



ORIGINAL ARTICLE

Analysis of Sequence Type and Fluoroquinolone Resistance in Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*

Hye Hyun Cho

Departments of Biomedical Laboratory Science, Daejeon Institute of Science and Technology, Daejeon, Korea

Ciprofloxacin 내성 대장균에서 Sequence Type과 Fluoroquinolone 내성의 분석

조혜현

대전과학기술대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received July 7, 2021
Revised July 15, 2021
Accepted July 20, 2021

Key words

Fluoroquinolone
Plasmid mediated quinolone resistance
Quinolone resistance determining regions
Sequence type 131

ABSTRACT

Fluoroquinolone (FQ) resistant gram-negative pathogens have emerged worldwide, and the recent increase in FQ resistant *Escherichia coli* is of great concern in Korea. This study investigated FQ resistance determinants and the epidemiological relationship of 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolated from a tertiary hospital in Daejeon, South Korea from June to December 2018. Molecular epidemiology was investigated by multilocus sequence typing (MLST). Polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis were performed to identify chromosomal mutations in the quinolone resistance determining regions (QRDR) of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and to describe the occurrence of the following plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes: *aac(θ)-lb-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrS*. MLST analysis showed 12 sequence types (STs) and the most prevalent ST was ST131 (31/56, 55.4%), followed by ST1193 (13/56, 23.2%), and ST405 (3/56, 5.4%). In 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates, Ser83→Leu and Asp87→Asn in *gyrA* and Ser80→Ile and Glu84→Val in *parC* (51.8%, 29/56) were the most frequent amino acid substitutions and *aac(θ)-lb-cr* (33.9%, 19/56) was the most common PMQR gene. These results of FQ resistance determinants were more frequently observed in ST131 compared with other clones. Continuous monitoring of the epidemiological characteristics of ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates and further investigation of FQ resistance determinants are necessary.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

Fluoroquinolone (FQ) 계열은 다양한 지역사회 또는 원내 감염의 치료에 사용되고 있는 강력한 광범위 항균제이다[1]. 지난 1980년대 도입된 이후, FQ의 사용량 증가는 유기체와 지역에 따른 다양한 내성 출현의 원인이 되었고, 최근까지 수년 동안

FQ 내성 세균이 현저하게 증가하고 있어 문제가 되고 있다[2]. 특히 아시아-태평양 지역에서 FQ 내성 *Escherichia coli*가 토착화되고 있는 가운데, 이러한 FQ 내성의 증가는 전 세계적으로 다양한 세균감염 치료에 사용가능한 항균제가 제한되는 심각한 문제가 제기되고 있다[3, 4].

FQ 계열 항균제는 DNA 복제 과정에서 사용되는 두 가지 중요한 효소인 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV와 복합체를 형성함으로써 세균의 성장을 억제하여 항균작용을 한다. 이러한 FQ 계열 항균제 중 임상에서 가장 빈번하게 처방되는 ciprofloxacin은 30년 이전부터 임상에 도입되어 사용되었으

Corresponding author: Hye Hyun Cho

Departments of Biomedical Laboratory Science, Daejeon Institute of Science and Technology, 100 Hyecheon-ro, Seo-gu, Daejeon 35408, Korea

E-mail: airplane1102@hanmail.net

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0471-4938>

며, 그람양성 및 그람음성세균, 특히 장내세균에 의한 세균감염에 효과적인 치료제로 사용되고 있다[5, 6].

FQ 내성은 주로 DNA gyrase (*gyrA* 및 *gyrB*) 또는 DNA topoisomerase IV (*parC* 및 *parE*) 유전자 내 quinolone resistant determining region (QRDR)에서 특정 위치의 돌연변이로 인해 FQ과의 결합 친화성을 감소시킴으로써 발생한다[7]. 최근 몇 년 동안 보고된 여러 연구결과를 살펴보면, 특히 *E. coli* 및 *Klebsiella* spp.와 같은 장내세균에서 FQ에 대한 내성이 전 세계적으로 증가하고 있음을 강조하고 있다[8, 9]. 이러한 *E. coli*에서 가장 발생 빈도가 높은 돌연변이는 *gyrA* 유전자의 83번째 아미노산인 serine, 87번째 아미노산인 aspartic acid와, *parC* 유전자의 80번째 아미노산인 serine, 84번째 아미노산인 glutamic acid가 각각 다른 아미노산으로 치환되는 것이 보고되고 있다[7, 10].

