

## 원유시료에서 분리한 대장균의 퀴놀론 항생제 내성 기전

강소원<sup>1</sup> · 이상진<sup>1</sup> · 최성숙<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>삼육대학교 동물생명공학과, <sup>2</sup>삼육대학교 약학과

### Prevalence and Molecular Characterization of Quinolone Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Raw Bulk Milk in Gyeonggi-do

Sowon Kang<sup>1</sup>, Sangjin Lee<sup>1</sup>, and Sungsook Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Biotechnology, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea

(Received June 18, 2014 / Accepted July 17, 2014)

The aim of this study was to investigate the prevalence of quinolone resistant *E. coli* from raw bulk milk and to characterize the resistance determinants. In this study, the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* quinolone resistance determining regions (QRDR) were sequenced from quinolone resistant *E. coli* isolates. Also, the presence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and the expression of efflux pump genes based on quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were investigated. Of the 487 coliform bacteria, 9 strains showed nalidixic acid resistance, and 6 of the 9 nalidixic acid resistant isolates were also ciprofloxacin resistant. These 9 strains had a single mutation at codon 83 (S83L) in *gyrA*, 2 of them had double mutations at codon 83 and 87 (S83L and D87N) in *gyrA* and 3 of the 9 isolates had single mutations at codon 80 (S80I) in *parC*. None of the 9 isolates harbored PMQR determinants. Compared with wild-type *E. coli* ATCC 25922, an over-expression of the *acrB* gene (2.15–5.74 fold), encoding the pump component of the AcrAB-TolC efflux pump was observed in 4 of 6 ciprofloxacin resistant isolates. This study identified the quinolone resistance mechanism of *E. coli* isolated from raw milk samples in Gyeonggi-do.

**Keywords:** *acrB*, *E. coli*, PMQR, QRDR, quinolone resistance, raw milk samples

Quinolone 항생제는 베타락탐 계열의 항생제와 더불어 가장 많이 사용되고 있는 항생제로서 임상에서 환자 치료에 사용 할 뿐 아니라 축산분야에서도 수의사 처방용이나 자가 치료 및 예방용으로 사용되고 있는 항생제이다. 우리나라에서는 ciprofloxacin과 enrofloxacin이 축산분야에서 사용되고 있으며 quinolone계 항생제는 사람 및 동물에서 모두 중요한 항생제로 우선적 관리가 필요한 항생제로 분류하고 있다(Lim, 2012a, 2012b). Quinolone계 항생제의 사용이 증가하면서 이 항생제에 내성을 나타내는 세균 또한 비례해서 증가하고 있는 추세이다. Quinolone 항생제 내성은 이 약제의 표적 부위인 topoisomerase II (DNA gyrase)와 topoisomerase IV 유전자, 즉 염색체에 위치한 quinolone 내성 결정부위(quinolone resistance determinant region, QRDR)의 변이에 의한 내성이 주요 기전으로 알려져 있으며(Jacoby, 2005) 그 외에도 세포막 단백질인 porin의 구조변화 또는 능동적 약물 유출 펌프(active efflux pump)에 의한 기전도 알려져 있다(Hernández-

Allés *et al.*, 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 2002). 한편 최근에는 plasmid 상에 있는 내성 유전자(plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)에 의한 내성 기전이 존재함이 알려졌으며 특히 장내세균에서 PMQR에 의한 내성을 나타내는 세균의 비율이 급속히 증가하고 있는 추세이다(Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). 장내세균 중 대장균에서 PMQR의 존재는 환자에서 분리된 균에서 처음 알려지기 시작하였으나 현재는 그 기원이 환자 외에도 환경, 동물, 식품 등 다양해지고 있으며 그 분포비율도 점차 증가하고 있는 추세이다(Poirel *et al.*, 2013). 플라스미드에 위치한 quinolone 내성에 관여하는 유전자로는 *qnr* 그룹에 속하는 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 등과 항생제의 변형에 관여하는 *aac(6)-Ib-cr* 및 active efflux pump 유전자인 *qepA* 등이 알려져 있다(Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). 대장균(*coli* form bacteria) 세균은 포유동물의 대장에 상존하는 정상 세균총이며 환경 중에도 어디에서나 존재 할 수 있으며 대부분은 병원성이 없으나 일부는 설사, 급성 위장염 등을 일으키며 동물에서도 장 질환을 유발할 뿐 아니라 소의 유방염을 유발하는 원인균으로 주목 받고 있다(Wenz *et al.*, 2001). 환자에서 분리된 임상

