

서울시내 시판 식육에서 분리한 대장균의 퀴놀론계 항생제 내성 기전 분석

박지민 · 최성숙*·#

삼육대학교 동물생명공학과, *삼육대학교 약학대학

(Received October 1, 2015; Revised November 19, 2015; Accepted November 23, 2015)

Molecular Characterization of Quinolone Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Retail Meat in Seoul

Ji Min Park and Sung Sook Choi*·#

Department of Animal Biotechnology, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

*College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract — The aim of this study was to investigate the prevalence of quinolone resistant *E. coli* from retail meat and to characterize the resistant determinants. Determination of minimum inhibitory concentration, the sequence analysis of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* quinolone resistance determining regions (QRDR), the presences of plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) and the expression of efflux pump genes were investigated. Of the total 277 retail meat samples, 67 coli form bacteria were isolated. 15 of 67 isolates showed nalidixic acid resistance and 7 of 15 nalidixic acid resistant isolates were also resistant to ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin. 11 of 15 nalidixic acid resistant strains were isolated from chicken, 2 of 15 were isolated from beef and 2 of 15 were isolated from pork samples. 11 of 15 nalidixic acid resistant strains have single mutation at codon 87 (D87N or D87G) in *gyrA*, 2 of 11 *gyrA* mutants have double mutations at codon 86 and 87 (L86A and L87I) in *parC* with mutations at codon 434+445+465 or 429 in *gyrB*. 2 of 15 resistant isolates harbored *qnrS*, a PMQR determinant. Over expression of the *acrB* gene, efflux pump gene (3.93~16.53 fold), was observed in 10 of 15 resistant isolates.

Keywords □ quinolone resistant, *E. coli*, retail meat, QRDR, PMQR, *acrB*

퀴놀론 항생제는 페니실린 등의 베타락탐계열의 항생제와 더불어 가장 많이 사용되고 있는 항생제로서 사람 및 동물의 질병의 치료뿐 아니라 식육동물의 질병 예방 목적으로 축산분야에서 널리 사용되고 있는 항생제이다.¹⁾ 우리나라에서는 ciprofloxacin 과 enrofloxacin이 축산분야에서 주로 사용되고 있으며²⁾ 항생제 사용에 따른 내성균의 출현 증가와 축산물을 통한 내성균 또는 내성 인자의 사람으로의 전달에 따른 질병 치료의 어려움은 공중보건학적으로 매우 중요하게 부각되고 있다.³⁾ 퀴놀론 항생제 내성은 이 약제의 표적부위인 DNA gyrase와 topoisomerase IV 유전자의 일부인 퀴놀론 내성 결정부위(quinolone resistance

determinant region, QRDR)의 점돌연변이에 의한 내성기전,⁴⁾ 세포막 단백질인 porin의 구조변화 또는 능동적 약물 유출 펌프(active efflux pump)에 의한 기전^{5,6)} 및 plasmid상에 존재하는 내성 유전자(plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)에 의한 내성 기전이 알려져 있다.⁷⁾ 대장균을 포함한 장내세균에서 PMQR의 존재는 임상분리균 에서 처음 알려지기 시작하였으나 최근에는 그 기원이 환자 외에도 동물, 식품, 환경 등 매우 다양해지고 있으며 그 분포비율도 점차 증가하고 있는 추세이다^{7,8)}. 플라스미드에 위치한 퀴놀론 내성에 관여하는 유전자는 Qnr 그룹에 속하는 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*와 항생제의 변형에 관여하는 *aac(6)-Ib-cr* 및 active efflux pump 유전자인 *qepA* 등이 알려져 있다.^{7,9)} PMQR에 기인한 내성은 내성인자가 한 균주에서 다른 균주로 전달될 수 있다는 점에서 중요하다.¹⁰⁾ 대장균에 대한 퀴놀론 항생제 내성연구는 임상분리균주 뿐 아니라^{11,12)} 환경이나 식품 등에서 유래한 대장균에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있

#Corresponding Author

Sung Sook Choi

College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Tel.: 02-3399-1606 Fax.: 02-3399-1617