또한, FQ 내성에 관여하는 plasmid mediated quinolone resistance (PMQR)은 1998년 처음 보고된 이후, 최근 세 가지 유형의 PMQR 결정인자가 보고되었다[11].

첫 번째 PMQR 결정인자는 *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* 및 *qnrS* 유전자와 같은 quinolone 내성 유전자가 포함된다. Qnr은 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV에 결합하여 보호함으로써 FQ을 억제하는 것으로 보고되고 있다[12, 13]. 두 번째 PMQR 결정인자는 aminoglycosidemodifying enzyme인 AAC(6)-Ib-cr로, ciprofloxacin을 포함한 몇몇 FQs을 아세틸화하여 항균력을 감소시킨다. 가장 최근에 확인된 세 번째 PMQR 결정인자는 ciprofloxacin과 같은 친수성 FQ을 밀어내는 유출 펌프인 *qepA*이다[12-14].

이러한 FQ 내성 기전을 통해 발달한 내성 *E. coli*에 대한 연구가 전 세계적으로 진행되고 있으나, 우리나라의 경우, 최근 대전지역에 유행하고 있는 FQ 내성 *E. coli*의 유전형과 관련 내성 결정인자에 대한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 대전지역의 3차 병원에서 분리된 ciprofloxacin 내성 *E. coli*를 대상으로, multilocus sequence typing (MLST)를 통해 각 균주의 sequence type (ST)를 조사하고, 이러한 결과를 토대로 최근 유행하고 있는 ST에 따른 FQ 내성 결정인자를 비교 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집과 동정

본 연구는 2018년 6월부터 12월까지 대전지역의 3차 병원에서 분리된 ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주를 대상으로 하였

다. 이 중 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 임상검체로부터 분리 배양된 균주는 Vitek 2 automated ID system (BioMerieux, Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 동정하였다.

2. 항균제 감수성 검사

Clinical and laboratory standards institute (CLSI) 지침에 따라[15], amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, ertapenem, imipenem, ciprofloxacin (BioMerieux)에 대한 항균제 감수성 검사는 Mueller-Hinton 한천배지(Difco, Cockeysville, MD, USA)를 사용하여 E-test법으로 확인하였다. 정도관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위 내에 있는지 확인하였다.

3. MLST 분석

MLST는 *E. coli* MLST database website (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)에 설명된 방법에 따라 분석하였다. 먼저, 대상 균주는 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, Genomic DNA prep kit (Solgent, Daejeon, Korea)을 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출액(5 µL), 10x Taq buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (Solgent) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. 7개의 housekeeping gene (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*)은 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)을 사용하여 95°C에서 2분간 반응시킨 후, 95°C에서 1분, annealing temperature에서 1분, 72°C에서 2분으로 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다(Table 1). 각각의 PCR 반응산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물은 PCR purification kit (Solgent)로 분리한 후, BigDye Terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730x1 DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 7개의 housekeeping gene에 대한 각각의 염기서열 분석 결과는 MLST database에 입력하여 allelic number와 ST를 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotides primers used in current study

