

사람과 해양환경에서 분리된 *Staphylococci*의 Tetracycline 내성 유전자의 특성 비교

조기택 · 김영철* · 권우주* · 정현도†
(경기도해양수산자원연구소 · *부경대학교)

Characterization of Tetracycline-Resistant Genes of *Staphylococci* isolates from Human and Marine Environment

Ki-Taek CHO · Young-Chul KIM* · Woo-Ju KWON* · Hyun-Do JEONG†
(Gyeonggi-do Maritime & Fisheries Research Institute · *Pukyong National University)

Abstract

For comparison of tetracycline-resistant (Tc^R) genes, we obtained 21 and 14 Tc^R *Staphylococcus* spp. from marine environment and human patient, respectively. Although all isolates from human were identified as *Staphylococcus aureus*, higher proportion of Tc^R isolates (12 out of 14) from human were utilizing *tet(M)* gene compared to that of Tc^R isolates (6 out of 21) from marine environment. Additionally, collaborated utilization of *tet(M)* and *erm(A)* in Tc^R - Em^R *S. aureus* in human patient, but not in Tc^R *Staphylococcus* spp. isolates from marine environment was also characterized. Based on the nucleotide sequence of transposon related to Tc^R gene, we confirmed the origin of *tet(M)* gene in Tc^R *Staphylococci* isolated from marine environments and human are derived from Tn916/1545-like and Tn5801 transposon, respectively. It is the first report showing the presence of Tn5801 in all Tc^R *S. aureus* carrying *tet(M)* in human patient. Alignment of the fully sequenced *tet(M)* from marine environmental isolates was also agreed with the determined transposons by showing the genomic mosaic structure composed with three genomic parts from Tn916/1545 and unknown transposons. Genetic characteristics of these *tet(M)* in environmental isolates were similar to each other but different from those in isolates from human showing only *tet(M)* from Tn916/5801 type. It may imply the presence of less dramatic communication of antibiotic resistant genes between *Staphylococci* isolated from marine environment and human.

Key words : Resistance genes, *tet(M)*, *Staphylococci*, Transposon

I. 서론

양식현장에서 발생하는 그람 양성 및 음성 세균의 치료목적으로 많이 사용되고 있는 Tetracycline (Tc)은 효과적인 광범위성 항생제로 알려져 있으며 사람, 가축 그리고 수산 생물 양식현장 모두에서 무분별한 사용으로 인하여 Tc에

대한 내성균이 점차 많이 보고되고 있다. (Schmitz et al., 2001; Schwarz et al., 1998; Trzcinski et al., 2000)

Tetracycline계 약물의 내성 기전은 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(K)* 등에 의한 efflux 기작과, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(W)* 등에 의한 ribosomal protection 기작이 주 내성 기작으로 알

† Corresponding author : 051-629-5941, jeonghd@pknu.ac.kr

* 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2015년)의 지원에 의해 연구되었습니다.

려져 있다. 이러한 내성 유전자중 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*는 그람 음성균에서 주로 나타나며, *tet(K)*, *tet(S)*, *tet(W)* 등은 그람 양성균에서 주로 존재한다. 그런데 *tet(M)*은 그람 양성균과 음성균 모두에서 많은 보고가 이루어지고 있으며 (Schwarz et al., 1998; Neela et al., 2009), 다양한 형태의 transposon에 특정 Erythromycin (Em) 내성 유전자와 함께 존재 할 수 있다는 것도 보고되고 있다 (Rice et al., 1998). *tet(M)* 관련 의 대표적인 parent types의 transposon으로 Tn916 과 Tn1545 두 가지를 들 수 있으며 각각 *Enterococcus faecalis* DS16 그리고 *Streptococcus pneumoniae*을 포함한 다양한 내성균에서 보고 되었다 (Rice, 1998; Courvalin and Carlier, 1987). 또한 최근에는 *S. aureus* Mu50에서 transposon으로 추정되는 Tn5801이 보고되기도 하였다 (Kuroda et al., 2001). 흥미로운 것은 이렇게 다양한 근원의 *tet(M)*이 서로 간에 recombination이 이루어지며 그 결과 mosaic 구조가 확인되고 있다는 것이다 (Oggioni et al., 1996; Huys et al., 2004). 그러므로 Tc 내성균이 함유하고 있는 *tet(M)*의 특징적 mosaic 구조를 통해 다른 *tet(M)* 함유 Tc 내성균과의 연관성 또는 그 근원을 추적하는 것이 가능하며, 다양한 환경 내에 나타나는 Tc 내성균 간의 내성 유전자 communication의 위험성도 예측할 수 있다.

