

*Streptococcus parauberis*의 퀴놀론 내성 증가와 Topoisomerase 유전자에서의 돌연변이 신속 분석

김소연 · 김영철¹ · 정서경¹ · 전려진² · 진지웅¹ · 정현도^{1*}

국립수산물품질관리원, ¹부경대학교 수산생명의학과, ²제주대학교 해양의생명과학부

Increased Resistance to Quinolones in *Streptococcus parauberis* and Development of a Rapid Assay for Detecting Mutations in Topoisomerase Genes

So Yeon Kim, Young Chul Kim¹, Seo Kyung Jeong¹, Lyu Jin Jun², Ji Woong Jin¹ and Hyun Do Jeong^{1*}

National Fishery Products Quality Management Service, Goyang 410-315, Korea

¹Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju-do 690-756, Korea

To investigate the acquisition of quinolone resistance, we examined mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of type II topoisomerase genes in ciprofloxacin (CIP)-resistant clinical isolates and *in vitro* mutants of *Streptococcus parauberis*. The CIP-resistant clinical isolates had one base change responsible for a Ser-79→Thr in the QRDR of *parC*. However, the CIP-resistant *in vitro* mutants had an altered QRDR of *parC* (Ser-79→Ile) that differed from that of the isolates. None of the CIP-resistant *S. parauberis* clinical isolates or *in vitro* mutants exhibited amino acid changes in *gyrA* or *gyrB*. However, even though involvement in the increased resistance was not clear, an Arg-449→Ser mutation outside of the QRDR of *parE* was detected in CIP-resistant mutant 2P1. These results suggest that the topoisomerase IV gene, *parC* (and possibly *parE*, as well), is the primary ciprofloxacin target in *S. parauberis*. Additionally we established a high-resolution melting (HRM) assay capable of detecting the dominant mutation in four type II topoisomerase genes conferring ciprofloxacin resistance. These rapid and reliable assays may provide a convenient method of surveillance for genetic mutations conferring antibiotic resistance.

Key words : Fish disease, Mutation, quinolone resistance-determining region, *S. parauberis*, High-resolution melting

서론

양식 넙치에서 주로 발생하는 연쇄구균증은 매년 반복적으로 출현하며, 특히 *Edwardsiella tarda* 등과의 혼합 감염이 빈번하여 우리나라의 양식 산업에 큰 피해를 주고 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2003). 넙치를 비롯한 해산 양식 어류의 연쇄구균증 주요 원인균으로 *Streptococcus parauberis*, *S. iniae*, *Lactococcus garvieae*가 관여하는 것으로 보고되었으며(Baeck et al., 2006), 최근에는 특히 *S. parauberis*의 검출 빈도가 뚜렷하게 증가하고 있다. 이러한 연쇄구균증의 치료를 위하여 양식

현장에서는 많은 양의 항생제가 사용되고 있으며, 더구나 새로운 돌연변이체에 의한 어병 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도가 현재 점차 증가추세에 있다. 현재 현장에서 사용되는 quinolone계 항생제는 nalidixic acid, oxolinic acid 그리고 fluoroquinolone 계로 분류할 수 있는 ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, pefloxacin 등을 포함 하고 있다.

Quinolones는 주로 세균의 DNA 합성에 필요한 효소인 DNA gyrase (topoisomerase II)와 topoisomerase IV의 작용을 억제하여 DNA 복제를 저해함으로써 항균작용을 나타내며(Gellert et al., 1976), DNA gyrase 는 DNA 복제, 재조합, 전사에 필수적

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0247>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(3) 247-254, June 2014

Received 14 May 2014; Revised 5 June 2014; Accepted 12 June 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5941 Fax: +82. 51. 629. 5938

E-mail address: jeonghd@pknu.ac.kr

인 효소로써 DNA 복제 시 DNA의 ATP-dependent negative supercoiling을 촉매하며 *gyrA*와 *gyrB* subunit으로 구성된다. Topoisomerase IV는 염색체 복제의 마지막 단계에서 염색체를 분리하는데 필수적인 성분으로 DNA decatenating 및 relaxing activity를 나타내며 *gyrA*와 *gyrB*에 상응하는 *parC*와 *parE* subunit으로 구성된다(Drlica and Zhao, 1997).

이러한 quinolone계 항생제에 내성을 보이게 되는 기전은 DNA gyrase 유전자인 *gyrA*와 *gyrB* 상의 염기변이, topoisomerase IV의 일부인 *parC*, *parE* 상의 염기 변이, 특히 관련 4개 유전자 각각에서 가장 중요한 부위이며 quinolone 내성 결정 부위인 quinolone resistance-determining region (QRDR)에서의 변이가 가장 중요한 요소로서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Pidcock, 1999; Tanaka et al., 2000).