E-mail: sschoi@syu.ac.kr

다.^{13,14)} 이는 최근 다양한 기원의 항생제 내성균이 증가하고 있으며 축산에서 사용하는 것과 동일한 항생제가 사람에서도 사용되고 있어 동물유래 항생제 내성균이 가축, 축산물, 환경 등을 통해 사람으로 전달될 경우, 적절한 치료제 부재의 심각한 문제가 대두될 수 있기 때문에 사료된다. 따라서 본 연구진은 2014년 5월부터 2015년 1월까지 서울시내에서 시판되는 식육(소고기, 돼지고기 및 닭고기)을 대상으로 대장균군 세균을 분리하고 이중 퀴놀론 항생제 내성 대장균을 분리하고 내성 유전자를 분석하여 서울시내 시판 식육에 존재하는 대장균의 퀴놀론 항생제 내성기전을 규명하여 사람 및 동물에 모두 중요한 우선 관리대상 항생제인 퀴놀론 항생제의 내성 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다.

실험 방법

식육 시료의 수집, 대장균군 세균의 분리 및 동정

2014년 5월부터 2015년 1월까지 시료의 다양성을 고려하여 서울시내 25개 구에 위치한 대형마트, 재래시장 및 백화점 등에서 소고기 시료 142개, 돼지고기 시료 106개 및 닭고기 시료 29개 등 총 277개의 식육시료를 구입하여 실험에 사용하였으며 구입 후 즉시 냉장 운반하여 균 분리를 위한 실험을 수행하였다. 동일 상표 제품의 경우는 지리적으로 다른 곳이라도 중복 사용하지 않는 것을 원칙으로 하였다. 균의 분리는 각 식육 1g에 증균 배지인 EC broth(Oxoid, Cambridge, CB5 8BZ, UK) 9 ml를 가하여 37°C에서 15~18시간 증균 배양 후 이 배양액을 대장균 감별 배지인 EMB agar(Difco, Sparks, MD, USA)에 직접 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 녹색의 금속성 광택을 띄는 집락을 식육 시료 당 하나씩 선택하여 보통 한천배지에 순수 배양 후, 그람 염색, 생화학적 성상시험을 실시하였으며 최종적으로 nalidixic acid 내성균으로 확인된 균은 16S rRNA 염기서열을 확인하는 방법으로 대장균(*Escherichia coli*) 동정을 실시하였다.

최소저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

분리한 대장균군 세균을 대상으로 nalidixic acid(NAL, Sigma Co. St. Louis, MO, USA), ciprofloxacin(CIP, Korea United Pharm. Inc.), levofloxacin(LEV, KukJe Pharm. Corp) 및 moxifloxacin(MOX, Chong Kun Dang Pharm. Corp)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI, USA)의 고체배지 희석법¹⁵⁾ 실시하였으며 배지는 Mueller-Hinton 배지(Difco, Sparks, MD, USA)를 사용하였다. 항생제의 최고 농도는 64 µg/ml 농도로 하여 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최저 농도가 0.03 µg/ml 되도록 항생물질 희석 계열을 만들어 항생제 배지를 조제하였다.

하룻밤 전 배양한 균액을 10⁶ CFU/ml 되도록 희석한 후 5 µl씩 항생제 배지에 접종하여 37°C에서 16~20시간 배양하고 균의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소저지농도(MIC)로 결정하였으며 내성의 기준은 CLSI의 breakpoint 기준에¹⁵⁾ 따라 결정하였다. 정도 관리를 위한 표준 균주로는 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