\*For correspondence. E-mail: sschoi@syu.ac.kr; Tel.: +82-2-3399-1606; Fax: +82-2-3399-1617

**Table 1.** Primers sequences that used for this experiment

Target gene		Sequences (5->3)	Size (bp)	Reference
<i>gyrA</i>	F	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	470	Giraud <i>et al.</i> (1999)
	R	CGTTGATGACTTCCGTCAG		
<i>gyrB</i>	F	AAGCGCGATGGCAAAGAAG	711	Giraud <i>et al.</i> (1999)
	R	AACGGTCTGCTCATCAGAAAGG		
<i>parC</i>	F	TGTATGCGATGTCTGAACTG	265	Liu <i>et al.</i> (2012)
	R	CTCAATAGCAGCTCGGAATA		
<i>parE</i>	F	CCGTATGCGTGC GGCCAAA	641	Liu <i>et al.</i> (2012)
	R	CGATAGTCAACTGCACCAGAC		
<i>qnrA</i>	F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	574	Jacoby <i>et al.</i> (2009)
	R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i>	F	CGACCTKAGCGGCACTGAAT	513	Jacoby <i>et al.</i> (2009)
	R	GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG		
<i>qnrS</i>	F	ACTGCAAGTTCATTGAACAG	431	Jacoby <i>et al.</i> (2009)
	R	GATCTAAACCGTCGAGTTCCG		
<i>qepA</i>	F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596	Kim <i>et al.</i> (2009)
	R	GTCTACGCCATGGACCTCAC		
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Kim <i>et al.</i> (2009)
	R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
16S rRNA	F	GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG	243	Karczmarczyk <i>et al.</i> (2011)
	R	AACCGCTGGCAACAAAGGATAAGG		
<i>acrB</i>	F	CGTACACAGAAAGTGCTCAA	183	Viveiros <i>et al.</i> (2007)
	R	CGTTCAACTTTGTTTCTT		
<i>marA</i>	F	CATAGCATTGGACTGGAT	187	Viveiros <i>et al.</i> (2007)
	R	TACTTTCCTTCAGCTTTTGC		
<i>soxS</i>	F	CCATTGCGATATCAAAAATC	210	Viveiros <i>et al.</i> (2007)
	R	ATCTTATCGCATGGATTGAC		
<i>ompF</i>	F	GAACTTCGCTGTTTCAGTACC	209	Viveiros <i>et al.</i> (2007)
	R	CGTACTTCAGACCAGTAGCC		

분리균 중 대장균을 포함한 장내세균에 대한 quinolone 항생제 내성 기전은 많이 연구되어 있으며 염색체상의 QRDR의 변이 및 PMQR 유전자에 기인한 내성기전이 모두 알려져 있다(Komp Lindgren *et al.*, 2003; Mammeri *et al.*, 2005). 임상분리균주 이외의 환경이나 식품등에서 분리한 대장균의 quinolone 항생제 내성의 기전에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있으나(Jung *et al.*, 2006; Zurfluh *et al.*, 2014) 임상분리균에 비해 많지 않으며, 우유 시료에서 분리한 대장균의 사례는 유방염 젖소의 우유에서 분리한 대장균에 대한 연구등 극히 제한적이다(Momtaz *et al.*, 2012). 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 대두되므로 가축에서 항생제 사용은 공중보건학적 측면에서도 중요하게 부각되고 있다. 따라서 본 연구진은 경기 북부지역 젖소 사육 농가로부터 2008년부터 2011년까지 원유시료를 공급받아 분리한 대장균군 세균중 quinolone 항생제 내성 대장균을 분리하고 내성 유전자를 분석하여 원유 시료에 존재하는 대장균의 quinolone