High-resolution melting (HRM)기법은 PCR 수행 중 생성되는 amplicon에 intercalating fluorescent dye를 결합시키고, 그 후 온도 상승을 통해 target 부위의 염기서열에 따라 각기 다르게 발생하는 fluorescence signal의 변화 특성을 분석하는 방

법이다(Kristensen and Dobrovic, 2008; Tajiri-Utagawa et al., 2008; Wittwer et al., 2003). 따라서 항생제 내성균의 내성 유전자에서 나타나는 mutation의 분석은 HRM 기법의 적용을 통해 보다 빠르고 손쉽게 확인할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 어류 양식현장에서 연쇄구균증 원인체로서 대부분을 차지하고 있는 *S. parauberis*의 quinolone에 대한 내성 정도를 현장에서 분리된 균주 및 *in vitro* 변이주를 사용하여 비교 분석 하였다. 또한 내성균주에서 나타나는 quinolone 내성 관련 유전자의 변이를 HRM 분석을 이용하여 효율적으로 규명할 수 있는 방법을 개발 하였다.

재료 및 방법

실험 균주

본 실험에서 사용된 21개의 *S. parauberis* 균주들은 1999년에서 2012년까지의 기간 동안 우리나라 여러 지역의 넙치, 돌돔을 비롯한 병어에서 전형적으로 연쇄구균병의 증상이 나타나는

Table 2. MICs of *S. parauberis* isolates to quinolone and various antibiotics

Strains	Sources	MIC (µg/mL)											
		Quinolones						Other antimicrobial agents					
		CIP ¹	ENR ²	NOR ³	PEF ⁴	OA ⁵	NA ⁶	Tc ⁷	Em ⁸	Amp ⁹	CM ¹⁰	KM ¹¹	PE ¹²
J14	flounder, Jeju, 1999	8	8	16	32	64	256	64	256	0.5	64	S ¹³	S
J15	flounder, Jeju, 1999	0.5	0.5	2	4	32	256	32	256	0.5	<2	S	S
J66	flounder, Pohang, 1999	0.25	0.25	1	2	8	128	16	<2	0.5	<2	S	S
K8	flounder, Ulsan, 2007	0.25	0.5	1	4	32	128	8	<2	0.25	<2	S	S
K14	rockfish, Pohang, 2007	0.5	0.5	2	8	32	128	16	<2	<0.125	<2	S	S
JE12	flounder, Jeju, 2006	0.5	0.25	0.5	2	32	256	8	<2	<0.125	<2	S	S
JE13	flounder, Jeju, 2006	0.5	0.5	2	4	32	128	64	256	0.5	64	S	S
1576	flounder, Jeju, 2006	0.5	0.5	1	4	32	128	16	<2	<0.125	<2	S	S
1584	flounder, Jeju, 2007	0.5	0.5	2	4	16	256	8	<2	<0.125	<2	S	S
1598	flounder, Jeju, 2007	4	1	8	8	8	256	64	256	0.5	2	S	R
12044	flounder, Jeju, 2012	0.5	0.5	2	4	64	128	64	256	0.5	64	S	S
12048	flounder, Jeju, 2012	0.5	0.5	2	4	32	256	32	<2	0.5	<2	S	S
12106	seawater, Busan, 2007	0.25	0.25	1	2	16	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12107	seawater, Busan, 2007	0.25	0.25	1	2	8	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12050	seawater, Busan, 2007	0.125	0.125	0.5	2	1	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12051	seawater, Busan, 2007	0.25	0.25	1	2	2	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12059	seawater, Busan, 2007	0.25	0.25	1	2	2	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12060	seawater, Busan, 2007	0.125	0.125	0.5	1	1	128	1	<2	<0.125	<2	S	S
12061	seawater, Busan, 2007	0.125	0.125	1	2	2	128	<1	<2	<0.125	<2	S	S
7001	seawater, Busan, 2011	0.5	0.5	1	4	1	64	1	<2	<0.125	<2	S	S
7002	seawater, Busan, 2011	0.25	0.25	1	2	1	64	1	<2	<0.125	<2	S	S

¹CIP : Ciprofloxacin, ²ENR : Enrofloxacin, ³NOR : Norfloxacin, ⁴PEF : Pefloxacin, ⁵OA : Oxonilic acid, ⁶NA : Nalidixic acid, ⁷Tc : Tetracycline, ⁸Em : Erythromycin, ⁹Amp : Ampicillin, ¹⁰CM : Chloramphenicol, ¹¹KM : Kanamycin, ¹²PE : Penicillin, ¹³S : susceptible

병어의 비장조직과 해수로부터 분리하였다(Table 2). 균의 분리 및 배양에는 1%의 NaCl을 첨가한 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, USA) 및 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco, USA)를 이용하였다. 병어의 조직과 해수는 TSA 및 BHIA에 접종하여 28°C에서 24-48시간동안 배양하였다. 이후 TSA 및 BHIA에서 순수 분리된 균은 형태학적 검사로써 colony 형태와 현미경 상에서의 균의 형태, 크기 및 운동성을 관찰 하여 간이 동정하였고, *S. parauberis*에 특이적인 primer를 사용해 PCR을 실시하여 추가적인 동정을 실시하였다(Table 1). 또한 실험 균의 보존을 위해 배양액에 20% glycerol (Sigma-Aldrich Korea, Korea)를 첨가한 후, -70°C에서 사용 전까지 보관하였다.