퀴놀론 항생제 내성 유전자의 확인 및 DNA 염기서열 분석

대장균의 DNA는 GeneAll Cell SV kit(진올바이오테크놀로지, 서울)을 이용하여 분리하였으며 분석을 실시한 내성 관련 유전자로는 염색체 QRDR 영역의 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*와 플라스미드에 있는 PMQR 유전자 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* 및 *qepA*를 목적 유전자로 하였다. 실험에 사용한 primer는 제노텍(Genotech, 대전)에서 합성하여 사용하였으며 염기서열은 Table I에 나타내었다. PCR 반응은 AccuPowerTM premix(Bioneer, 대전)를 사용하여 실시하였으며 염색체 상에 위치한 QRDR 영역의 DNA 염기서열은 PCR 반응을 실시한 후 정제하여 제노텍(Genotec, 대전)에 의뢰하여 염기서열을 결정하고 PubMed에서 제공되는 nucleotide blast를 이용하여 *E. coli* K12 균주를 기준으로 염기서열을 비교 분석하였다. PMQR 존재 여부를 결정하기 위한 양성 대조 유전자로는 가톨릭대학교 의정부 성모병원 진단의학과에서 제공받은 해당 PMQR 유전자를 사용하였으며 PCR 반응 후 전기영동을 실시하여 양성 대조 유전자의 PCR 산물과 크기를 비교 후 해당 크기의 PCR 산물을 정제하여 제노텍(Genotec, 대전)에 의뢰하여 염기서열을 결정하고 PubMed에서 제공되는 nucleotide blast를 이용하여 염기서열을 비교 분석하였다.

항생제 유출 펌프

항생제 감수성 지표인 MIC 값이 efflux pump inhibitor에 의해 낮아지는지를 확인하고자 하였다. 대표적인 펌프 억제제인 phenylalanine-arginine-β-naphthylamide(PAβN; Sigma Co. St. Louis, USA)를 100 µg/ml¹⁶⁾ 농도로 함유한 CIP 항생제 배지와 PAβN을 함유하지 않은 배지에서 각각 MIC를 측정하고 MIC 값이 4배 이상 낮아지는 경우 유출펌프가 작동되고 있는 것으로 판단하였다.

약물유출펌프 유전자 발현

약물유출펌프 유전자인 *acrB*와 porin 유전자인 *ompF*의 발현을 비교하여 퀴놀론 내성 기전에 약물유출 펌프의 과발현이 기여하고 있음을 확인하고자 하였다.¹⁷⁾ 각 유전자 발현의 비교는 qRT-PCR법으로 하였고, 각 유전자 증폭에 사용한 primer는 제노텍(Genotech, 대전)에서 합성하여 사용하였으며 염기서열은 Table I에 나타내었다. RNA 분리를 위해 하룻밤 전 배양한 대장

Table I – Primers sequences that used for this experiment

Target gene		Sequences (5-3)	Size (bp)	Annealing temp. (°C)	Reference
<i>gyrA</i>	F	TGTCGAGATGGCCTGAAGC	470	52	30
	R	CGTTGATGACTTCCGTCAG			
<i>gyrB</i>	F	AAGCGGATGGCAAAGAAG	711	58	30
	R	AACGGTCTGCTCATCAGAAAGG			
<i>parC</i>	F	TGTATGCGATGTCTGAACTG	265	55	16
	R	CTCAATAGCAGCTCGGAATA			
<i>parE</i>	F	CCGTATGCGTGC GGCCAAA	641	58	16
	R	CGATAGTCAACTGCACCAGAC			
<i>qnrA</i>	F	ATTCTCACGCCAGGATTTG	574	55	31
	R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
<i>qnrB</i>	F	CGACCTKAGCGCAGTGAAT	513	55	31
	R	GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG			
<i>qnrS</i>	F	ACTGCAAGTTCATTGAACAG	431	53	31
	R	GATCTAAACCGTCGAGTTTCG			
<i>qepA</i>	F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596	58	32
	R	GTCTACGCCATGGACCTCAC			
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	53	32
	R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
16S rRNA	F	GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG	243	60	17
	R	AACCGCTGGCAACAAGGATAAGG			
<i>acrB</i>	F	CGTACACAGAAAGTGCTCAA	183	60	18
	R	CGCTTCAACTTTGTTTTCTT			
<i>ompF</i>	F	GAACCTCGCTGTTTCAGTACC	209	60	18
	R	CGTACTTCAGACCAGTAGCC			