항생제 내성기전을 규명하여 사람 및 동물에 모두 중요한 우선 관리대상 항생제인 quinolone 항생제의 내성 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 원유시료의 수집, 대장균군 세균의 분리 및 동정

2008년 3월부터 2011년 5월까지 경기 북부 지역에 위치한 15개 젖소 사육 농가로부터 정기적으로 원유 시료를 공급받아 본 실험에 사용하였다. 수집한 원유를 잘 혼합한 후 원유 시료 1 ml 을 증균 배지인 EC broth (Oxoid, CB5 8BZ, UK) 9 ml에 가하여 37°C에서 15-18시간 증균 배양 후 이 배양액을 EMB agar (Difco, USA)에 직접 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 녹색의 금속성 광택을 띠는 집락을 원유 시료 당 하나씩 선택하여 보통 한천배지에 순수 배양 후, 그람 염색, 생화학적 성상시험(IMViC test) 등을 실시하였으며 최종적으로 nalidixic acid 내성균으로 확인된 균은 임상검사센터인 세강(서울)에 의뢰하여 Vitek 2 시스템으로 동정하여 대장균(*Escherichia coli*)임을 확인하였다.

### 최소저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

분리한 대장균균 세균을 대상으로 nalidixic acid (Sigma Co., USA) 및 ciprofloxacin (Korea United Pharm. Inc.)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA)의 고체배지 희석법으로(CLSI, 2009) 실시하였으며 배지는 Mueller-Hinton 배지(Difco)를 사용하였다. 항생물질은 최고 농도 64 µg/ml 농도가 되도록 하여 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최저 농도가 0.03 µg/ml이 되도록 항생물질 희석 계열을 만들어 항생제 배지를 조제하였다. 하룻밤 전 배양한 균액을 10<sup>6</sup> CFU/ml이 되도록 희석한 후 5 µl씩 항생제 배지에 접종하여 37°C에서 16-20시간 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소저지농도(MIC)로 결정하였다. 한편 efflux pump inhibitor 인 phenylalanine-arginine-β-naphthylamide (PAβN; Sigma Co.)를 100 µg/ml (Liu *et al.*, 2012) 농도로 함유한 ciprofloxacin 항생제 배지를 조제하여 efflux pump의 기능을 저해하였을 때 MIC값에 어떠한 영향을 주는지를 확인하였다. 정도 관리를 위한 표준 균주로는 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

### Quinolone 내성 유전자의 확인 및 DNA 염기서열 분석

Quinolone 항생제 내성 대장균의 genomic DNA는 GeneAll Cell SV kit (GeneAll Biotechnology, Korea)을 이용하여 분리하였다. 내성 관련 유전자로는 염색체상에 있는 QRDR 영역의 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*와 플라스미드 상에 있는 PMQR 유전자 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* 및 *qepA*을 목적 유전자로 하였다. 실험에 사용한 primer는 제노텍(Genotech, Korea)에서 합성하여 사용하였으며 염기서열은 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 AccuPower™ premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 실시하였으며 염색체 상에 위치한 QRDR 영역의 DNA 염기서열은 PCR 반응을 실시한 후 정제하여 제노텍(Genotech)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 결정하였다.