약제 감수성 시험

Quinolone 계 항생제 중 fluoroquinolone인 ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), norfloxacin (NOR) 그리고 pefloxacin (PEF) 4종 과 oxolinic acid (OA), nalidixic acid (NA) 2종, 그리고 비 quinolone 계 항생제로서 tetracycline (Tc), erythromycin (Em) ampicillin (Amp) chloramphenicol (CM) kanamycin (KM) 그리고 penicillin (PE) 6종(Sigma-Aldrich Korea, Korea)에 대한 *S. parauberis*의 내성 수준을 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)값을 broth dilution 법으로 측정하여 결정하였다(Gruson, 2005).

Total DNA 분리 및 PCR

Ciprofloxacin 내성 분리 균주를 대상으로 HiGene™ Genomic DNA prep kit For Bacteria (Biofact, Korea)를 사용해 제조사의 manual에 따라 total DNA 추출을 실시하였다. Topoisomerase 관련 유전자의 검출을 위한 PCR은 10× PCR buffer

2 μL, 200 μM의 각각의 dNTP, 1 μM의 sense primer와 anti-sense primer, Taq DNA polymerase (Cosmogentech, Korea) 및 DNA template 1 μL 를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20 μL가 되도록 하였다. 이때 사용한 primer set는 *gyrA*, *gyrB* 와 *parC*, *parE* 의 QRDR을 포함하는 부위를 target으로 하였으며 HRM 분석에서도 적절한 길이가 형성 될 수 있도록 PCR 산물의 크기가 약 200 bp가 되도록 primers를 제작하였다(Table 1). PCR혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 30 cycle수행한 후 72°C에서 7분간 post-extension시켰다.

Cloning 및 염기배열 결정

PCR 생성물은 Gene-all™ GEL SV elution kit (General biosystem, Korea)를 사용하여 agarose gel로부터 분리, 정제한 후 pGEM-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 제조사의 manual에 따라서 클로닝 시켰다. Competent cell (*E. coli* DH5α) 100 μL 와 혼합 하여 열충격에 의하여 transformation을 실시한 후 IPTG 1 mM, X-gal 40 μg/mL과 Amp 50 μg/mL이 첨가된 Luria-Bertani (LB, Difco, USA) agar 배지에 도말하여 흰색의 집락을 선택하여 Amp 50 μg/mL이 첨가된 LB broth배지에 배양 하였다. 배양액 1.5 mL로부터 Gene-all™ plasmid SV mini kit (General biosystem, Korea)를 사용하여 플라스미드를 분리하였다. 염기 서열 분석은 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분리된 플라스미드 내에 삽입된 염기 서열을

Table 1. Primers used in this study

Primers	Oligonucleotide sequences (5'→3')	Amplicon size	Objects	References
Spa 2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	718bp	Identification of <i>S. parauberis</i>	Mata et al., 2004
Spa 2870	GCTTCATATATCGCTATACT			
ACF	AATAGAAATTTTRRTKRAYG	2237bp	<i>gyrA</i> cloning	This study
ACR	AAYRTBACTGMDAAAAATGG			
BCF	CATGCGYGGMGGKAARTTYGGC	1511bp	<i>gyrB</i> cloning	This study
BCR	GAAMAYCGCTTRATGGCBCGT			
PA112	GGGTTGAAACCAGTTCATCG	219bp	HRM for <i>gyrA</i>	
PA331	CGGAAATTTTCGGTCTATGG			
PB1196	CACGTGAAGTAACGCGAAAG	204bp	HRM for <i>gyrB</i>	
PB1400	TAGTGTAGGTCGTTCAAGACC			
PC150	GGACGGCAATACCTTTGAGA	218bp	HRM for <i>parC</i>	This study
PC368	CGTTATACAGAGGCTCGCCT			
PE1257	GCCTGCCCAATCTAAGAATC	219bp	HRM for <i>parE</i>	
PE1476	GAGCTGGAGTTGGTGCTGAT			

밝힌 후, MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교분석하였다.