균액 100 µl를 Luria-Bertani(LB) 배지(Difco, Detroit, MI, USA) 5 ml에 접종 후 600 nm에서 OD 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 균액 5 ml을 원심 분리하여 세포를 수확 후 Hybrid-R™(GeneAll, 서울) kit을 사용하여 total RNA를 분리하였다. RNA 정량 후 total RNA 0.2 µg을 template로 AccuPower CycleScript RT premix(dN12)(Bioneer, 대전) 시약을 사용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 반응은 2xPowerSYBR Green PCR Mastermix(Life Technologies Pty Ltd., NY, USA) 10 µl, cDNA 1 µl, primer 각 5 pmole 및 RNase free water를 넣어 최종 반응 부피가 20 µl가 되도록 하여 StepOne realtime PCR system(Life Technologies Pty Ltd., NY, USA) 기기를 사용하여 실시하였다. 최종 실험결과의 분석은 *E. coli* ATCC 25922의 house keeping 유전자인 16S rRNA를 기준으로 퀴놀론 내성 대

장균의 각 유전자별 상대정량분석을 하는 ddCt 분석을 실시하여 분석하였으며 그 값이 1.5배 이상 차이가 나는 값을 유의적인 유전자 발현이 증가한 것으로 결정하였으며^{17,18)} 모든 실험은 3회 반복 실험하였다.

실험 결과

식육시료에서 분리한 대장균군 세균의 퀴놀론 항생제 내성

2014년 5월부터 2015년 1월까지 총 277개의 식육시료(소고기 142, 돼지고기 106, 닭고기 29)에서 67개의 대장균군 세균을 분리하였으며(67/277=24.19%) 이중 소고기에서 분리한 균이 30균주, 돼지고기에서 분리한 균이 25균주, 닭고기에서 분리한 균이 12균주 이었다(Table II). 67개 대장균군중 NAL 내성균주는 15

Table II – Distribution of MICs of quinolones against coli form bacteria isolated from retail meat in Seoul

	Antibiotics (µg/ml)				
	NAL	CIP	LEV	MOX	
Resistance breaking point (µg/ml)	>32	>4	>8	>8	
MIC range of total isolates (n=67)	1~>64	<0.03~64	<0.03~16	<0.03~64	
MIC ₅₀ (n=67)*	2	<0.03	<0.03	0.06	
MIC ₉₀ (n=67)**	8	8	4	8	
MIC range depending on the sample origin	Beef (n=30)	2~>64	<0.03	<0.03~0.06	<0.03~0.12
	Pork (n=25)	1~>64	<0.03~64	<0.03~8	0.03~8
	Chicken (n=12)	8~>64	0.25~64	0.25~16	1~64

*: The concentration that inhibits 50% of the strains tested.
 **: The concentration that inhibits 90% of the strains tested.

Table III – Correlation of MICs of quinolones with target gene mutations and the presence of PMQR in quinolone resistant *E. coli* isolates from retail meat in Seoul

Strains (origin)*	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				Mutations in QRDR				PMQR			
	NAL	CIP	LEV	MOX	<i>gyrA</i> (67-106)	<i>gyrB</i> (423-449)	<i>parC</i> (64-104)	<i>parE</i> (417-443)	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>
C1(C)	>64	8(0.5)**	8	32	D87N	wt	wt	wt	-	-	-	-
C2(C)	>64	8(2)	8	64	D87N	wt	wt	wt	-	-	-	-
C11(C)	>64	1(0.5)	1	2	D87N	wt	wt	wt	-	-	-	-
C12(C)	>64	1(1)	1	2	wt	wt	wt	wt	-	-	-	-
C22(C)	>64	8(2)	4	16	D87G	wt	wt	wt	-	-	-	-
C61(C)	>64	0.25(0.25)	0.25	1	wt	wt	wt	wt	-	-	-	-
C62(C)	>64	0.25(0.25)	0.25	1	wt	P445T	wt	wt	-	-	-	-
C71(C)	>64	4(2)	2	16	D87N	wt	wt	wt	-	-	-	-
C72(C)	>64	8(1)	8	64	D87N	K434P/P445T/Q465T	L86A/L87I	wt	-	-	-	-
C91(C)	>64	8(2)	8	32	D87N	Q429T	L86A/L87I	wt	-	-	-	-
C92(C)	>64	64(2)	16	64	D87N	wt	wt	S458A	-	-	-	-
B771(B)	>64	<0.03(<0.03)	<0.03	0.12	wt	wt	wt	wt	-	-	-	-
P551(P)	>64	2(0.5)	4	4	D87N	wt	wt	wt	-	-	+	-
P581(P)	>64	64(2)	8	8	D87N	wt	wt	wt	-	-	+	-
P582(P)	>64	64(2)	8	8	D87N	wt	wt	wt	-	-	-	-

*: The origin of sample, C, chicken; B, beef; P, pork.