Gene	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)	Reference
MLST primers				
<i>adk</i>	F: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG R: CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	54	583	16
<i>fumC</i>	F: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC R: GTACGCAGCGAAAAAGATTC	54	806	16
<i>gyrB</i>	F: TCGGCGACACGGATGACGGC R: ATCAGGCCTTCACGCGCATC	60	911	16
<i>icd</i>	F: ATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA R: GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	878	16
<i>mdh</i>	F: ATGAAAAGTCGAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG R: TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGATATCTTTCTT	60	932	16
<i>purA</i>	F: CGCGCTGATGAAAGAGATGA R: CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816	16
<i>recA</i>	F: CGCATTGCTTTACCCTGACC R: TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	58	780	16
QRDRs sequencing primers				
<i>gyrA</i>	F: AAATCTGCCCGTGTCGTTGGT R: GCCATACCTACGGCGATACC	55	344	12
<i>gyrB</i>	F: GAAATGACC CGCCGTAAA R: ACGACCGATACCACAGCC	55	272	17
<i>parC</i>	F: CTGAATGCCAGCGCCAAATT R: GCGAACGATTTTCGGATCGTC	55	168	12
<i>parE</i>	F: CTGAACTGCTGGCGGAGATG R: GCGGTGGCAGTGCAGGTAA	60	483	17
PMQR gene detection primers				
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	55	482	18
<i>qepA</i>	F: TGGTCTACGCCATGGACCTCA R: TGAATTCGGACACCGTCTCCG	56	1137	19
<i>qnrA</i>	F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG R: GCCATACCTACGGCGATACC	54	516	13
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ATGAGCAACGATGCCTGGTA	54	476	13
<i>qnrC</i>	F: GGGTTGTACATTTATTGAATC R: TCCACTTTACGAGTTCT	47	447	13
<i>qnrD</i>	F: CGAGATCAATTTACGGGGAATA R: AACAAGCTGAAGCGCCTG	54	582	13
<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	54	428	13

Abbreviations: MLST, multilocus sequence typing; QRDRs, quinolone resistance determining regions; PMQR, plasmid mediated quinolone resistance.

4. FQ 내성 결정인자의 검출

항균제 감수성 검사 결과, ciprofloxacin에 내성을 보인 *E. coli* 56균주를 대상으로 FQ 내성 결정인자를 조사하였다. QRDR이 위치한 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 돌연변이 확인과 PMQR 결정인자인 *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, 및 *qnrS* 유전자의 검출을 위해 이전 연구에서 사용한 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

MLST 분석에서와 동일한 방법으로, DNA 추출액(5 µL),

10× Taq buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (Solgent) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. PCR 과정은 94°C에서 3분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, annealing temperature에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각 PCR 반응산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물은 PCR purification kit (Solgent)로 분리한 후, BigDye terminator

cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 각각의 염기서열 분석 결과는 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 *Escherichia coli* ATCC 25922와 비교 분석하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상 분석

총 56균주의 ciprofloxacin 내성 *E. coli*를 대상으로 항균제 감수성 검사를 실시한 결과, cefotaxime에 55.4% (31균주), gentamicin에 46.4% (26균주), azteronam에 39.3% (22균주)의 높은 내성을 보였으며, cefepime과 ceftazidime은 각각 28.6% (16균주)와 23.2% (13균주)의 내성을 보였다. amikacin은 3.6% (2균주)의 비교적 낮은 내성을 보였으며, ertapenem과 imipenem에는 56균주 모두 내성을 보이지 않았다.

2. Ciprofloxacin 내성 *E. coli*의 MLST 분석

Ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주를 대상으로 MLST를 시행한 결과, 총 12개의 ST를 확인하였다(Table 2). 이 중 가장 흔한 유형은 ST131이었고, 총 56균주 중 31균주(55.4%)에서 확인되었으며, 순차적으로 ST1193이 13균주(23.2%), ST405가 3균주(5.4%)에서 확인되었다. 나머지 9개의 ST (ST69, ST93, ST224, ST648, ST2003, ST2179, ST2599, ST4204, ST5150)는 각각 1균주(1.8%)에서 확인되었다.

또한, 임상검체의 종류에 따라 ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주를 분리한 결과, 44균주(78.6%)가 소변에서 가장 많이 분리되었으며, 그 다음으로 7균주(12.5%)가 혈액에서, 2균주(3.6%)가 담즙에서 분리되었다. 그 밖에 각각 1균주(1.8%)가 자궁경부, 객담, 창상 검체에서 분리되었다.

Table 2. Prevalence of the ST among 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates according to disease sites

Specimen	No. of isolates (%)	ST (N)
Urine	44 (78.5)	131 (26), 1193 (10), 69 (1), 93(1), 224 (1), 648 (1), 2003 (1), 2599 (1), 4204 (1), 5150 (1)
Blood	7 (12.5)	131 (4), 1193 (2), 405 (1)
Bile fluid	2 (3.6)	405 (2)
Cervix	1 (1.8)	1193 (1)
Sputum	1 (1.8)	2179 (1)
Wound	1 (1.8)	131 (1)

Abbreviation: ST, sequence type.