### RNA 분리 및 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Quinolone 항생제 내성 대장균의 RNA 분리 및 qRT-PCR을 실시하여 약물유출 펌프 유전자인 *acrB* 및 관련 유전자 *marA*, *soxS*와 porin 유전자인 *ompF*의 발현을 비교하고자 하였다(Karczmarczyk *et al.*, 2011). House keeping 유전자로는 대장균의 16S rRNA 유전자를 사용하였으며 각 유전자 증폭에 사용한 primer는 제노텍(Genotech)에서 합성하여 사용하였으며 염기서열은 Table 1에 나타내었다. RNA 분리를 위해 하룻밤 전 배양한 대장균액 100 µl를 Luria-Bertani (LB) 배지(Difco, USA) 5 ml에 접종 후 600 nm에서 OD값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 균액 2 ml을 원심분리하여 세포를 수확 후 Hybrid-R™ (GeneAll) kit을 사용하여 total RNA를 분리하였다. RNA 정량 후 total RNA 1 µg을 template

로 AccuPower CycleScript RT premix (dN12) (Bioneer) 시약을 사용하여 cDNA 를 합성하였다. qRT-PCR 반응은 2X Power SYBR Green PCR Mastermix (Life Technologies Pty Ltd, 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) 기기를 사용하여 실시하였다. 최종 실험 결과의 분석은 *E. coli* ATCC 25922의 house keeping 유전자인 16S rRNA를 기준으로 quinolone 내성 대장균의 각 유전자별 상대 정량 분석을 하는 ddCt 분석을 실시하여 분석하였으며 그 값이 1.5배 이상 차이가 나는 값을 유의적인 유전자 발현이 증가한 것으로 결정하였으며(Viveiros *et al.*, 2007; Karczmarczyk *et al.*, 2011) 모든 실험은 3회 반복 실험하였다.

## 결과 및 고찰

### 원유시료에서 분리한 대장균의 quinolone 항생제 내성

총 1,950개의 원유 시료에서 487개의 대장균균 세균을 검출하였으며 이 중 nalidixic acid 내성이면서 ciprofloxacin에 감수성 또는 내성을(NAL<sup>R</sup> and CIP<sup>S</sup> or CIP<sup>R</sup>) 나타내는 균은 총 9균주(1.85%) 확인되었으며 nalidixic acid 내성 대장균균 세균은 동정 결과 모두 대장균(*Escherichia coli*)으로 확인되었다. MIC 측정 결과 nalidixic acid의 MIC값은 모두 64 µg/ml 이상의 고도 내성이었으며 ciprofloxacin의 MIC값은 0.5-16 µg/ml로 9개의 균주 중 6개의 균주가 ciprofloxacin에 대해서도 내성을 나타내었다(Table 2). 최근 보고된 연구결과에 따르면 우리나라의 환축 및 소의 분변 유래 대장균의 경우 nalidixic acid에 약 50%가, ciprofloxacin에 49%가 내성임이 보고되었으며(Tamang *et al.*, 2012) 시판되고 있는 소고기에 존재하는 대장균 중 quinolone 항생제 내성율은 nalidixic acid에 22%, ciprofloxacin에 61%로 보고되었다(Kim *et al.*, 2010). 하지만 본 실험에 사용한 정상적인 원유 시료의 경우는 quinolone 내성율은 매우 낮은 것을 알 수 있으며 이러한 결과는 외국의 경우도(Botrel *et al.*, 2010) 원유 시료에서 분리된 *E. coli* 균주의 내성율은 퀴놀론 항생제를 포함한 대다수의 항생제에 대해 1% 이하로 낮았는데 이는 *E. coli*로 인한 유방염 등의 질병이 발생한다고 해도 자연적으로 치료되는 비율이 높아 항생제 사용을 적극적으로 하지 않고, 그 결과 항생제에 노출될 기회가 없어 내성균 발생이 어려울 수 있다는 사실로 일부 설명이 가능할 것으로 사료된다. 한편 pump inhibitor인 PAβN (Liu *et al.*, 2012)를 100 µg/ml 농도로 함유한 항생제 배지에서 ciprofloxacin의 MIC를 측정한 결과 ciprofloxacin의 MIC값이 약 4배 정도 감소하는 것을 알 수 있었다(Table 2). 이러한 결과는 *acrB* 유전자의 과발현 결과와 일치하는 것으로(Table 3) 기존 연구 결과 중 식육 동물 및 환자에서 분리한 quinolone 내성 대장균의 결과와도 일치 하였으며(Karczmarczyk *et al.*, 2011; Yasufuku *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) MIC값의 상승에 active efflux pump가 기여할 것으로 사료되었다.