** : Bracket means the MICs of ciprofloxacin in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ PA β N, an efflux pump inhibitor.

균주(22.39%)이었으며 이중 9균주는 CIP과 MOX에도 내성이었으며(13.43%), 7균주는 LEV을 포함한 4종류의 항생제 모두에 내성을(10.44 %) 나타냄을 확인하였다. NAL 내성 대장균을 대상으로 균동정을 한 결과 모두 대장균(*Escherichia coli*)으로 확인되었다. 한편 pump inhibitor인 PA β N를 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함유한 배지에서 CIP의 MIC를 측정 한 결과 10균주에서 CIP의 MIC 값이 약 4~32배까지 감소한 것을 알 수 있었다(Table III).

내성유전자의 분석

DNA gyrase와 topoisomerase IV에서 발견된 QRDR 변이와 PMQR의 존재는 각 내성 균주별 MIC 값과 함께 Table III에 나타내었다. 염기서열 분석 결과 15개의 내성균주 중 4균주는 QRDR에 변이가 없는 야생형이었으나 11균주에서 *gyrA*의 codon 87에 단일 아미노산 변이(D87N 또는 D87G)를 갖고 있었다. 11개의 *gyrA* 단일변이주 중 3균주에서 *gyrB* 영역의 P445T, K434P+P445T+Q465T, Q429T의 아미노산이 각각 변이되었음을 확인하였으며, *gyrA* 및 *gyrB*가 동시에 변이된 3균주 중 2개의 균주에서 *parC* 영역 중 codon 86(L86A)과 codon 87(L87I)이 함께 변이되었음을 알 수 있었다. 플라스미드에 기인한 퀴놀론 내성 PMQR 인자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* 및 *qepA* 유전자의 존재를 PCR 반응 및 염기서열을 확인한 결과 돼지고기에서 분리한 2균주에서 *qnrS*가 존재함을 확인하였다(Table III).

약물유출펌프 유전자 *acrB*와 porin 유전자 *ompF*의 발현 비교

식육시료 유래 대장균의 퀴놀론 내성이 QRDR 영역의 돌연변

이뿐 아니라 efflux pump도 퀴놀론 내성에 기여하는지를 확인하고자 관련 유전자의 발현을 비교하고자 하였다. 그 결과 NAL에 내성인 15개의 균주중 10균주에서 대조균인 *E. coli* ATCC 25922와 비교하여 *acrB* 유전자가 3.93~16.93배 과발현 되고 있음을 관찰할 수 있었으며 그 결과는 Table IV에 나타내었다.

Table IV – The expression of efflux pump gene *acrB* and *ompF* in quinolone resistant *E. coli* isolates from retail meat in Seoul

Isolates	Phenotype*	Fold changes in gene expression in relation to <i>E. coli</i> ATCC 25922**	
		<i>acrB</i>	<i>ompF</i>
C1	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	10.72±0.22	0.29±0.14
C2	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	16.53±0.71	0.69±0.37
C11	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	7.35±0.16	0.27±0.18
C12	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	10.44±0.35	0.85±0.08
C22	NAL ^R CIP ^R LEV ^S MOX ^R	1.39±0.56	0.27±0.16
C61	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	14.24±0.35	0.29±0.18
C62	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	16.93±1.91	11.01±0.91
C71	NAL ^R CIP ^R LEV ^S MOX ^R	1.29±0.09	0.25±0.03
C72	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	6.02±1.83	1.33±0.83
C91	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	3.93±0.13	0.57±0.18
C92	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	0.13±0.07	0.41±0.34
B771	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	0.97±0.23	0.25±0.07
P551	NAL ^R CIP ^S LEV ^S MOX ^S	1.15±0.14	0.42±0.11
P581	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	5.74±0.32	7.69±1.25
P582	NAL ^R CIP ^R LEV ^R MOX ^R	3.16±0.21	0.10±0.05

*: R, resistance; S, sensitive.