Quinolone 내성 *in vitro* mutant 제작

실험균주로는 보유 균주 중 ciprofloxacin을 포함한 다른 quinolone 계열 항생제들에 대해 가장 낮은 MIC를 보이는 *S. parvauberis* 7002 균주를 wild type으로 사용하였으며 항생제가 첨가된 Mueller Hinton (MH, Difco, USA) agar배지를 이용하여 항생제에 단계적으로 노출시켰다. 먼저 wild type의 균주를 MH broth에서 16-18시간 배양 후 각 plate당 MIC농도의 1-16 배의 ciprofloxacin이 첨가된 MH plate에 도말하였다. 집락이 나타나는 최고농도의 항생제 배지에서 5개의 집락을 분리하고 그 중 하나의 균주(1P1)를 MH broth에 배양하였다. 이러한 과정을 1st step mutant 분리로 하였다. MH broth에서 2-3회 계대 배양된 균주는 다음 단계인 2nd step mutant 분리에 사용하였다 (Fig. 1). 또한 3rd 그리고 4th step의 mutant 분리도 연속적으로 동일한 방법을 이용하여 실시하였다.

HRM 분석

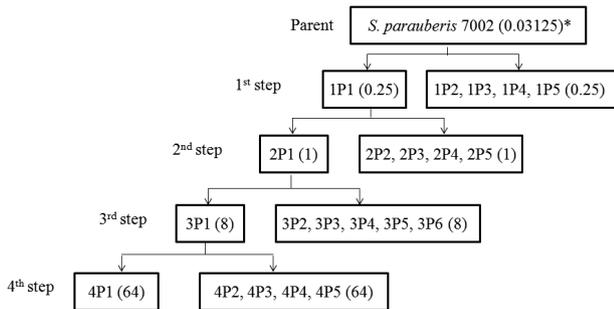


Fig. 1. Flow chart showing the relationships between *S. parvauberis* 7002 and its quinolone-resistant mutants. Quinolone-resistant mutants were prepared by screening colonies resistant to ciprofloxacin by culturing *S. parvauberis* 7002 on agar plate containing ciprofloxacin. The concentration of ciprofloxacin in the agar plates were increased from 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 1st step to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 4th step. * MIC of ciprofloxacin

HRM을 시행하기 위한 반응액에는 10 μL 의 MeltDoctor™ HRM Master Mix, 3.5 mM MgCl_2 , 5 μM 의 sense primer 와 5 μM 의 antisense primer, template (20 ng/ μL) 1 μL 를 첨가 후 distilled water로 최종액의 volume이 20 μL 가 되도록 했다. HRM 분석은 StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 사용하였고 아래와 같은 방법으로 실시 하였다.

먼저 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초 denaturation, 56 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초 extension의 반응을 45 cycles 수행하였다. 총 45 cycles 반응이 끝난 후 60-90 $^{\circ}\text{C}$ 에서 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 의 속도로 T_m (melting temperature) 값을 측정하였다. melting-curve 분석은 High-Resolution Melt Software (Ver. 3.0) (Applied Biosystems, USA)를 사용 하였다.

결 과

*S. parvauberis*의 내성 특성

1999년에서 2012년까지 분리된 *S. parvauberis*의 21개의 균주 중 2균주(10%)가 CIP에 대해 내성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 그러나 내성균 모두는 12 종의 현장 분리균에서 나타났으므로, 실제 현장 분리균에서의 내성균 비율은 17%로 나타났다. 현재 *S. pneumoniae*를 제외하고 다른 *Streptococcus* spp.에 대한 ciprofloxacin의 MIC 판독 기준은 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 및 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)에서도 확립된 바가 없다. *S. pneumoniae*의 경우 ciprofloxacin 내성에 대한 breakpoint를 EUCAST에서는 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로, CLSI는 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 규정하고 있다(EUCAST, 2011, CLSI, 2010). 따라서 현장 분리 quinolone 내성균의 판별은 CIP에 대한 MIC 값이 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상인 것으로 하였다. 또한 비록 현재까지 *S. parvauberis*의 OA에 대한 내성 기준에 대한 보고는 없지만, 현장 분리균에서 OA-MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 기준으로 내성균과 wild type 두 group으로 나눌 수 있었다(Table 2). 그러므로 OA-MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 기준으로 14종의 균주 중 67% 정도가 내성을 나타내었으며 특히 12 종의 현장 분리균 전부가 내성

Table 3. Mutations detected in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* of CIP-resistant clinical isolates of *S. parvauberis*

Strains	CIP MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>		<i>parC</i>		<i>parE</i>	
		Base change	Amino acid change	Base change	Amino acid change	Base change	Amino acid change	Base change	Amino acid change
J66	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
JE13	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
1598	4	-	-	-	-	G-236 [*] -C	Ser-79 ^{**} -Thr	-	-
J14	8	-	-	-	-	G-236-C	Ser-79-Thr	-	-

Residue numbers counted from the 5' end (*base) and N-terminal (**amino acid) residue respectively.