현재 R plasmid에 의한 사람과 가축에서 나타나는 내성균 간의 내성특성 전이에 대한 보고는 이루어지고 있으나 (Oppegaard et al., 2001) 해양 환경 또는 수권 내성균이 사람의 내성균 발생과 어떠한 연관성 또는 위험성을 가지고 있는지에 대한 유전적 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 사람과 해양환경에서 분리된 Tc 내성 Staphylococci 중 *tet(M)*을 가진 균주를 선별한 다음, *tet(M)*의 세부적인 유전적 분석을 통하여 사람과 해양환경 분리균 간의 내성 유전자 communication 특성을 유추하고자 하였다.

II. 조사방법 및 내용

1. 균주분리 및 항생제 내성 분석

부산 근교에 위치한 광안리, 이기대, 해운대 연안에서 2009년부터 2010년까지 해수를 샘플링하여 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 으로 단계희석한 후, 희석액 각각을 $0.45 \mu\text{m}$ (pore size) membrane filter (ADVANTEC, Japan) 에 통과시켜 고정하였다. Filter 는 BHIA (Brain heart infusion agar, Difco, Japan) 배지와 Staphylococci 선택배지인 BPA (Baird-parker agar, Difco, Japan)에 올린 다음, 37°C 에서 24 시간 동안 배양하였다. BPA 에서 검은색 집락을 보이는 세균을 Staphylococci 라고 간이동정하였으며, BBL coagulase Plasma, Rabbit with EDTA (BD, USA)를 이용한 coagulase test, 그리고 *S. aureus* 특이적인 primer 를 사용한 PCR 을 이용하여 Staphylococcus spp. 중에서 *S. aureus* 를 동정하였다 (data not shown). 그리고 해양환경에서 분리된 균주 중 Tc 내성을 가지며, *tet(M)*을 가진 Staphylococcus spp. 5 균주는 유전적 분석을 위하여 API Staph test (Biomerieux, France)를 사용하여 세부적인 종을 확인하였다. 사람에서 분리한 *S. aureus* 는 부산 소재의 위생병원에서 2005년 7월부터 2006년 12월까지 분리된 50 개의 균주를 타원구실에서 분양받아 사용하였다 (Lee et al., 2007). 이렇게 분리된 균들에 대해 Tetracycline (Tc), Erythromycin (Em) (Sigma, USA) 등을 사용하여, agar diffusion method 과 로 각 항생제에 대한 내성양상을 조사하였다. 또한, broth dilution method 을 통해 항생제별 균주의 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 값을 구하였다. 두 방법의 검사법과 판정기준은 CLSI (2012)의 기준에 따랐으며, MIC 가 $8 \mu\text{g/ml}$ 이상일 경우에 내성균으로 판별하였다.

2. DNA 분리 및 PCR

Genomic DNA prep kit (Solgent, Korea)를 사용하여 Total DNA의 분리를 실시하였다. 분리된 균주들의 DNA로부터 유전자의 존재를 확인하기 위해, 10X PCR buffer 2 μ l, 200 μ M의 각각의 dNTP, 1 μ M의 sense primer와 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea) 및 template 1 μ g을 첨가한 후 distilled water로 20 μ l가 되도록 했다. PCR 반응은 *tet(M)*을 비롯한 여러 *tet* 유전자와 *erm(A)*를 포함한 *erm* 유전자, 그리고 integrase (*int*) 유전자에 특이적으로 제작된 primer를 이용하여 실시하였다 (<Table 1, 2>). PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension의 반응을 30 cycle 반복 수행한 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension 시켰다. PCR 후 증폭 산물은 0.5 \times TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ l EtBr (Ethidium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem[®] LE Agarose, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc, USA)상에서 전기영동하였다. 결과 확인은 UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하였고, ultraviolet 상에서 검출되는 증폭산물의 길이를 관찰하여 *tet* 유전자의 종류를 확인하였다 (<Table 1>).