### 내성유전자의 분석

Topoisomerase II (DNA gyrase)와 topoisomerase IV의

**Table 2.** MICs of quinolone antibiotics and target gene mutation in quinolone-resistant *E. coli* isolates

Isolates	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		Target gene amino acid substitution			
	NAL	CIP	GyrA	GyrB	ParC	ParE
1	> 64 (>64)	0.5 (0.06)	S83L	wt	wt	wt
2	> 64 (>64)	4 (1)	S83L	wt	wt	wt
3	> 64 (>64)	8 (2)	S83L	wt	S80I	wt
4	> 64 (>64)	2 (0.5)	S83L	wt	wt	wt
5	> 64 (>64)	8 (2)	S83L	wt	wt	wt
6	> 64 (8)	16 (1)	S83L+D87N	wt	S80I	wt
7	> 64 (>64)	16 (4)	S83L+D87N	wt	S80I	wt
8	> 64 (64)	0.5 (0.06)	S83L	wt	wt	wt
9	> 64 (>64)	4 (1)	S83L	wt	wt	wt

NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; wt, wild type

Concentrations in brackets were the MICs determined in the presence of an efflux pump inhibitor PA $\beta$ N at 100  $\mu\text{g/ml}$ .

QRDR 영역의 염기서열의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자를 PCR 증폭 후 DNA 염기서열을 결정하여 *E. coli* K12 균주와 비교하였다. Table 2에 각 균주별 MIC값과 QRDR 변이 여부를 나타내었다. 염기서열 분석 결과 *gyrB* 및 *parE* 영역의 변이는 관찰되지 않았으며 9개의 균주 모두 *gyrA*의 codon 83에 단일 아미노산 변이(S83L)를 갖고 있었으며 2개의 균주는 codon 83 (S83L)과 codon 87 (D87N)의 두 곳의 아미노산이 변이되었음을 알 수 있었다. 한편 3개의 균주에서 *parC* 영역 중 codon 80에 아미노산(S80I)이 변이되었음을 알 수 있었으며 이 3개 균주 중 2개 균주는 *gyrA* 영역의 이중 변이(S83L 과 D87N) 및 *parC* 영역의 변이(S80I) 등 3곳의 아미노산이 변이 된 균주임을 알 수 있었다. QRDR 영역의 *gyrA*, *parC* 두 곳 모두 변이가 있는 균주에 대한 ciprofloxacin의 MIC값은 16  $\mu\text{g/ml}$ 으로 야생형이나 단일 아미노산 돌연변이체에 비하여 MIC값이 높은 것을 알 수 있었다. 기존 연구 결과에서도 QRDR 영역의 단일 아미노산 변이보다는 다중 변이체들에 대한 MIC값이 높은 것으로 보고 되고 있으며(Jacoby, 2005; Karczmarczyk et al., 2011; Liu et al., 2012) 본 연구에 사용한 대장균이 quinolone 항생제에 내성을 나타내는 기전 중 항생제의 작용부위의 변이에 의한 기전이 관여함을 알 수 있었다. 플라스미드 상에 있다고 알