균으로 판명 되었다. OA는 수산 생물에의 사용이 허가된 수산 용 항균제 중 하나로서 이전부터 많이 사용 되어져 왔으므로 내성의 정도가 다소 높게 나타나는 것으로 보여지며, 이후 개발된 CIP는 OA에 비해 항균력이 더 높으며 누적 사용량 또한 적으므로 내성의 기준이 낮게 나타난 것으로 보여진다(Table 2). 뿐만 아니라 21개의 균주 중 현장 분리 균 12 개 균주 모두는 Tc에 대한 내성을, 5종의 균주는 Em, 그리고 Amp, Cm 등에 대한 내성도 나타내어 현장 분리균 모두는 다제 내성균으로 판명 되었다. 그러나 수중 생태계에서 발견 된 7 균주 모두는 사용된 항생제에 대하여 내성을 나타내지 않아 수권 환경이 아직까지는 안전한 상태에 있음을 추정 할 수 있었다.

S. parauberis의 topoisomerase 유전자 변화

현장 병어에서 분리 된 CIP 내성의 S. parauberis 중 MIC가 0.25-8 µg/mL 을 보이는 대표적인 4 개의 isolates를 임의로 선택하여 type II topoisomerase 관련 유전자인 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* gene 각각의 QRDR 부위를 target로 한 PCR을 실시 하였다. 생성된 amplicon을 pGEM-T Easy Vector에 cloning 하고 그 염기서열을 분석함으로써 내성 획득과 각 유전자에서의 mutation 특성 변화와의 상관 관계를 분석하였다.

선택 균주 4종 중 CIP-MIC가 4 µg/mL 이상으로 나타나는 2 개 내성균의 QRDR-*parC* 부위에서 Ser-79→Thr으로의 amino acid 변이를 관찰할 수 있었다. 그러나 *gyrA*, *gyrB*, 그리고 *parE* gene의 QRDR 부위의 염기 서열에서는 변이를 발견 할 수 없었다(Table 3). 또한 CIP-MIC가 0.5 µg/mL 이하를 보이는 현장 분리균 12044 및 K14의 topoisomerase 관련 유전자 모두에서도 QRDR 부위에서의 유전적 변화를 발견 할 수 없었다(data not shown).

CIP-resistant *in vitro* mutant 에서의 topoisomerase 유전자의 변화 분석

Wild type의 S. parauberis 7002를 CIP가 첨가된 MH agar에서 단계별로 총 4 단계를 거쳐 내성균을 유도하여 *in vitro* CIP-내성 mutant를 분리 하였다(Fig. 1). 단계별로 선택된 4종의 변이 내성균들(1P1, 2P1, 3P1 및 4P1)에 대한 CIP-MIC 분석 및 topoisomerase II 및 IV 유전자 각각에 대한 PCR을 실시하여

QRDR에 대한 염기 서열을 분석하였다(Table 4). 그 결과 두 번째 단계에서 CIP-MIC가 1 µg/mL 을 나타내는 mutant 2P1의 *gyrA* (C-242-T)와 *parE* (C-1345-A)의 nucleotide 변이가 검출되었다. 그러나 *gyrA*의 변이는 아미노산의 변이가 없는 Ser-81→Ser의 silent 변이였고, *parE*이 변이는 QRDR부위의 5' end 쪽에 있는 부위로서 Arg-449→Ser의 변화를 보여 주었다. 또한 세 번째 단계에서의 mutant 3P1은 *parC* 79번 부위에서 변이가 일어나 현장 분리 내성균(Ser-79→Thr)과 동일한 위치였으나 그 변이는 Ser-79→Ile으로 나타나 새로운 변이 형태를 보여 주었다. 3P1의 CIP-MIC는 8 µg/mL 를 나타내어 2P1의 MIC에 비하여 8배로 증가하는 명확한 내성 증가를 확인할 수 있었다.

HRM을 이용한 내성균의 mutation 분석

HRM 분석은 DNA 합성 시 염기가 결합할 때 생기는 녹는 점의 차이로 인하여 염기가 하나만 틀려도 signal이 다른 양상으로 나타나기 때문에 CIP-내성균의 topoisomerase 유전자의 QRDR 부위에서 나타나는 mutation을 검출하고 분석하는 목적에 활용 하였다. *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* gene에서 주요 변이가 나타나는 QRDR의 염기서열이 포함되도록 제작한 primer를 이용하여(Table 1), *in vitro* mutant를 test한 결과에서 변이가 나타난 *gyrA*, *parC*, *parE* gene이 변이가 일어나지 않은 균주와 구별되는 melting curve를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러므로 본 연구의 primers를 이용한 HRM 분석방법은 S. parauberis의 type II topoisomerase 를 encoding 하는 각 유전자들의 확인과 QRDR 에서의 변이 또한 비교 할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 1999년에서 2012년까지의 기간 동안, 우리나라 여러 지역의 낚치, 돌돔을 비롯한 병어로부터 연쇄구균증을 일으키는 원인균인 S. parauberis를 분리하였으며 이에 대해 quinolone의 내성을 조사하고 내성 획득의 원인을 규명하고자 하였다. 이전의 연구들에 따르면 연쇄구균증에 있어 S. iniae와 더불어 L. garvieae가 주요 원인체로 보고되어 왔다(Nakatsug-