검체별 분포한 ST의 유형을 살펴보면, 소변에서 총 12개의 ST 중 10개의 ST가 확인되어 가장 다양한 분포를 보였다. 이 중 ST131이 44균주 중 26균주(59.1%)로 가장 높은 빈도로 확인되었고, ST1193이 10균주(22.7%)로 두 번째로 높은 빈도를 보였으며, 그 밖에 8개의 ST (ST69, ST93, ST224, ST648, ST2003, ST2599, ST4204, ST5150)는 각각 1균주에서 확인되었다. 혈액에서는 3개의 ST가 확인되었는데, ST131과 ST1193이 각각 7균주 중 4균주(57.1%), 2균주(28.6%)로, 소변에서 확인된 ST의 유형과 유사한 빈도로 확인되었으나, ST405는 1균주에서 확인되었고, 소변에서 확인되지 않은 ST 유형이었다. 그 밖에 담즙은 2균주 모두 ST405로 확인되었고, 각각 1균주가 분리된 자궁경부, 객담, 창상 검체는 각각 ST1193, ST2179, ST131이 확인되었다.

3. FQ 내성 결정인자의 확인 및 분석

1) *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 돌연변이 분석

Ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주를 대상으로 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자에서 돌연변이를 확인한 결과, *gyrB* 유전자를 제외한 *gyrA*, *parC* 및 *parE* 유전자에서 56균주 모두 돌연변이가 확인되었다(Table 3). 이로 인해 *gyrA* 유전자의 경우, 83번째 아미노산인 serine (S)이 leucine (L)으로 치환되거나(S83L), 87번째 아미노산인 aspartic acid (D)가 asparagine (N)으로 치환된(D87N) 결과를 확인하였는데, 총 56균주 중 55균주(98.2%)에서 S83L, D87N가 확인되었고, 1균주(1.8%)에서 S83L을 확인하였다. *parC* 유전자의 경우, 80번째 아미노산인 serine (S)이 isoleucine (I)로 치환되거나 (S80I), 84번째 아미노산인 glutamic acid (E)가 valine (V)으로 치환된(E84V) 결과를 보였으며, 총 56균주 중 29균주 (51.8%)에서 S80I, E84V가 확인되었고, 27균주(48.2%)에서 S80I가 확인되었다. *parE* 유전자의 경우, 416번째 아미노산인 leucine (L)이 phenylalanine (F)으로 치환된(L416F) 결과를

Table 3. Amino acid substitutions in quinolone resistance determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* subunits in 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates

No. of isolates (%)	Amino acid substitution			
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
29 (51.8)	S83L, D87N	-	S80I, E84V	-
13 (23.2)	S83L, D87N	-	S80I	L416F
13 (23.2)	S83L, D87N	-	S80I	-
1 (1.8)	S83L	-	S80I	-

Abbreviations: S, serine; L, leucine; D, aspartic acid; N, asparagine; I, isoleucine; E, glutamic acid; V, valine; F, phenylalanine.

보였고, 총 56균주 중 13균주(23.2%)에서 확인되었다.

또한, 56균주 모두 두 개 이상의 유전자에서 돌연변이가 확인되었는데, 이 중 *gyrA* 유전자의 S83L, D87N과 *parC* 유전자의 S80I, E84V가 동시에 확인된 결과가 29균주(51.8%)로, 가장 높은 비율로 확인되었다. 그 다음으로 세 개의 유전자에서 돌연변이가 확인되었는데, 13균주(23.2%)에서 확인되었으며, *gyrA* 유전자의 S83L, D87N, *parC* 유전자의 S80I, *parE* 유전자의 L416F가 확인되었다. 순차적으로 *gyrA* 유전자의 S83L, D87N과 *parC* 유전자의 S80I가 13균주(23.2%)에서 확인되었으며, *gyrA* 유전자의 S83L과 *parC* 유전자의 S80I가 1균주(1.8%)에서 확인되었다.