3. Cloning 및 염기서열 분석

pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여, 5 μ l의 정제된 PCR 산물을 넣고, 5 μ l 2 \times Rapid Ligation Buffer (60 mM Tris-HCl, pH 7.8, 20 mM DTT, 2 mM ATP 10% PEG), 1 μ l T4 DNA Ligase (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol), 1 μ l pGEM[®]-T Easy Vector를 첨가하고 12 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 incubation 하였다. 반응물은 *E. coli*

DH5 α 에 Heat shock 법으로 transformation 시킨 후, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 μ g/ml과 Ampicillin (Am) 50 μ g/ml가 첨가된 LB 평판 배지 (Luria-Bertani, Difco, USA)에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하여 흰색으로 나타나는 집락을 선택하였다. 이 집락을 Am 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양 후 Gene-all[™] plasmid SV mini kit (General biosystem, Korea)를 사용하여 plasmid를 분리하였다. 염기서열 분석은 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 plasmid 내에 insertion된 염기 서열을 밝힌 후, 각각의 염기 서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 비교하였다.

4. Conjugation

Conjugation은 Fernandez-Astorga et al. (1992)의 방법을 수정하여 실시하였다. Rifampicin (Rp)에 내성을 가지는 *L. garvieae* NG8206를 수용균주로 사용하였으며, 사람과 해양환경에서 분리된 Staphylococci 균주 중 *tet(M)*과 *tet(K)*가 확인된 균주를 공여균주로 사용하여 두 균주의 최종 혼합 농도가 1.0×10^9 cell/ml이 되도록 혼합하였다. 혼합액은 0.22 μ m (pore size) membrane을 사용하여 filtration 한 후, BHIA 배지 위에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 membrane filter는 1 X PBS 내에서 강하게 vortex 하여 세균 현탁액으로 만들고, 적절히 단계 희석하여 Tc 8 μ g/ml, Rp 16 μ g/ml이 첨가된 BHIA 배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. Transconjugant는 선별배지에서 자란 colony로 확인하였으며, transfer frequency는 (transconjugant cell number/recipient cell number)로 계산하였다.

<Table 1> PCR primers for detection of tet and erm genes

| Primer | Genes | Oligonucleotide sequence (5'→3') | Expected size | Accession No. |
|--------|---------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| TMF | <i>tet(M)</i> | GAATCTGAACAATGGGT | 1099bp | U09422 |
| TMR | | CTAACAATTCTGTTCCAGC | | |
| TKF | <i>tet(K)</i> | GTAATGGTACCTGGTAAATC | 329bp | S74032 |
| TKR | | CTATTACCTATTGTCGCTAC | | |
| Em(A)F | <i>erm(A)</i> | GTTCAAGAACAATCAATACAGAG | 421bp | K02987 |
| Em(A)R | | GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC | | |
| Em(B)F | <i>erm(B)</i> | CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC | 359bp | U35228 |
| Em(B)R | | GAATCGAGACTTGAGTGTGC | | |
| Em(C)F | <i>erm(C)</i> | GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC | 572bp | NC_007792 |
| Em(C)R | | GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC | | |

<Table 2> PCR primers of PCR for *int* gene in transposon

| Primer | Oligonucleotide sequence (5'→3') | transposon type | Expected size | Accession No. or Reference |
|----------|----------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------|
| Int-1 | TGACACTCTGCCAGCTTTA | Tn916/1545 | 579bp | X61025 |
| Int-2 | CCATAGGAACTTGACGTTGG | | | |
| Int-5801 | CCGATATTGAGCCTATTGATGTG | Tn5801 | 722bp | De Vries et al., 2009 |
| Int-5801 | GTCCATACGTTCTAAAGTCGTC | | | |

III. 결 과

1. Tc 내성 *Staphylococci*의 내성 유전자 분포

해양환경에서 분리한 *Staphylococcus* spp. 35 균주 중에서 Tc에 내성을 보이는 (Tc^R) 6 균주, Tc와 Em에 동시에 내성을 보이는 (Tc^R+Em^R) 10 균주를 분리하였으며, *S. aureus* 9 균주 중에서는 Tc^R 4 균주, Tc^R+Em^R 1 균주를 분리하였다 (<Table 3>). 사람으로부터 분리된 *S. aureus* 50 균주 중에서는 Tc^R 2 균주, Em에 내성을 보이는 (Em^R) 10 균주, Tc^R+Em^R 12 균주를 분리하였다 (<Table 3>).