Table 4. Mutations detected in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* of CIP-resistant mutants of S. parauberis selected *in vitro* conditions

Strains	CIP MIC (µg/mL)	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>		<i>parC</i>		<i>parE</i>	
		Base change	Amino acid change						
1P1	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
2P1	1	C-242-T	-	-	-	-	-	C-1345-A	Arg-449→Ser
3P1	8	C-242-T	-	-	-	G-236-T	Ser-79-Ile	C-1345-A	Arg-449-Ser
4P1	64	C-242-T	-	-	-	G-236-T	Ser-79-Ile	C-1345-A	Arg-449-Ser

Residue numbers counted from the 5' end (* base) and N-terminal (** amino acid) residue respectively.

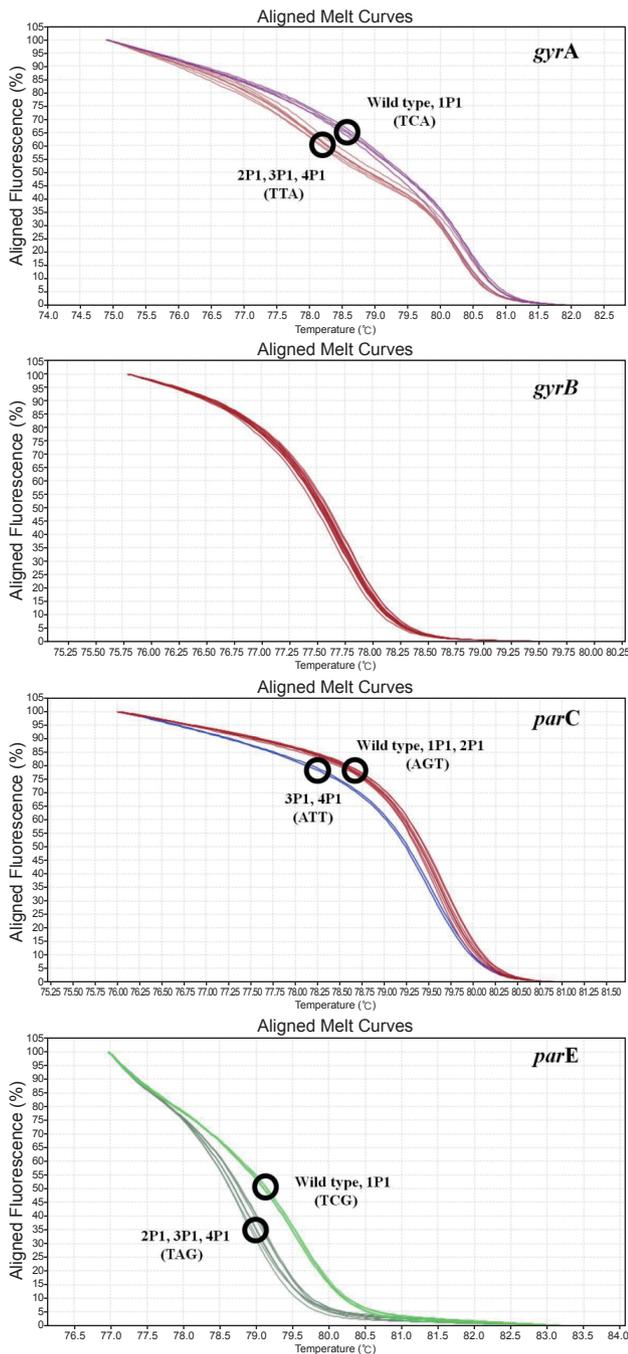


Fig. 2. Mutation screening of CIP-resistant *S. parvauberis* mutants using high-resolution melting (HRM) analysis.

awa, 1983, Heo et al., 2001). 그러나 최근에는 *S. parvauberis*가 몇 년간 검출 빈도가 뚜렷하게 증가하여 현재 가장 다수를 차지 하며, 우리나라에서 빈번히 연쇄구균을 발생시키는 원인체 로 보고되고 있다. 또한 그 발생 양상이 제주를 중심으로 우리나라 전역으로 확산되고 있어 피해가 심각한 것으로 알려져 있다

(Baeck et al., 2006).