2) PMQR 결정인자의 확인

56균주의 ciprofloxacin 내성 *E. coli*를 대상으로 PMQR 결정인자인 *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* 및 *qnrS* 유전자를 확인한 결과, 19균주(33.9%)에서 *aac(6)-Ib-cr* 유전자가 확인되었고, 12균주(21.4%)에서 *qnrB* 유전자가 확인되었으며, 1균주(1.8%)에서 *qnrS* 유전자가 확인되었다 (Table 4). 또한, 6균주(10.7%)에서 두 개의 유전자가 동시에 검출되었는데, 이 중 5균주(8.9%)에서 *aac(6)-Ib-cr*와 *qnrB* 유전자가 확인되었고, 1균주(1.8%)에서 *aac(6)-Ib-cr*와 *qnrS* 유전자가 확인되었다. 그 밖에 나머지 30균주(53.6%)에서는 7개의 유전자가 모두 검출되지 않았다.

4. ST에 따른 FQ 내성 결정인자의 확인

종합적으로, ST에 따른 FQ 내성 결정인자를 살펴 본 결과, 가장 높은 비율을 차지한 것은 ST131 10균주(17.9%)로, QRDR이 위치한 *gyrA* 유전자의 S83L, D87N과 *parC* 유전자의 S80I, E84V가 동시에 확인되었고, PMQR 유전자는 모두 검출되지 않은 결과를 보였다. 두 번째로 높은 비율을 차지한 8균주(14.3%) 또한 ST131으로 확인되었고, *gyrA* 유전자의 S83L, D87N과 *parC* 유전자의 S80I, E84V가 확인되었으며, PMQR

유전자 중 *aac(6)-Ib-cr* 유전자가 확인되었다. 세 번째로 높은 비율을 차지한 7균주(12.5%)는 ST1193으로, 세 유전자의 QRDR에서 돌연변이가 확인되었는데, 각각 *gyrA* 유전자의 S83L, D87N, *parC* 유전자의 S80I와 *parE* 유전자의 L416F가 확인되었으며, PMQR 유전자는 모두 검출되지 않았다.

특히, *parE* 유전자의 QRDR에서 확인된 L416F는 56균주 중 13균주(23.2%)에서 검출되었는데, ST1193에서 9균주(69.2%)가 확인되었다. 그 밖에 ST에 따른 FQ 내성 결정인자의 결과 분석은 Table 5와 같다.

고찰

FQ 내성 *E. coli*의 출현은 전 세계적으로 큰 우려를 낳고 있는 가운데, 우리나라의 경우, ciprofloxacin에 대한 내성율이 30% 이상으로 연구결과가 보고되고 있어 *E. coli*의 항균제 내성과 관련하여 주목받고 있다[20, 21]. 또한, 세계보건기구(WHO)는 5개의 대륙(아프리카, 아시아, 유럽, 중동, 아메리카)에 속한 국가들의 연구결과를 분석하여, ciprofloxacin에 대한 *E. coli*의 내성율이 최소 50% 이상으로 보고하였다[22]. 이러한 ciprofloxacin 내성 *E. coli*의 증가 추세는 FQ 내성 *E. coli* 클론의 전파 및 확산에 의한 것으로 일부 논문에서 보고하고 있다[21].

우리나라에서 분리된 *E. coli*의 FQ 내성율이 높음에도 불구하고, 최근 ciprofloxacin 내성 *E. coli*에 대한 유전형 분석 및 빈도, 그에 따른 FQ 내성 결정인자에 대한 논문이 드문 실정으로, 본 연구에서 조사하였다. MLST 결과, ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주 중 55.4% (31균주)가 ST131로 확인되었다. 여러 유럽 국가(영국, 이탈리아, 프랑스, 스페인, 포르투갈), 북아메리카, 쿠웨이트와 인도를 포함한 아시아 국가의 이전 연구에서 ST131은 ciprofloxacin 내성 *E. coli*의 펜데믹 클론으로 보고되었다[23, 24]. ST131은 다제 내성 *E. coli*로, 전 세계적으로 확산되고 있으며, 특히 우리나라의 경우, 지역사회와 의료환

Table 4. Distribution of plasmid mediated quinolone resistance genes among 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates

No. of isolates (%)	PMQR gene						
	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>qepA</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>
30 (53.6)	-	-	-	-	-	-	-
13 (23.2)	+	-	-	-	-	-	-
7 (12.5)	-	-	-	+	-	-	-
5 (8.9)	+	-	-	+	-	-	-
1 (1.8)	+	-	-	-	-	-	+

Abbreviation: PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance.