** : Expression values were shown RQ value plus or minus standard error of the means. Relative expression of *acrB* and *ompF* gene to 16S rRNA gene of *E. coli* ATCC 25922.

고찰

본 연구를 통해 서울지역에 한정된 표본이지만 시판 식육에 존재하는 대장균의 퀴놀론계 항생제 내성률 및 그 내성기전을 확인할 수 있었다. 최근 발표된 우리나라 닭으로부터 분리한 대장균의 경우 NAL내성률은 38.7%, CIP 내성률은 22.6%로 보고되었고,¹⁹⁾ 2010년 부산지역에서 분리한 시판 식육을 대상으로 한 결과에서는 소고기에 존재하는 대장균중 NAL 내성률은 22%, CIP 내성률은 61.0%로 보고되었다.²⁰⁾ 본 실험에서 분리된 전체 대장균중 NAL 내성균의 비율이 22% 정도로 나와 기존 연구 결과와 유사한 것을 확인하였으며 본 연구의 특이한 점은 분리된 내성균주 15균주중 닭고기에서 유래한 균주가 11균주로 상대적으로 닭고기 유래 균주에서 높은 내성률을 나타냄을 확인하였다. 내성유전자를 분석하기 위해 QRDR 영역의 염기서열 및 아미노산 변이를 확인한 결과 NAL 항생제에만 내성인 균(6균주)의 경우는 QRDR 영역의 변이가 없거나(4균주) 또는 *gyrA* 영역의 단일변이만(2균주, D87N) 관찰되었다. 4종류의 퀴놀론 항생제 모두에 내성인 7균주중 2균주(C72, C91)는 *gyrA*(D87N), *gyrB*(K434P+P445+Q465T or Q429T) 및 *parC*(L86A+L87I) 등 3곳의 변이가 관찰되었다. 특히 *gyrB* 영역의 변이는 지금까지 보고된 사례가 많지 않으며 몇몇 사례에서 389, 426, 447 및 464 위치의 변이가 보고되어 있는데^{21,22)} 본 실험에서 닭고기에서 유래한 두 균주에서 434, 445, 465 3곳의 codon이 변이된 균(C72)과 429 codon이 변이된 균(C91)이 확인되었다(Table III). *ParC* 영역의 변이는 주로 codon 80의 변이가 주로 알려져 있는데²¹⁾ 본 실험에서 분리한 균의 경우는 codon 86과 87 codon이 변이되었다. 기존 임상균주 및 동물유래 연구 결과에서도 QRDR 영역의 단일 아미노산 변이보다는 다중 변이체들이 내성의 강도가 높은 것으로 보고되고 있으며^{4,22)} 이러한 결과는 대장균이 퀴놀론 항생제에 내성을 나타내는 기전 중 QRDR 영역의 변이에 의한 기전이 주요한 내성 기전임을 알 수 있다. 최근 임상균주뿐 아니라 가축 유래 대장균에서 그 존재가 확인되고 있는 플라스미드 유래 내성 PMQR 인자는 돼지고기에서 분리한 두 균주(P551, P581)에서 *qnrS*가 확인되었다. 지금까지 알려진 대장균 유래 PMQR 인자중 환자에서 분리된 대장균 이외 동물 유래 대장균은 우리나라의 경우 가축의 분변유래 대장균 및 환축에서 분리한 대장균에서 *qnrB*, *qnrS* 및 *aac(6)-lb-cr*이 보고되었고²³⁾ 외국의 연구 결과도 시판 식육에서 확인된 *qnrS* 등 극히 일부에서만 확인된 것으로 보고되고 있다²⁴⁾. 본 연구에서 15개 내성균중 2균주에서만 PMQR 인자인 *qnrS*가 관찰된 것은 국내·외의 퀴놀론 내성 대장균의 역학적 특징과도 일치하는 것임을 알 수 있었다.