이러한 내성 균주들의 내성 유전자 분포를 확인한 결과는 <Table 3>과 같다. 해양환경에서 분리한 *S. aureus* 중 Tc^R 4 균주 모두는 *tet(K)*를 이용

하였으나, Tc^R+Em^R 1 균주는 *tet(M)*을 이용하였다. 그리고 동일 기원의 *Staphylococcus* spp. 중에서 Tc^R 6 균주의 경우 3 균주는 *tet(M)*을, 그리고 3 균주는 *tet(K)*를 각각 이용하였으며, Tc^R+Em^R 6 균주 중에서 *tet(M)*을 이용하는 2 균주는 모두 *erm(B)*를 함께 이용하는 특이성을 보였다. 그러나 이 중 *tet(K)*를 이용하는 4 균주에서는 본 연구에서 분석한 *erm(A)*, (B), (C)가 아닌 다른 Em 내성 유전자를 이용하는 것으로 확인되었다 (<Table 3>). 또한, 해양환경에서 분리한 *Staphylococcus* spp. 중에서는 *tet(M)*과 *tet(K)*를 함께 가지는 균주는 확인되지 않았다.

사람에서 분리된 *S. aureus*의 내성 유전자 분포는 해양환경에서 분리된 것과는 차이를 보였다. 사람에서 분리된 *S. aureus* 중 Tc^R 2 균주에서는 *tet(K)*를 이용하고 있었으며, Em^R 10 균주에서는 *erm(A)* 3 균주와 *erm(C)* 7 균주를 확인하였다.

<Table 3> Genomic characterization of Tc or Em-resistant Staphylococci isolated from environment and human

| Sample (Number of isolates) | Antibiotics resistance ^a | | | | | | | | | | | | | | Tc ^S +Em ^S no resistant genes | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|-----|-----------------|---|---|----------------------------------|---|---|-----|--------|---|---|-----|--|------------|---|---|-----|---|---|---|---|----|
| | Tc ^R | | | Em ^R | | | Tc ^R +Em ^R | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | M | K | M+K | A | B | C | M with | | | | K with | | | | | M + K with | | | UNK | | | | | |
| | | | | | | | A | B | C | UNK | A | B | C | UNK | | A | B | C | | | | | | |
| Environm ental isolate (44) | <i>S. aureus</i> (9) | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | <i>Staphylococ cus spp.</i> (35) | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 19 |
| Human | <i>S. aureus</i> (50) | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 |

^R:Resistant, ^S:Susceptible., UNK, unknown gene type; M, *tet*(M); K, *tet*(K); A, *erm*(A); B, *erm*(B); C, *erm*(C),
^a : Resistance confirmed with agar diffusion test (diameter ≤14mm) and broth dillution test (≥8 µg/ml)

Tc^R+Em^R 12 균주에서는 *tet*(M)을 가지는 8 균주, 그리고 해양환경 중의 Staphylococci와는 다르게 *tet*(M)과 *tet*(K)를 동시에 가지는 4 균주도 나타났다. 이들 모두는 *erm*(A)를 이용하고 있음을 확인하여 *tet*(M)과 *erm*(A)와의 특이적인 상관관계를 확인할 수 있었다(<Table 3>). 그러므로 사람과 해양환경에서 분리한 Staphylococci에서 Tc^R 균주의 출현비율은 유사하였으나, 내성 유전자의 활용에 있어서 해양환경 분리 균주는 사람에서 분리한 Staphylococci와는 달리 *tet*(M)과 *erm*(A)의 높은 상관 관계를 확인할 수 없었다.

2. Tc 내성 유전자의 전이 특성

해양환경에서 분리한 Staphylococci 균주 중 *tet*(M)이 확인된 6균주 그리고 *tet*(K)를 가지는 2 균주를 공여균주로 하고, Rifampicin에 내성을 가지는 *Lactococcus garvieae* NG8206를 수용균주로 하여 내성 유전자의 전이를 분석하였다. 그 결과, 해양환경으로부터 분리된 *Staphylococcus spp.* 중 *tet*(M)과 *erm*(B) 모두를 가지는 2 균주(Y1, HF4)에서만 $1.7 \sim 2.3 \times 10^{-7}$ 의 확률로 수용균주로의 전이가 확인되었지만, *S. aureus* 1균주를 포함한 나머지 *Staphylococcus spp.* 6균주에서는 내성 유전자의 전이가 확인되지 않았다 (<Table 4>).