Table 5. Patterns of FQ resistance determinants among 56 ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates according to ST

ST	No. of isolates (%)	Amino acid substitution			PMQR gene		
		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>aac-1b-cr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
131	10 (17.9)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	-	-	-
	8 (14.3)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	+	-	-
	4 (7.1)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	+	+	-
	4 (7.1)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	-	+	-
	2 (3.6)	S83L, D87N	S80I	L416F	-	-	-
	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	+	-	+
	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	+	-	-
	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-
1193	7 (12.5)	S83L, D87N	S80I	L416F	-	-	-
	3 (5.4)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-
	2 (3.6)	S83L, D87N	S80I	L416F	-	+	-
405	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	-	-	-
	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	L416F	-	-	-
	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	+	-
69	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I, E84V	-	+	-	-
93	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-
224	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-
648	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-
2003	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	+	-	-
2179	1 (1.8)	S83L	S80I	-	+	+	-
2599	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	+	-	-
4204	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	L416F	-	-	-
5150	1 (1.8)	S83L, D87N	S80I	-	-	-	-

Abbreviations: FQ, fluoroquinolone; ST, sequence type; PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance; S, serine; L, leucine; D, aspartic acid; N, asparagine; I, isoleucine; E, glutamic acid; V, valine; F, phenylalanine.

경에서 분리된 ESBL 생성 또는 ciprofloxacin 내성 *E. coli*에서 주요 클론으로 출현하고 있다[21, 25]. 본 연구결과에서 ST131 31균주 중 26균주(83.9%)는 *gyrA* 유전자에서 83번과 87번째 아미노산의 치환(S83L, D87N)과 *parC* 유전자에서 80번과 84번째 아미노산의 치환(S80I, E84V)이 확인되었는데, 이러한 결과는 이전 연구에서 *E. coli*의 FQ 내성을 유발하는 가장 빈번한 돌연변이로 보고되고 있다[7, 10]. 또한, ST131은 CTX-M-15, TEM-1, OXA-1, *aac(6)*-1b-cr과 같은 다양한 내성 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며[26], 본 연구에서도 *aac(6)*-1b-cr 유전자가 확인된 19균주 중 14균주(73.7%)가 ST131인 것을 확인하였다.

두 번째로 높은 비율을 차지한 ST1193은 56균주 중 13균주(23.2%)에서 확인되었다. 이와 유사하게, ST1193은 중국에서 FQ 내성 *E. coli* 클론 중 두 번째로 우세한 주요 클론으로 보고되고 있다[27]. 본 연구결과에서 ST1193 13균주 중 9균주(69.2%)는 *gyrA* 유전자에서 83번과 87번째 아미노산의 치환(S83L, D87N), *parC* 유전자에서 80번째 아미노산의 치환(S80I)과 *parE* 유전자에서 416번째 아미노산의 치환(L416F)이 우세하

게 확인되었다. 특히, *parE* 유전자에서 416번째 아미노산의 치환(L416F)은 56균주 중 13균주(23.2%)에서 확인되었고, 이 중 9균주(69.2%)가 ST1193로 확인되었는데, 이러한 결과는 앞서 2012년 네덜란드에서 발표한 논문에서 보고되었다[28]. 또한, 이전 연구에서 ST1193은 전반적인 항균제 내성율이 다른 클론에 비해 현저히 낮은 결과를 보이고, extended spectrum beta-lactamase (ESBL)과 PMQR 결정인자가 거의 확인되지 않은 결과를 보고하였는데[25], 본 연구결과에서도 ST1193 13균주 중 11균주(84.6%)에서 PMQR 유전자가 확인되지 않아 유사한 결과를 보였다.