일반적으로 quinolone 항생제 고도내성의 경우 표적부위인 QRDR 영역의 돌연변이와 함께 efflux pump 유전자 발현의 변화

에 의해 MIC 값이 증가하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ *E. coli*의 경우 AcrAB-TolC가 대표적인 약물유출펌프로 퀴놀론 항생제 및 기타 항생제에 대한 내성에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.^{25,26)} 따라서 대장균의 대표적인 resistance nodulation-division(RND)계에 속하는 multidrug efflux pump인 AcrAB-TolC transporter¹⁷⁾의 *acrB* 유전자와 porin 유전자인 *ompF* 유전자의 발현을 qRT-PCR 법으로 비교하였다. 그 결과 NAL에 내성인 15균주중 10균주에서 대조균인 *E. coli* ATCC 25922와 비교하여 *acrB* 유전자가 3.93~16.93배 과발현 되고 있음을 확인하였다(Table IV). 이 결과는 efflux pump inhibitor인 PAβN을 사용하였을 때 CIP의 MIC 값이 4~32배 가량 감소한 결과와도 일치하는 결과로(Table III) efflux pump가 퀴놀론 내성에 관여함을 보여주는 증거로 사료된다.^{16,17,27)} 한편 *ompF* 유전자는 15개의 내성균주중 1균주를 제외하고는 모두 그 발현이 현저히 감소하였다.

Quinolone 항생제는 사람에게 중요한 항생제(clinically important antimicrobials, CIA)이면서²⁸⁾ 수의분야에서도 중요한 항생제(Veterinary clinically important antimicrobials, VCIA)에 속하는 항생제로서²⁹⁾ 우선적으로 항생제내성 위해 관리전략이 필요한 항생제군으로서 서울시내 시판 식육시료에서 분리한 대장균을 대상으로 한 본 연구 결과가 quinolone 항생제 내성 위해 관리의 기초자료가 될 것으로 사료된다.

결론

시판 식육에서 분리한 대장균의 quinolone 항생제 내성비율과 그 내성 결정인자를 분석하였다. 그 결과 277개의 식육시료로부터 분리한 67개의 대장균군 세균중 15개의 균이 NAL에 내성임을 확인하였으며(MIC≥64 µg/ml), 이 15균주중 7개의 균주는 LEV을 포함한 4종류의 항생제 모두에 내성(MIC 8 µg/ml~16 µg/ml)이었다. 내성균 15균주중 4균주는 QRDR 영역이 야생형과 동일하였으나 11균주는 *gyrA* 영역 codon 87에 변이(D87N 또는 D87G)를 갖고 있었다. *gyrA* 변이주 11균주중 2균주는 *gyrA* 영역 codon 87에 변이(D87N)와 함께 *parC* 영역 codon 86 및 87에 이중 변이(L86A+L87I)와 *gyrB* 영역의 codon 434,445,465의 변이 및 429의 변이를 갖고 있었다. PMQR 유래 내성유전자중 *qnrS*를 보유하는 2균주가 확인되었으며 AcrAB-TolC efflux pump 유전자인 *acrB* 유전자는 대조균인 *E. coli* ATCC 25922 와 비교하여 10균주에서 유의적으로 과발현(3.93~16.93배) 되고 있음을 확인하였다.

References

- 1) EMA, 2012. Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010 (Second ESVAC report). European

