>K. pneumoniae</i> T17-103	16	<1	AM,AMC,GM,TC,SXT,CM,CZ	<i>qnrB, aac(6')-lb-cr</i>	TEM,CTX,SHV

*AM, ampicillin; CZ, cefazolin; TC, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; CM, chloramphenicol; CFM, cefixime; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; GM, gentamicin. **Not detected.

micin, chloramphenicol, cefixime에 각각 70%, amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin에 각각 60%, cefepime에 30%, imipenem, meropenem에 각각 10%의 내성을 나타내었다.

접합 시험

PMQR 양성 균주에서 6주(60%)의 transconjugants가 생성되었으며, 이들 균주는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 대한 MIC가 각각 2~16 µg/mL 및 <1 µg/mL으로 감수성을 나타내었다. 이들 transconjugants 중 PMQR 유전자는 *E. coli* T16-35를 제외한 5주(83.3%)에서, ESBL 유전자는 6주 모두(100%)에서 공여균과 동일한 유전자를 plasmid 내 보유하고 있었다. 공여균에서 약제 내성의 일부(2~7종)가 transconjugants로 전달되었다. 특히 ampicillin과 cefazolin 내성은 transconjugants 모두에게 전달되었다(Table 4).

고찰

이번 연구에서 PMQR 유전자는 개와 고양이에서 분리된 79주의 *Enterobacteriaceae* 중 12%에서 검출되었다. 이는 이전 우리의 연구 결과인 개와 고양이에서 분리된 *E. coli*에서 13.8% (Cho 등, 2017)의 성적과는 유사하였으나, Shin 등(2010)이 국내 병성감정 의뢰 동물에서 분리된 *E. coli*에서 20%, MA 등(2009)이 반려동물과 산업동물에서 분리된 ceftiofur 내성 *Enterobacteriaceae*에서 34.7%, Liu 등(2016a)이 개에서 분리된 *E. coli*에서 80%의 성적 보다는 낮았고, Kim 등(2009)이 국내 대학병원 임상환자 유래에서 보고한 8%의 성적 보다는 다소 높았다. 이와 같이 PMQR 유전자 검출률의 차이는 quinolone계 항생제의 사용량

과 관련이 있을 것으로 생각된다. PMQR 유전자는 *E. coli* 보다 *E. cloacae*와 *K. pneumoniae*에서 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(Robicsek, 2006b; Park, 2007; Kim 등, 2009). 이번 연구에서 비록 공시균의 수는 적었지만 PMQR 유전자는 *K. pneumoniae*에서 가장 많이 검출되었다.

Aslantaş와 Yilmaz (2017)는 터키의 개 유래 *E. coli*에서 *aac(6')-lb-cr* 25.3%, *qnrS* 10.5% 및 *qnrB* 1.1%, Liu 등(2016b)은 2009년부터 2013년까지 미국의 개와 고양이 유래 *E. coli*에서 *aac(6')-lb-cr* 48.5%, MA 등(2009)은 중국의 동물유래 *Enterobacteriaceae*에서 *aac(6')-lb-cr* 18.8%, *qepA* 15.8% 및 *qnr* 7.9%(*qnrB*와 *qnrS*)를 보고하여 PMQR 유전자 중 *aac(6')-lb-cr*이 가장 널리 유행한다고 하였다. 이번 연구에서도 *aac(6')-lb-cr*이 가장 많이 검출되었으며 더욱이 *aac(6')-lb-cr*은 단독 또는 *qnrA* 및 *qnrB* 유전자와 조합하여 나타났다. 특히 *qnrB*가 검출된 4주 전부는 *aac(6')-lb-cr*과 동시에 나타났다. Shin 등(2010)은 국내 동물유래 *E. coli*에서 *qepA* 14.5%, *aac(6')-lb-cr* 7.3% 및 *qnrS* 1.8%로 *qepA*가 가장 많이 검출되었다고 보고하였으나, 이번 연구에서 *qepA*는 확인되지 않았다. 한편 Kim 등(2009)은 국내 대학병원 임상환자 유래 *Enterobacteriaceae*에서 *qnrB* 4.8%, *aac(6')-lb-cr* 2.2%, *qnrS* 0.9% 및 *qepA* 0.2%로 *qnrB*가 가장 많이 검출되었다고 보고하였다.