본 연구에서 세 번째로 높은 비율을 차지한 ST405는 56균주 중 3균주(5.4%)에서 확인되었으나, FQ 내성 결정인자 분석 결과는 3균주 모두 각각 다른 결과를 보였다. Kim 등[25]이 발표한 이전 연구에서, ciprofloxacin 내성 *E. coli* 122균주 중 ST405는 10균주(8.2%)가 확인되었으나, 이 중 PMQR 유전자가 한 균주에서도 확인되지 않은 반면, 본 연구에서는 ST405 3균주 중 2균주에서 각각 *aac(6)*-1b-cr 유전자와 *qnrB* 유전자가 확인되었다. 또한, 2015년 사우디아라비아에서 발표한

Alghoribi MF 등의 연구에서 ST405와 FQ 내성과의 높은 연관성에 대해 보고하였다[29]. ST405는 ST131과 유사하게 *bla*_{CTX-M}, *bla*_{NDM} 및 병독성 유전자를 운반하는 ESBL 생성 또는 다제내성균으로 알려져 있으며, 장외 병원성 *E. coli* (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)로써 주로 요로성 패혈증의 원인균으로 보고되고 있다[30].

앞서 2020년 우리나라에서 발표한 연구 결과[25], ciprofloxacin 내성 *E. coli*의 주요 클론으로 ST131, ST393, ST1193, ST38, ST405가 확인되었으나, 본 연구 결과에서 전체 균주의 83.9%를 차지한 ST131, ST1193, ST405가 우세하게 확인되었다. 그 밖에 9개의 ST에 대한 각 1균주의 FQ 내성 결정인자 결과가 확인되었으나, 균주 수가 작아, 특정 ST에 대한 FQ 내성 결정인자의 특징을 분석하기 어려운 한계를 확인하였다.

이러한 결과를 토대로, 본 연구에서는 최근 우리나라의 대전 지역에서 유행하고 있는 ciprofloxacin 내성 *E. coli*의 주요 클론과 그에 따른 FQ 내성 결정인자의 특징을 확인하였다. 전 세계적으로 FQ 계열 항균제의 과도한 처방과 지속적인 사용량 증가로 인해 FQ 내성 *E. coli*의 출현과 확산이 증가하고 있는 가운데, 유행하고 있는 FQ 내성 *E. coli* 클론의 지속적인 감시와 FQ 내성 결정인자에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요약

전 세계적으로 fluoroquinolone (FQ) 내성 그람 음성균이 출현하고 있는 가운데, 최근 우리나라에서 FQ 내성 *E. coli*의 증가 추세는 심각한 우려를 낳고 있다. 이에 본 연구에서는 2018년 6월부터 12월까지 대전지역의 3차 병원에서 분리된 ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주를 대상으로, 역학관계와 FQ 내성 결정인자의 양상을 조사하였다. 역학관계를 확인하기 위해 multilocus sequence typing (MLST)을 실시하였다. PCR과 염기서열 분석은 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자의 QRDR에서 염색체상의 돌연변이와 *aac*(δ)-*Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* 및 *qnrS*와 같은 PMQR 유전자의 빈도를 확인하였다. MLST 분석 결과, 12개의 ST를 확인하였으며, 이 중 가장 우세한 ST는 ST131 (31/56, 55.4%)이었고, 순차적으로 ST1193 (13/56, 23.2%), ST405 (3/56, 5.4%)의 결과를 보였다. ciprofloxacin 내성 *E. coli* 56균주 중 *gyrA* 유전자에서 83번째 아미노산인 serine (S)이 leucine (L)으로, 87번째 아미노산인 aspartic acid (D)가 asparagine (N)으로 치환되고, *parC* 유전자에서 80번째 아미노산인 serine (S)이

isoleucine (I)으로, 84번째 아미노산인 glutamic acid (E)가 valine (V)으로 치환된 결과(29/56, 51.8%)가 가장 빈번하게 확인되었고, *aac*(δ)-*Ib-cr* (19/56, 33.9%)은 가장 흔한 PMQR 유전자로 확인되었다. 이러한 FQ 내성 결정인자의 결과는 다른 클론과 비교하여 ST131에서 더 빈번하게 확인되었다. ciprofloxacin 내성 *E. coli* 균주에 대한 역학적 특성의 지속적인 모니터링과 FQ 내성 결정인자에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements: This paper was supported by academic research fund offered from Daejeon Institute of Science and Technology in 2021.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Cho HH, Professor.