려진 PMQR인자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-cr* 및 *qepA* 유전자의 존재를 PCR 반응으로 확인한 결과 PMQR 유전자는 존재하지 않음이 확인되었다. 지금까지 알려진 대장균 유래 PMQR 유전자중 환자에서 분리된 대장균 이외 동물 유래 대장균은 소 보다는 닭에서 유래한 대장균에서 주로 보고되었다(Rodríguez-Martínez et al., 2011). 우리나라의 소에서 유래한 대장균 유래 PMQR 존재에 대한 보고는 분변유래 대장균 및 한 축에서 분리한 대장균에서 *qnrB*, *qnrS* 및 *aac(6')-lb-cr*이 보고되었고(Tamang et al., 2012), 외국의 연구 결과도 시판 식육에서 확인된 *qnrS* (Yang et al., 2014) 및 유방염 소의 원유(Momtaz et al., 2012) 등 극히 일부에서만 확인된 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구 결과에서 PMQR 유전자가 검출되지 않은 것은 현시점에서 국내 및 외국의 소에서 기원한 quinolone 내성 대장균의 역학적 특징과도 일치하는 것임을 알 수 있었다.

#### 약물유출펌프 유전자 *acrB* 및 관련 유전자의 발현 비교

원유시료 유래 대장균의 quinolone 내성이 QRDR 영역의 돌연변이뿐 아니라 efflux pump도 quinolone 내성에 기여하는지를 확인하고자 관련 유전자의 발현을 비교하였다. 일반적으로 quinolone 항생제 고도내성의 경우 표적부위의 돌연변이와 함께

**Table 3.** The expression of efflux pump gene *acrB* and related genes in quinolone resistant *E. coli* isolates

Isolates	Phenotype	Fold changes in gene expression in relation to <i>E. coli</i> ATCC 25922			
		<i>acrB</i>	<i>marA</i>	<i>soxS</i>	<i>ompF</i>
1	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>S</sup>	0.97 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.10	0.46 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.08
2	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	1.39 $\pm$ 0.21	1.53 $\pm$ 0.48	0.32 $\pm$ 0.22	0.85 $\pm$ 0.08
3	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	2.15 $\pm$ 0.14	1.05 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.16
4	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>S</sup>	1.11 $\pm$ 0.12	1.30 $\pm$ 0.19	0.17 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.18
5	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	3.16 $\pm$ 0.41	1.10 $\pm$ 0.04	1.78 $\pm$ 0.18	0.67 $\pm$ 0.23
6	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	4.23 $\pm$ 0.32	4.90 $\pm$ 0.81	0.22 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.03
7	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	5.74 $\pm$ 0.81	0.61 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.18	0.44 $\pm$ 0.08
8	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>S</sup>	1.34 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.12	1.11 $\pm$ 0.17	0.57 $\pm$ 0.18
9	NAL <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>	1.28 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.08	1.78 $\pm$ 0.23	0.34 $\pm$ 0.34

Expression values were shown RQ value plus or minus standard error of the means.

Relative expression of *acrB*, *marA*, *soxS*, and *ompF* gene to 16S rRNA gene of *E. coli* ATCC 25922.