<Table 4> Transfer of resistant genes from Staphylococci isolates to *L. garvieae* NG8206

| Isolates | Resistant genes | Transferred genes to recipient | Transfer frequency ^a | Transfer ability ^b | Origin of isolates |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Y1 | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B) | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B) | 2.3×10^{-7} | Yes | Marine environment |
| HF4 | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B) | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B) | 1.7×10^{-7} | Yes | |
| D10 | <i>tet</i> (M) | - | - | No | |
| H6 | <i>tet</i> (M) | - | - | No | |
| HF9 | <i>tet</i> (M) | - | - | No | |
| G9 | <i>tet</i> (M) | - | - | No | |
| G4 | <i>tet</i> (K) | - | - | No | |
| Y14 | <i>tet</i> (K) | - | - | No | |
| JY20 | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A) | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A) | 5.8×10^{-7} | Yes | Human |
| JY21 | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A) | <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A) | 8.9×10^{-7} | Yes | |
| JY22 | <i>tet</i> (K) | - | - | No | |

^a : transconjugant cell number/recipient cell number

^b : Transfer ability determined when treated recipient cell identified *tet*(M) gene although Tc^S and *tet*(M) free.

또한 사람에서 분리된 *S. aureus* 중 무작위로 선정된 *tet(M)* 그리고 *erm(A)* 양성의 JY20과 JY21 두 균주의 내성 유전자도 $5.8 \sim 8.9 \times 10^{-7}$ 의 확률로 전이되는 것을 확인할 수 있었으며, *tet(K)*를 가지는 균주에서는 해양환경 균주와 같이 내성 유전자의 전이를 확인할 수 없었다 (<Table 4>). 사람으로부터 분리된 50 균주 중 *tet(M)*만을 단독으로 가지는 균주는 발견 되지 않아 분석할 수 없었다.

3. *tet(M)*의 mosaic 구조 분석

Tc 내성 유전자인 *tet(M)*은 transposon (Tn916, Tn1545, Tn5801)과 깊은 연관관계를 가지고 있다. 이를 확인하기 위해 사람과 해양환경으로부터 분리된 Tc^R Staphylococci의 *tet(M)*을 cloning하여 1920bp인 전체 염기서열을 얻었다. 전체 염기서열과 여러 transposon (Tn916, 1545, 5801)의 *tet(M)* reference 유전자를 비교 분석하여, 그들 사이에 일어나는 recombination에 의한 유전적 mosaic 구조의 특성을 확인하였다. Tn916의 경우, 본 실험실에서 어병세균으로 분리된 *Streptococcus* spp. 균주가 Tn916계열임을 확인하였고 ([Fig. 2]), 이 균주의 *tet(M)* 전체 염기서열

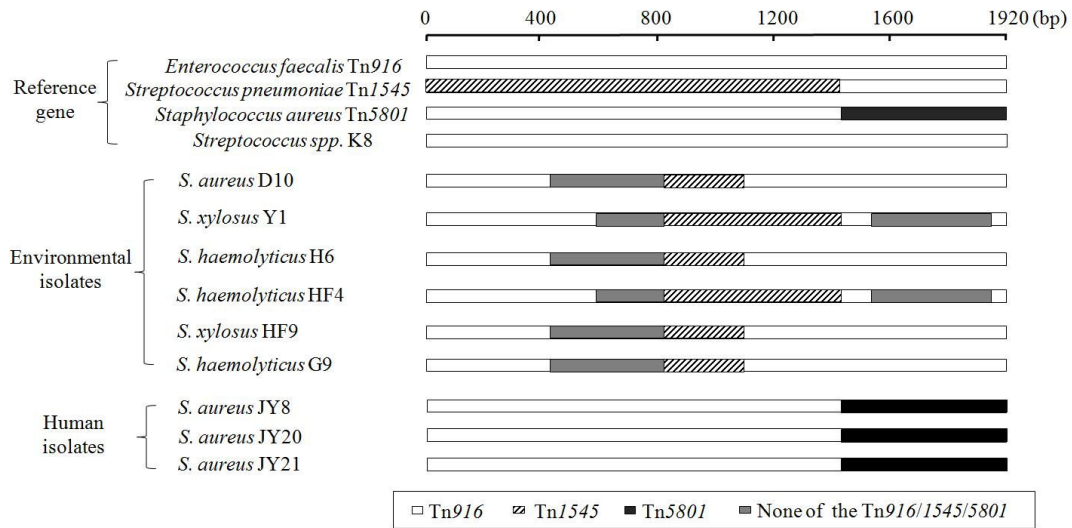
을 *tet(M)* 간 유전자 비교 분석에 Tn916 reference 유전자로 사용하였다.