DNA gyrase와 topoisomerase IV의 *gyrA*, *parC* 유전자에서 변이는 quinolone 내성기작에 우선적으로 중요한 요소이며, *gyrB*와 *parE* 역시 내성에 관여하는 요소이다(Pan and Fisher, 1998). 현재까지 *S. parvauberis*의 topoisomerase 관련 유전자에 대한 특성 분석은 이루어지지 않고 있다. 그리고 본 연구실에서 그람 양성균의 *gyrA*와 *gyrB*에서의 conserved region에 대한 degenerated primer (Table 1)를 사용하여 2237 bp와 1511 bp (GenBank number; GU324257.1와 GU324260.1)를 cloning 하였으나 Nho et al. (2011)의 *S. parvauberis* full sequence에 대한 특성 규명에서 *gyrA*와 *gyrB*로 추정·지정한 부위와의 염기 배열이 *gyrA*는 98.8%, *gyrB*는 99.3% 동일하였다. 그러므로 *parC*와 *parE*의 염기 배열도 본 연구의 isolates의 것들과 동일할 것으로 추정할 수 있어 이에 대한 유전자 cloning은 실시하지 않고 Nho et al. (2011)의 유전자 염기 배열을 사용하여 PCR primer를 제작하였다. 이러한 primer sets는 *S. parvauberis*의 DNA gyrase 및 topoisomerase IV 유전자들의 변이 특성 및 정도를 알아보기 위하여 각 유전자들의 QRDR의 염기 서열을 분석하기 위한 PCR과 HRM 분석에 사용하였다.

*S. pneumoniae*의 경우 *parC*의 Ser-79와 *gyrA*의 Gly-81, Ser-83의 아미노산 변이가 quinolone 내성의 가장 주요한 변이로 알려져 있다(Pan and Fisher, 1996). 이러한 보고를 바탕으로 현장에서 분리한 quinolone 내성 *S. parvauberis*의 *parC*와 *gyrA*를 포함한 QRDR 부위의 mutation을 분석한 결과 *parC*의 Ser-79 부위에서 Thr으로의 변이가 나타났으며, *parC* 이외의 *gyrA*, *gyrB*, *parE*의 QRDR부위에서는 다른 변이가 관찰되지 않았다.

이러한 변이에 대한 분석과 함께 *in vitro* 상에서 quinolone에 대해 내성균을 유도하는 실험을 실시하였다. Wild type인 7002를 ciprofloxacin이 첨가된 MH 배지에 단계적으로 노출시킴으로써 실험적으로 유전자들의 변이를 유도하는 실험으로 각각 총 4 단계를 거쳐 mutant를 제작하였다. 각 단계별로 5 균주를 임의적으로 선택하여 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* gene의 아미노산 변이를 분석한 결과(Table 4), 먼저 2번째 단계에서 *parE* (Arg-449→Ser)의 변이가 나타나고, MIC 값은 4배로 증가하였다. 가장 quinolone 내성에 변화를 많이 나타내는 것으로 알려진 *gyrA*에서의 변이는 nucleotide의 변이는 있었지만 아미노산 변이는 나타나지 않았고 이는 silent mutation으로서 ciprofloxacin에 대한 내성의 증가는 *gyrA*와는 큰 연관성이 없을 것으로 보여진다. *parE*의 경우 그 위치에 있어 QRDR region의 mutation hot point에서 벗어났으며 *Mycoplasma pneumoniae*를 제외한 다른 균주에서 보고된 적이 없다(Gruson et al., 2005). 또한 *parE* 자체가 일반적으로 quinolone 내성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고되어 왔으므로 큰 의미를 가지지 않을 것으로 생각되지만 이에 대해서는 이후 깊이 있는 연구가 이루어져야 할 것이다. 따라서 *S. parvauberis*의 quinolone 내성은 세 번째 단계에서 나타난 *parC* (Ser-79→Ile)의 변이가 오히려 중요

한 영향을 미칠 수 있었을 것으로 추정한다. 즉, 이러한 결과는 quinolone의 내성에 있어서 *E. coli*를 포함한 그람 음성균에서는 DNA gyrase가 첫 번째 target이 되지만, *Streptococcus*와 같은 그람 양성균에서는 오히려 topoisomerase IV가 첫 번째 target이 되어, DNA gyrase에서의 변이 보다는 *parC*나 *parE*에서의 변이가 내성 증가에 우선적으로 영향을 미친다는 보고와 일치한다(Pan and Fisher, 1998). 다만 *S. pneumoniae*와 *S. suis* 등을 포함한 여러 *Streptococcus*에서 *parC*의 79번 아미노산이 내성 획득에 관여함이 보고되어 왔으나(Pan and Fisher, 1996; Escudero et al., 2007), 아직 *parE*의 변이가 첫 번째의 target이 된다는 보고는 없었으므로 이에 대한 명확한 규명이 필요할 것으로 보인다. 더불어 현장 분리균에서 나타난 Ser-79→Thr 변화 보다는 *in vitro* mutants에서 나타난 Ser-79→Ile의 변화가 보다 높은 수준의 내성을 나타내어 QRDR 부위 hydrophobicity 증가가 *S. parauberis*의 내성 수준을 더욱 높게 하는 중요한 요소가 될 수 있는 가능성을 제시하고 있다고 생각 한다. 또한 4P1이 3P1과 동일한 *parC* 변이를 나타내었으나 4P1의 Ciprofloxacin에 대한 MIC 값은 8배 이상 증가하는 것으로 나타나, quinolone계 항생제에 대한 내성증가는 topoisomerase IV 뿐만 아니라 또 다른 quinolone 내성 발생기작인 efflux pump, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) 그리고 균의 생리적 변화 등도 함께 영향을 미칠 수 있음을 보여주고 있다.