efflux pump 유전자의 변이에 의한 MIC값이 증가하는 것으로 알려져 있다(Komp Lindgren *et al.*, 2003). *E. coli*의 경우 AcrAB-TolC가 대표적인 약물유출펌프로 quinolone 항생제 및 기타 항생제에 대한 저항성에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Mazzariol *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). 본 연구에서는 efflux pump 유전자의 돌연변이에 대한 연구는 하지 않았지만 대장균의 대표적인 resistance nodulation-division (RND)계에 속하는 multidrug efflux pump인 AcrAB-TolC transporter (Karczmarczyk *et al.*, 2011)의 *acrB* 유전자 및 관련 유전자인 *marA*, *soxS*와 porin 유전자인 *ompF* 유전자의 발현을 qRT-PCR 법으로 비교하였다. 그 결과 ciprofloxacin에 내성인 6균주 중 4균주에서 대조균인 *E. coli* ATCC 25922와 비교하여 *acrB* 유전자의 발현이 2.15-5.74배 정도 증가한 것을 관찰 할 수 있었으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 이러한 결과는 Karczmarczyk 등의(Karczmarczyk *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) 결과에서도 볼 수 있는 것으로 efflux pump가 quinolone 내성에 관여함을 보여주는 증거로 사료된다. *marA* 및 *soxS*의 발현은 증가한 균주도 있으며 감소한 균주도 있어 *acrB* 유전자 발현의 증가와 상관성을 갖고 해석하는 것은 가능하지 않았으며 Karczmarczyk 등(2011)의 연구 결과 및 Liu 등(2012)의 결과에서도 동일한 결과를 볼 수 있었으며 이 세 유전자의 발현에 다른 기전이 관여할 것으로 사료되었다. 한편 모든 균주에서 대장균의 porin 유전자인 *ompF*의 발현이 억제된 것을 알 수 있었으며(0.17-0.85) 이는 porin 유전자 발현의 억제도 quinolone 항생제 내성에 기여할 것으로 사료된다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 비록 경기 일부 지역에서 수집한 원유시료이나 약 3년에 걸쳐 수집한 원유 시료에서 분리한 대장균의 quinolone 내성비율은 약 1.85%로 비교적 낮았으며 quinolone 항생제 내성 기전은 ORDR 영역의 돌연변이, 약물유출펌프 유전자인 *acrB*의 과발현 및 porin 유전자인 *ompF*의 발현 억제 등의 기전에 기인함을 알 수 있었다. 축산농가에서 항생제 사용이 증가함에 따라 최근에는 항생제 내성균이 증가하고 있으며 가축에서 사용하는 것과 동일하거나 유사한 항생제가 사람에서도 사용되고 있어 동물유래 항생제 내성균이 가축, 축산물, 환경 등을 통해 사람으로 전달될 경우 적절한 치료제 부재로 사회적인 문제가 될 수 있어 가축유래 항생제 내성 세균은 공중보건학적 측면에서도 중요하게 부각되고 있다. 특히 quinolone 항생제는 사람에게 중요한 항생제(clinically important antimicrobials, CIA)이면서 수의학분야에서도 중요한 항생제(Veterinary clinically important antimicrobials, VCIA)에 속하는 항생제로서(Lim, 2012a, 2012b) 우선적으로 항생제 내성 위해 관리 전략이 필요한 항생제균으로서 본 연구 결과가 quinolone 항생제 내성 위해 관리의 기초자료가 될 것으로 사료된다.

## 적 요

원유시료에서 분리한 대장균의 quinolone 항생제 내성비율과 그 내성 결정인자를 분석하였다. 원유시료에서 대장균을 분리하고 quinolone 항생제인 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 대한 MIC값을 결정하였으며 내성균을 대상으로 염색체상에 있는

quinolone 내성 결정부위(quinolone resistant determining region, QRDR)인 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *pareE*의 염기서열 분석, 플라스미드 상에 존재하는 내성유전자(plasmid mediated quinolone resistant, PMQR) *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-cr*, *qepA*의 분석 및 약물유출펌프 유전자인 *acrB*의 발현을 비교·분석하였다. 그 결과 총 487개의 대장균군 세균중 9개의 균이 nalidixic acid에 내성임을 확인하였으며(MIC  $\geq$  64  $\mu$ g/ml) 이중 6개 균주가 ciprofloxacin에도 내성임을 확인하였다(MIC 4-16  $\mu$ g/ml). 9개의 내성 균주 모두 QRDR의 *gyrA* 영역 codon 83에 변이(S83L)를 갖고 있었으며 그 중 2균주는 codon 83과 87 (S83L and D87N)에 이중 돌연변이를 갖고 있었다. 한편 9균주 중 3개의 균주에서 *parC* 영역 codon 80 (S80I)에 변이를 갖고 있었다. 플라스미드 상에 존재하는 내성유전자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-cr* 및 *qepA* 유전자는 존재하지 않았으며 AcrAB-TolC efflux pump 유전자인 *acrB* 유전자가 대조균인 *E. coli* ATCC 25922와 비교하여 ciprofloxacin 내성 균주 6균주 중 4균주에서 유의적으로 과발현(2.15-5.74배) 되고 있음을 확인하였다.