그 결과, 비록 균주의 세부적인 종은 달랐지만 해양환경으로부터 분리된 Staphylococci의 *tet(M)*은 서로 유사한 mosaic 구조를 보였다 ([Fig. 1]). 또한 염기서열 간의 상동성과 계통수 분석 결과를 통해, 해양환경에서 분리된 Y1/HF4 균주 그룹 그리고 D10/H6/HF9/G9 균주 그룹으로 나뉘는 양상을 확인할 수 있었다 (<Table 5>). 흥미로운 것은 해양환경으로부터 분리된 Tc^R *Staphylococcus* spp.의 *tet(M)* mosaic 구조에서는, Tn916과 Tn1545, Tn5801의 *tet(M)* 어느 것보다도 유사하지 않는 특이한 *tet(M)* 염기서열 부위의 존재를 확인할 수 있었다. 사람에서 분리한 TcR *S. aureus*의 *tet(M)*은 Tn5801 origin과 유사한 mosaic 구조와 상동성을 보여 주었으며, 총 50균주 서로 간의 상동성 또한 99% 이상 유사하였다 (<Table 5>, [Fig. 1]). 또한, 이러한 각 transposon의 종류를 *int* 유전자의 존재 여부를 통해서 확인하였으며, 사람에서 분리되어 *tet(K)*를 가지는 JY22 균주에서는 *int* 유전자가 나타나지 않았다 ([Fig. 2]). Mosaic 구조 분석에 사용한, 해양환경에서 분리된 6균주의 *tet(M)* 전체 염기서열은 GenBank에 등록하였다 (Accession No. KT281947~52).

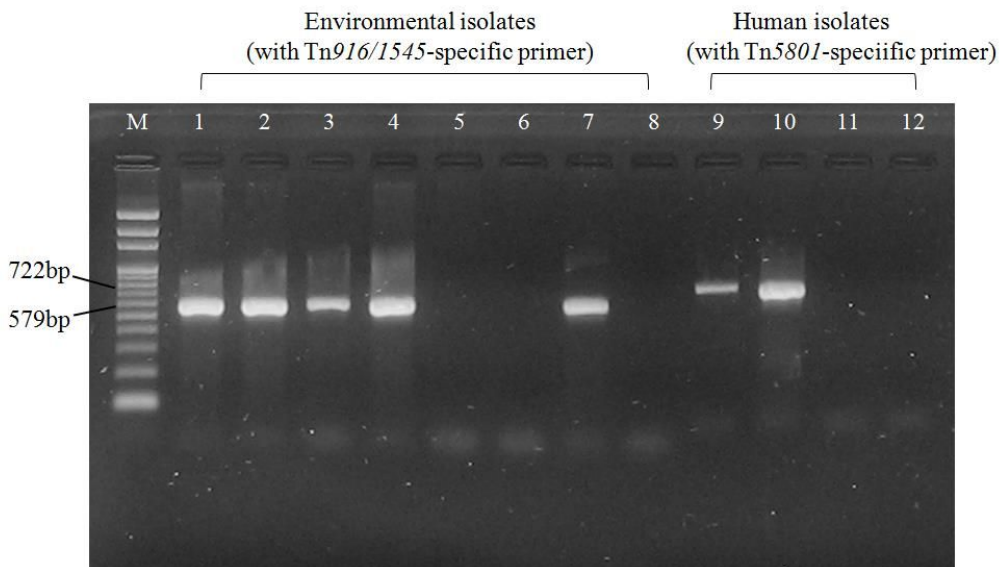
<Table 5> Sequence homology of the *tet(M)* gene in human and environmental Staphylococci isolates to reference genes