- medicines agency. London, United Kingdom.
- 2) Lim, S. K., Lee, J. E., Lee, H. S., Nam, H. M., Moon, D. C., Jang, G. C., Park, Y. J., Jung, Y. G., Jung, S. C. and Wee, S. H. : Trends in antimicrobial sales for livestock and fisheries in Korea during 2003-2012. *Korean J. Vet. Res.* **54**, 81 (2014).
 - 3) Aaerstrup, F. M. : Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12**, 279 (1999).
 - 4) Jacoby, G. A. : Mechanism of resistance to quinolones. *Clin. Infec. Dis.* **41**, S120 (2005).
 - 5) Hernández-Allés, S., Benedí, V. J., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomás, J. M. and Albertí, S. : Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 937 (1999).
 - 6) Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Conejo Mdel, C., García, I., Joyanes, P., Doménech-Sánchez, A. and Benedí, V. J. : Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3926 (2002).
 - 7) Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L. and Pascual, A. : Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* **17**, 149 (2011).
 - 8) Poirel, L., Cattoir, V. and Nordmann, P. : Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* **3**, 24 (2013).
 - 9) Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. and Robicsek, A. : Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 664 (2009).
 - 10) Chen, Y. T., Liao, T. L., Liu, Y. M., Lauderdale, T. L., Yan J. J. and Tsai, S. F. : Mobilization of *qnrB2* and ISCR1 in plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1235 (2009).
 - 11) Komp Lindgren, P., Karlsson, A. and Hughes, D. : Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3222 (2003).
 - 12) Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L. and Nordmann, P. : Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 71 (2005).
 - 13) Jung, D. H., Lee, M. Y., Kim, J. M., Lee, J. C., Cho, D. T. and Lee, Y. H. : Isolation of quinolone-resistant *Escherichia coli* found in major rivers in Korea. *J. Microbiol.* **44**, 680 (2006).
 - 14) Zurfluh, K., Abgottspon, H., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M. and Stephan, R. : Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PLoS ONE* **9**, e95864 (2014).
 - 15) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 19th Informational Supplement. 2009. Document M100-S19, CLSI, Wayne, PA.
 - 16) Liu, X., Boothe, D. M., Thungrat, K. and Aly, S. : Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.* **161**, 159 (2012).
 - 17) Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N. and Fanning, S. : Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7113 (2011).
 - 18) Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pagès, J. M. and Amaral, L. : Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One.* **2**, e365 (2007).
 - 19) Oh, J. Y., Kwon, Y. K., Tamang, M. D., Jang, H. K., Jeong, O. M., Lee, H. S. and Kang, M. S. : Plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from wild birds and chickens in South Korea. *Microbial. Drug Resistance* (Epub ahead of print) DOI:10.1089/mdr.2015.0090 (2015).
 - 20) Kim, H. T., Jung, K. T., Kim, G. H. and Ryu, B. S. : Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from domestic meat (beef, pork, chicken and duck) on sale (2009-2010). *The Ann. Rep. Busan Meterop. City Institute of Health and Environment* **20**, 1074 (2010).
 - 21) Vila, J., Ruiz, J., Goni, P. and De Anta, M. Y. : Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 491 (1996).
 - 22) Komp Lindgren, P., Marcusson, L. L., Sandvang, D., Frimodt-Moller, N. and Hughes, D. : Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutation in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2342 (2005).
 - 23) Tamang, M. D., Nam, H. M., Chae, M. H., Kim, S. R., Gurung, M., Jang, G. C., Jung, S. C. and Lim, S. K. : Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* isolated from food animals in Korea. *Foodborne Patho. Dis.* **9**, 1057 (2012).
 - 24) Yang, T., Zeng, Z., Rao, L., Chen, X., He, D., Lv, L., Wang, J., Zeng, L., Feng, M. and Liu, J. H. : The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins. *Vet. Microbiol.* **170**, 89 (2014).
 - 25) Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T. M., Cornaglia, G. and Nikaido, H. : High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein *acrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3441 (2000).

- 26) Yang, S., Clayton, S. R. and Zechiedrich, E. L. : Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 545 (2003).
- 27) Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., Arakawa, S., Kinoshita, S., Kawabata, M. and Fujisawa, M. : Correlation of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 189 (2011).
- 28) Lim, S. K. : Clinically important antimicrobials. *J. Kor. Vet. Med. Assoc.* **48**, 603 (2012).
- 29) Lim, S. K. : Veterinary clinically important antimicrobials. *J. Kor. Vet. Med. Assoc.* **48**, 662 (2012).
- 30) Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J. L. and Chaslus-Dancla, E. : Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental *in vitro*- and *in vivo*-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counter selection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2131 (1999).
- 31) Jacoby, G. A., Gacharna, N., Black, T. A., Miller, G. H. and Hooper, D. C. : Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1665 (2009).
- 32) Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Jacoby, G. A. and Hooper, D. C. : Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 639 (2009).