REFERENCES

1. Moreira da Silva RCR, de Oliveira Martins Júnior P, Gonçalves LF, de Paulo Martins V, de Melo ABF, Pitondo-Silva A, et al. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasilia, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;9:61-67. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.009>
2. Daoud N, Hamdoun M, Hannachi H, Gharsallah C, Mallekh W, Bahri O. Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* among tunisian outpatients with community-acquired urinary tract infection (2012-2018). *Curr Urol*. 2020;14:200-205. <https://doi.org/10.1159/000499238>
3. Ko WC, Hsueh PR. Increasing extended-spectrum beta-lactamase production and quinolone resistance among gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections in the Asia/Pacific region: data from the smart study 2002-2006. *J Infect*. 2009;59:95-103. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.06.003>
4. Aoiike 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>
5. Drlica K, Hiroshi H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem*. 2009;9:981-998. <https://doi.org/10.2174/156802609789630947>
6. Becnel Boyd L, Maynard MJ, Morgan-Linnell SK, Horton LB, Sucgang R, Hamill RJ, et al. Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:229-234. <https://doi.org/10.1128/AAC.00722-08>
7. Onseadaeng S, Rattawongjirakul P. Rapid detection of genomic mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Escherichia coli* by multi-

- plex allele specific polymerase chain reaction. *J Clin Lab Anal.* 2016;30:947-955. <https://doi.org/10.1002/jcla.21961>
8. Minarini L, Darini A. Mutations in the quinolone resistance determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 2012;43:1309-1314. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000010>
 9. Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT, et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:126-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.004>
 10. Bansala S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:253-255. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.022>
 11. Poirer L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2018;6:4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
 12. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:639-645. <https://doi.org/10.1128/AAC.01051-08>
 13. Zurfluh K, Abgottsporn H, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PLoS One.* 2014;9:e95864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095864>
 14. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.* 2016;29:13-29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.001>
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
 16. Cho HH. Comparative analysis of uropathogenic *Escherichia coli* ST131 and non-ST131 isolated from urinary tract infection patients in Daejeon. *Korean J Clin Lab Sci.* 2020;52:342-348. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2020.52.4.342>
 17. Fendukly F, Karlsson I, Hanson HS, Kronvall G, Dornbusch K. Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS.* 2003;111:857-866. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110904.x>
 18. 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;50:3953-3955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>
 19. Karczmarczyk M, Martins M, McCusker M, Mattar S, Amaral L, Leonard N, et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a *qnrB19*-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;313:10-19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02119.x>
 20. Ko KS, Suh JY, Peck KR, Lee MY, Oh WS, Kwon KT, et al. In vitro activity of fosfomicin against ciprofloxacin-resistant or extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from urine and blood. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58:111-115. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.015>
 21. Lee MY, Choi HJ, Choi JY, Song M, Song Y, Kim SW, et al. Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. *J Infect.* 2010;60:146-53. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.004>
 22. Fasugba O, Gardner A, Mitchell BG, Mnatzaganian G. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis.* 2015;15:545. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1282-4>
 23. Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2605-2612. <https://doi.org/10.1128/JCM.00640-08>
 24. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:72-79. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn463>
 25. Kim B, Seo MR, Kim J, Kim Y, Wie SH, Ki M, et al. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Korea. *Infect Chemother.* 2020;52:194-203. <https://doi.org/10.3947/ic.2020.52.2.194>
 26. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1-14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq415>
 27. 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>
 28. 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>
 29. Alghoribi MF, Gibreel TM, Farnham G, Al Johani SM, Balkhy HH, Upton M. Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic *Escherichia coli* clones in Riyadh, Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2752-2762. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv188>
 30. Roy Chowdhury P, McKinnon J, Liu M, Djordjevic SP. Multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST405 with a novel, composite IS26 transposon in a unique chromosomal location. *Front Microbiol.* 2019;9:3212. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03212>