이번 연구에서 CTX-M 유전자는 ESBL 유전자 중 가장 많이 검출되었으며, TEM 또는 SHV 유전자와 조합하여 나타났다. 이들 ESBL 유전자는 개와 고양이 유래 장내세균에서 보고되고 있다(So 등, 2012; Tamang 등, 2012; Cho 등, 2017). 최근 CTX-M 산생 *E. coli*에서 CTX-M-15는 *aac(6')-lb-cr*와 동시에 발견된다고 보고되고 있다(Liu 등, 2016b; Aslantaş와 Yilmaz, 2017). 이번 연구에서도 *aac(6')-lb-cr*을 보유한 균은

모두 CTX-M형 유전자를 보유하고 있어 유사한 결과를 얻었다. 이번 연구에서 plasmid 매개 AmpC β -lactamase인 CMY-2와 OXA 유전자는 검출되지 않았다. 한편 국내의 경우 개에서 분리된 *E. coli*에서 CMY-2 유전자에 대한 보고는 있으나(So 등, 2012; Tamang 등, 2012), OXA 유전자의 검출에 관한 보고는 없다. OXA 유전자는 carbapenem계 항생제를 분해하는 효소이다.

PMQR 유전자는 DNA gyrase와 topoisomerase IV의 유전자 변이보다 쉽게 quinolone에 내성을 일으키는 것으로 알려져 있다(Hooper, 2001). 이번 연구에서 PMQR 산생균 중 *aac(6)-lb-cr*, *qnrA* 및 *qnrB* 유전자를 가진 균은 ciprofloxacin과 nalidixic acid에 고도내성을 나타내어, *qnr* 유전자를 가지는 세균은 nalidixic acid에 저항성을 보이고 fluoroquinolone계 항생제에 대한 MIC가 높게 나타난다는 이전 연구자들의 결과와 일치하였다(Poirel 등, 2005; Robicsek 등, 2006a). 반면 *E. coli* 16-59와 *E. cloacae* 17-80는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 감수성을 나타내었지만 *qnrS* 유전자를 보유하고 있었다. 이는 ciprofloxacin에 감수성 균주에서도 PMQR 유전자가 검출될 수 있다는 이전 연구자들의 결과(Cavaco와 Aarestrup, 2009; Zhao 등, 2010)와 일치하였다.

한편 Liao 등(2013)은 PMQR 유전자는 quinolone에 의해 일어나는 선택적 압력과는 관련이 없으며, PMQR 유전자의 존재는 quinolone의 사용보다는 cephalosporin계 항생제의 사용과 더 관련이 있다고 하였다. Shin 등(2010)은 *aac(6)-lb-cr* 유전자는 단독으로 존재할 때 보다 *qnrS* 또는 *qepA* 유전자와 함께 존재할 때 quinolone에 전반적으로 높은 MIC를 나타내었고, Robicsek 등(2006c)은 *aac(6)-lb-cr*과 *qnr*이 함께 존재할 때가 *qnr* 단독으로 존재할 때 보다 CIP의 MIC가 2~4배 정도 증가하였다고 하였다. 이번 연구에서 대부분 PMQR 산생균에서 *aac(6)-lb-cr* 유전자는 *qnr*의 존재와 상관없이 quinolone에 대한 MIC는 매우 높아 다소 차이가 있었다. 반면 *K. pneumoniae* 17-103은 *qnrB*와 *aac(6)-lb-cr*가 함께 존재할 때 nalidixic acid에 대한 MIC가 오히려 낮았다. 이에 대해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이번 연구에서 PMQR 양성 균주 및 ESBL 산생균은 ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, cefazolin, levofloxacin, moxifloxacin 같은 항생제에 상당히 높은 내성률을 보였다. 더욱이 이들 균주 모두가 사용된 6종 이상의 항생제에 내성을 보인 다약제 내성균이었다. 특히 *K. pneumoniae* 17-103은 carbapenem계 항생제인 imipenem과 meropenem에도 내성을 보여 PMQR 산생균에 있어 항생제 내성 문제는 심각한 수준에 도달하였음을 알 수 있었다.

Quinolone 내성은 수평적인 유전자 전달에 의해 획득될 수 있으며, PMQR 유전자는 ESBL 유전자와 함께 동일 plasmid 내에 존재하고 피전달균에게 동시에 전달될 수 있다(Briales, 2012; Yu 등, 2015; Liu 등, 2016b). 이번 연구에서 대부분 transconjugants는 공여균과 동일한 유전자를 보유하고 있어, PMQR 및 ESBL 유전자는 쉽게 다른 균주로 이동할 수 있음을 알 수 있었다. Ishida 등(2010)은 PMQR 유전자는 피전달균에게 낮은 내성을 전달한다고 보고하였다. 이번 연구에서도 접합에 의해 생성된 transconjugants는 공여균과 비교 시 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 모두 낮은 MIC를 보여 유사한 결과를 얻었다.

항생제 내성 유전자가 다른 종류의 세균으로 전달될 경우 항생제의 선택이 매우 제한되어 질병치료에 어려움을 초래할 수 있다. 반려동물에서 사용되는 것과 동일한 항생제가 사람에게 사용되고 있고 동물유래 항생제 내성균 또는 내성 유전자가 사람으로의 전달될 수 있다. 특히 개와 고양이는 사람과 매우 밀접한 관계를 맺고 있어 이들 항생제 내성균은 사람으로의 전파가 가능하다. 반려동물 병원에서 항생제의 신중한 사용이 요구된다.