| | Environmental isolates | | | | | | Human isolates | | | Reference genes | | |
|--------|------------------------|----|-----|-----|----|-----|----------------|------|------|-----------------|--------|--------|
| | D10 | Y1 | HF4 | HF9 | H6 | G9 | JY8 | JY20 | JY21 | Tn916 | Tn1545 | Tn5801 |
| D10 | | 96 | 96 | 99 | 99 | 99 | 93 | 93 | 93 | 95 | 94 | 93 |
| Y1 | | | 100 | 96 | 96 | 96 | 93 | 93 | 93 | 94 | 95 | 93 |
| HF4 | | | | 96 | 96 | 96 | 93 | 93 | 93 | 94 | 95 | 93 |
| HF9 | | | | | 99 | 100 | 93 | 93 | 93 | 95 | 94 | 93 |
| H6 | | | | | | 99 | 93 | 93 | 93 | 95 | 94 | 93 |
| G9 | | | | | | | 93 | 93 | 93 | 95 | 94 | 93 |
| JY8 | | | | | | | | 99 | 99 | 97 | 92 | 99 |
| JY20 | | | | | | | | | 99 | 97 | 92 | 99 |
| JY21 | | | | | | | | | | 97 | 92 | 99 |
| Tn916 | | | | | | | | | | | 94 | 97 |
| Tn1545 | | | | | | | | | | | | 92 |

사람과 해양환경에서 분리된 Staphylococci의 Tetracycline 내성 유전자의 특성 비교



[Fig. 1] Comparison of the mosaic structures of *tet(M)* in Tc^R Staphylococci from marine environment and human. Each slash, black and open bars are indicating the related *tet(M)* on Tns, 1545, 916 and 5801, respectively. New ORF-*tet(M)* regions detected in Tc^R Staphylococci from marine environment and distinguishable from *tet(M)* found in Tn916/1545/5801 are indicated by gray bar.



[Fig. 2] Agarose gel electrophoresis of amplicon generated by PCR of *int* gene. Lane, 1~6, *tet(M)* from environmental Staphylococci isolates (Y1, HF4, D10, H6, HF9, G9); Lane, 7, *Streptococcus* spp. K8; Lane, 9~11, human isolates (JY20, JY21, JY22); Lane, 8, 12, PCR negative control with distilled water as a template; Lane, M, 100bp DNA ladder.

IV. 고찰

Tc 내성 유전자 중 *tet(M)*은 Tn916/Tn1545 등과 같은 transposon family와의 연관 관계가 높은 R-plasmid 특성을 통해 여러 세균으로 이동이 가능하며, 이 과정에서 다양한 내성균 간에 일어나는 유전자 recombination으로 인하여 mosaic 구조를 가지게 된다고 알려져 있다. 특히, 위험한 세균성 질병인 *Staphylococcus aureus*의 *tet(M)*이 사람과 환경에 존재하는 세균 사이에서 이동 가능하다는 것이 보고되었다 (Soge *et al.*, 2009). 또한, 축산 분야에서도 이와 같은 내성 유전자의 세균 간 이동이 보고된 바가 있으나 (Oppegaard *et al.*, 2001), 해양 세균과 사람 세균간의 내성 특성의 communication에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다.

해양환경에서 분리된 Tc^R *Staphylococcus spp.*의 경우, 총 16 균주 중 *tet(M)*과 *tet(K)*는 각각 5균주 (31%), 7균주 (44%)로 *tet(K)*가 우점적이었으며 해양환경에서 분리된 Tc^R *S. aureus* (5균주)에서도 각각 1균주 (20%)와 4균주 (80%)로 유사한 경향을 보였다. 이는 사람에서 분리된 Tc^R *S. aureus*에서 *tet(M)* (57%)의 이용이 *tet(K)* (14%)보다 높게 나타난 결과와는 명확한 차이가 있었다 (<Table 3>). 그리고 해양환경에서 분리된 균주와 달리 사람에서 분리된 Tc^R *S. aureus*에는 *tet(M)*과 *tet(K)*를 동시에 가지는 균주 (29%)의 비율이 높은 특성을 보였다 (<Table 3>). 이러한 결과는 *Staphylococcus spp.*와 *S. aureus* 라는 균주의 차이 때문일 수 있으므로, 향후 명확한 비교분석을 위해서는 보다 많은 해양환경 유래의 *S. aureus* 분리균이 필요하다고 할 수 있다.

일부 해양환경으로부터 분리된 Tc^R *Staphylococcus spp.* 2 균주에서 *tet(M)*과 *tet(K)* 모두 확인되지 않았는데, 이는 본 연구에서 확인하고자 했던 *tet* 유전자 이외에 다른 종류의 *tet* 유전자가 존재하여 Tc의 내성을 유도하였을 것이라 생각된다. 이러한 결과는 병원시설이나 축산에서 분리한

*Staphylococci*에서 *tet(M)*과 *tet(K)*가 주로 확인되었다는 다른 여러 보고들 (Schmitz *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 1998; Trzcinski *et al.*, 2000)과는 차이가 있었지만, 사람과 해양환경에서 분리한 *Staphylococci*의 Tc 내성을 유도하는 우점적 유전자 간의 차이가 있음은 확인 가능하였다.