## 감사의 말

본 연구는 2012년 삼육대학교 교내연구비에 의해 수행되었습니다.

## References

- Botrel, M.A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J.Y., and Calavas, D. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 479-487.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19<sup>th</sup> Informational Supplement. Document M100-S19, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J.L., and Chaslus-Dancla, E. 1999. 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, 2131-2137.
- Hernández-Allés, S., Benedí, V.J., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomás, J.M., and Albertí, S. 1999. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 937-939.
- Jacoby, G.A. 2005. Mechanism of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41, S120-S126.
- Jacoby, G.A., Gacharna, N., Black, T.A., Miller, G.H., and Hooper, D.C. 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1665-1666.
- Jung, D.H., Lee, M.Y., Kim, J.M., Lee, J.C., Cho, D.T., and Lee, Y.H. 2006. Isolation of quinolone-resistant *Escherichia coli* found in major rivers in Korea. *J. Microbiol.* 44, 680-684.
- Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N., and Fanning, S. 2011. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7113-7120.

- Kim, H.T., Jung, K.T., Kim, G.H., and Ryu, B.S. 2010. 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**, 1074-1091.
- Kim, H.B., Park, C.H., Kim, C.J., Jacoby, G.A., and Hooper, D.C. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 639-645.
- Komp Lindgren, P., Karlsson, A., and Hughes, D. 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3222-3232.
- Lim, S.K. 2012a. Clinically important antimicrobials. *J. Kor. Vet. Med. Assoc.* **48**, 603-609.
- Lim, S.K. 2012b. Veterinary clinically important antimicrobials. *J. Kor. Vet. Med. Assoc.* **48**, 662-666.
- Liu, X., Boothe, D.M., Thungrat, K., and Aly, S. 2012. Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.* **161**, 159-168.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martínez-Martínez, L., and Nordmann, P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 71-76.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Conejo Mdel, C., García, I., Joyanes, P., Doménech-Sánchez, A., and Benedí, V.J. 2002. 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**, 3926-3932.
- Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T.M., Cornaglia, G., and Nikaido, H. 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein *acrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3441-3443.
- Momtaz, H., Safarpour Dehkordi, F., Taktaz, T., Rezvani, A., and Yarali, S. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk: serogroups, virulence factors, and antibiotic resistance properties. *Scientific World Journal*. doi: 10.1100/2012/618709. Epub 2012 Nov 19.
- Poirel, L., Cattoir, V., and Nordmann, P. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* **3**, 24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024. eCollection.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., and Pascual, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* **17**, 149-182.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 664-689.
- Tamang, M.D., Nam, H.M., Chae, M.H., Kim, S.R., Gurung, M., Jang, G.C., Jung, S.C., and Lim, S.K. 2012. Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* isolated from food animals in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**, 1057-1063.
- Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pagès, J.M., and Amaral, L. 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS ONE* **2**, e365.
- Wenz, J.R., Barington, G.M., Garry, F.B., McSweeney, K.D., Dinsmore, R.P., Goodell, G., and Callan, R.J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **219**, 976-981.
- Yang, S., Clayton, S.R., and Zechiedrich, E.L. 2003. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 545-556.
- Yang, T., Zeng, Z., Rao, L., Chen, X., He, D., Lv, L., Wang, J., Zeng, L., Feng, M., and Liu, J.H. 2014. The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins. *Vet. Microbiol.* **170**, 89-96.
- Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., Arakawa, S., Kinoshita, S., Kawabata, M., and Fujisawa, M. 2011. 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**, 189-194.
- Zurfluh, K., Abgottspon, H., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., and Stephan, R. 2014. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PLoS ONE* **9**, e95864. doi: 10.1371.