HRM 분석은 *M. pneumoniae*의 mutation에 의한 macrolide 내성을 확인하는데 유용하게 사용되었다는 보고가 있었으나(Wolff et al., 2008), DNA gyrase 또는 topoisomerase 유전자 변이 분석에 적용한 연구는 지금까지 보고되지 않았다. 본 연구에서는 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*의 QRDR 부위에서 변이가 일어나는 염기서열이 포함되도록 primer를 만들어 HRM 분석에 이용하였다. 그 결과 변이를 보이는 균과 변이를 보이지 않는 균의 염기서열과는 다른 HRM signal 양상을 보여 wild type과 mutation type이 정확하게 구별 가능하였다(Fig. 2). 그러므로 QRDR에서의 유전자변이를 HRM으로 screening하는 방법은 현장에서 많은 수의 quinolone 내성 isolates를 분석하여야 하는 경우 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*에서 나타나는 QRDR의 변이를 빠르고 효율적으로 규명 할 수 있는 편리한 방법이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 연쇄구균종의 주요 원인균인 *S. parauberis*의 quinolone 내성 획득에는 *parC*의 우선적 관여와 함께 *parE*의 관여 가능성까지도 제시하였다. 그리고 HRM을 이용하여 type II topoisomerase 유전자인 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 그리고 *parE*의 변이를 간단하고 효율적으로 파악할 수 있게 하였다.

사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다 (2013054773).

References

- Baeck GW, Kim JH, Gomez DK and Park SC. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. J Vet Sci 7, 53-58.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement, Document M100-S20. Retrieved from <http://f3.tiera.ru/1/genesis/575-579/575000/11b141afb f83788d000b56139415f744> on January 1.
- Drlica K and Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev 61, 377-392.
- Escudero JA, Millan AS, Catalan A, de la Campa AG, Rivero E, Lopez G, Dominguez L, Moreno MA and Gonzalez-Zorn B. 2007. Fish Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus suis*. Antimicrob Agents Chemother 51, 777-782.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2011. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 1.3. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf on January 5.
- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH and Nash HA. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc Natl Acad Sci USA 73, 3872-3876.
- Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Be'be'ar C and Be'be'ar CM. 2005. *In vitro* development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. Antimicrob Agents Chemother 59 1190-1193.
- Heo MS, Song CB, Lee JH, Yeo IK, Jeon YJ, Lee JJ, Chung SC, Lee KW, Rho S, Choi KS and Lee YD. 2001. Characteristics of β -*Streptococcus* spp. Isolated in Cultured Flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju Island. J Kor Fish Soc 34, 365-369.
- Kim JH, Yim DH, Lee CH, Lee SJ, Lee WL, Hwang MH and Kim EH. 2003. Multiple drug resistance and transferable R plasmid of *Streptococci* isolated from diseased olive flounder. J Fish Pathol 16, 61-68.
- Kristensen LS and Dobrovic A. 2008. Direct genotyping of single nucleotide polymorphisms in methyl metabolism genes using probe-free high-resolution melting analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17, 1240-1247. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2531>.
- Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Domínguez L and Fernández-Garayza'bal JF. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. Appl Environ Microbiol 70, 3183-3187.
- Nakatsugawa T. 1983. A streptococcal disease of cultured floun-

- der. Fish Pathol 17, 281-285.
- Nho SW, Hikima J, Cha IS, Park SB, Jang HB, del Castillo CS, Kondo H, Hirono I, Aoki T and Jung TS. 2011. Complete genome sequence and immunoproteomic analyses of the bacterial fish pathogen *Streptococcus parauberis*. J Bacteriol 193, 3356-3366.
- Pan XS and Fisher LM. 1996. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. J Bacteriol 178, 4060-4069.
- Pan XS and Fisher LM. 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 42, 2810-2816.
- Piddock LJ. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. Drugs 58, 11-18.
- Tajiri-Utagawa E, Hara M, Takahashi K, Watanabe M and Wakita T. 2008. Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses. J Clin Microbiol 47, 435-440. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01247-08>.
- Tanaka M, Wang T, Onodera Y, Uchida Y and Sato K. 2000. Mechanisms of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. J Infect Chemother 6, 131-139.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG and Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Am Assoc Clin Chem 49, 853-860.
- Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB and Winchell JM. 2008. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. Antimicrob. Agents Chemother 52, 3542-3549.