결론

개와 고양이에서 분리된 *Enterobacteriaceae* 79주에서 PMQR 유전자의 분포 양상과 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. PMQR 유전자는 10주(12.7%)에서 발견되었다. *aac(6)-lb-cr*이 8주(10.1%)로 가장 많이 검출되었고, 다음 *qnrB* 4주(5.1%), *qnrS* 2주(2.5%) 및 *qnrA* 1주(1.3%) 순이었다. 이들 PMQR 유전자는 단독 또는 조합하여 나타났다. *qnrS* 유전자가 검출된 2주는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 감수성을 나타내었다. PMQR 양성 균주의 90%(9주/10주)에서 CTX-M(9주), TEM(8주) 및 SHV(3주) 유전자가 검출되었다. 반면 *qepA*, OXA 및 CMY-2 유전자는 검출되지 않았다. PMQR 양성 균주는 모두 사용된 5종 이상의 항생제에 내성을 보인 다약제 내성균이었다. 접합 시험에 의해 생성된 대부분 transconjugants는 공여균과 동일한 PMQR 및 ESBL 유전자를 plasmid 내에 가지고 있었다.

REFERENCES

- Aslantaş Ö, Yılmaz EŞ. 2017. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs. *J Vet Med Sci* 79: 1024-1030.
- Bradley DE, Taylor DE, Cohen DR. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 143: 1466-1470.
- Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2012. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 39: 431-434.
- Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M, Zarazaga M, Torres C. 2005. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother*. 56: 1107-1110.
- Briñas L, Zarazaga M, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 3156-3163.
- Cantas L, Suer K, Guler E, Imir T. 2015. High emergence of ESBL-producing *E. coli* cystitis: time to get smarter in cyprus. *Front Microbiol* 6: 1446.
- Cavaco LM, Aarestrup FM. 2009. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants 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 determinations of wild-type distributions. *J Clin Microbiol*. 47: 2751-2758.
- Cho JK, Kim JM, Kim HD, Kim KH. 2017. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and cats at animal hospitals in Daegu. *Korean J Vet Res* 40: 193-200.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals; approved standard. fourth edition and supplement, CLSI document VET01-A4 (standard) and VET01-S2 (supplement), in Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, PA.).
- Hooper DC. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 7: 337-341.
- Ishida Y, Ahmed AM, Mahfouz NB, Kimura T, El-Khodery SA, Moawad AA, Shimamoto T. 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J Vet Med Sci* 72: 727-734.
- Jacoby GA. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 41: S120-126.
- Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC. 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 1665-1666.
- Kang CI. 2015. Antimicrobial therapy for infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Korean J Med* 88: 502-508.
- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 639-645.
- Liao CH, Hsueh PR, Jacoby GA, Hooper DC. 2013. Risk factors and clinical characteristics of patients with *qnr*-positive *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 68: 2907-2914.
- Liu X, Liu H, Li Y, Hao C. 2016a. High prevalence of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from dogs in Shaanxi, China. *Front Microbiol* 16: 1843.
- Liu X, Thungat K, Boothe DM. 2016b. Occurrence of OXA-48 carbapenemase and other β -lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009-2013. *Front Microbiol* 7: 1057.
- Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lü D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M. 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 Agents Chemother* 53: 519-524.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 41: 4264-4269.
- Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ. 2007. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother* 60: 868-871.
- Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol* 3: 24.
- Poirel L, Van De Loo M, Mammeri H, Nordmann P. 2005. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3091-3904.
- Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. 2006a. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6: 629-640.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D,

- Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006c. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-88.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahl DF, Jacoby GA, Hooper DC. 2006b. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2872-2874.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17: 149-182.
- Shin DH, Kim HY, Byun JW, Kim DK, Lim SK, Jung BY. 2010. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in Korea. *J Life Science* 20: 964-967.
- So JH, Kim J, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lim SK, Park YH, Lee K. 2012. Dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Korean veterinary hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 73: 195-199.
- Tamang MD, Nam HM, Jang GC, Kim SR, Chae MH, Jung SC, Byun JW, Park YH, Lim SK. 2012. Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 2705-2712.
- Tian GB, Wang HN, Zhang AY, Zhang Y, Fan WQ, Xu CW, Zeng B, Guan ZB, Zou LK. 2012. Detection of clinically important β -lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China. *J Med Microbiol* 61: 233-238.
- Webber M, Piddock LJ. 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res* 32: 275-284.
- Yu T, Jiang X, Fu K, Liu B, Xu D, Ji S, Zhou L. 2015. Detection of extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Escherichia coli* isolates from retail meat in China. *J Food Sci* 80: M1039-1043.
- Zhao X, Xu X, Zhu D, Ye X, Wang M. 2010. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by *qnr* determinants. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67: 110-113.