또한, 사람에서 분리된 Em^R *S. aureus*에서 *erm(A)* (68%)와 *erm(C)* (32%)가 확인되어 이는 인체에서 분리된 *S. aureus*에서 *erm(A)*와 *erm(C)*가 우점적으로 존재한다는 여러 보고들의 결과와 일치하였으며 (Eady *et al.*, 1993), Tc^R+Em^R 12균주에서는 모두 *tet(M)*과 함께 *erm(A)*만을 확인할 수 있었다 (<Table 3>). 이와는 다르게 해양환경에서 분리된 Tc^R+Em^R에서는 본 연구에서 확인하려 한 *erm(A)~(C)*가 아닌 다른 *erm* 유전자가 *tet(K)*와 함께 나타났으나, 2균주 (33%)에서는 *tet(M)*과 함께 *erm(B)*의 이용이 확인되었다 (<Table 3>). 이는 사람과 해양환경의 Tc와 Em 다제 내성균은 *tet* 과 *erm* 유전자의 활용에 있어서 두 유전자 상호간에 상당한 연관성을 가지고 활용 또는 이용되는 것으로 추정할 수 있다. 즉, 사람 분리균에서는 *tet(M)*과 *erm(A)*의, 그리고 해양환경 분리균에서는 *tet(M)*과 *erm(B)*의 연관성이 특이적으로 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 내성 유전자의 전이 특성을 filter mating 방법으로 확인한 결과, 해양환경에서 분리된 *Staphylococci*의 *tet(M)*과 *erm(B)*, 그리고 사람에서 분리된 *S. aureus*의 *tet(M)*과 *erm(A)*가 수용 균주인 *L. garvieae* NG8206으로 전이되는 것을 확인하였다. 이를 통해 사람과 해양환경 중의 *Staphylococci* 내성 유전자가 어병 세균을 포함한 다른 세균으로도 전이될 가능성이 있다고 여겨진다 (<Table 4>). 하지만 단일의 Tc 내성 유전자를 가지는 균주에서는 전이가 확인되지 않았는데, 이는 *tet(M)*을 포함한 단일 Tc 내성 유전자는 R-plasmid가 아닌 chromosome에 함유되어 있거나 다제 내성균과는 서로 다른 특성의 transferable

plasmid를 가지고 있는 것으로 추정된다. 실제로 국내 병원시설에서 분리된 Tc 내성 *S. aureus*의 *tet(M)* 모두는 chromosome에 존재한다는 보고 (Park et al., 2008)가 있었지만, 본 연구에서 진행한 Em 내성과의 연관 관계에 대한 분석은 실시되지 않았다.

현재까지 국내에서 분리된 Tc^R *S. aureus*에서는 *tet* gene의 분포 정도만이 보고되었으며 (Warsa et al., 1996), *tet(M)* 관련 transposon에 대한 비교분석은 이루어지지 않았다. 하지만 본 연구에서 확인한 결과, 국내에서 분리된 Tc^R *S. aureus*의 *tet(M)*은 모두 Tn5801 type으로 확인되었으며, int 유전자의 확인을 통해서도 이와 동일한 양상을 확인하였다 ([Fig. 2]). 또한, 사람 분리균주의 *tet(K)*에서는 int 유전자가 확인되지 않았는데 ([Fig. 2]), 이는 *tet(K)*가 transposon과는 다른 형태의 plasmid에 존재한다는 결과와 일치하였다 (Warsa et al., 1996). 이러한 사실은 국내에서는 최초의 보고이며, 다만 외국의 경우에 사람에서 분리된 *S. aureus* 균주 중의 일부에서 Tn5801 type의 존재가 확인은 되었지만 대부분의 균주가 Tn916 type으로 우점적임이 확인된 결과와도 상당한 차이가 있다고 할 수 있다 (De Vries et al., 2009). 따라서 국내의 *S. aureus*의 *tet(M)*을 비롯한 내성 유전자는 외국과는 다른 특성을 가질 가능성이 크며, 이는 매우 흥미로운 결과라고 생각한다.

그러나 *tet(M)*의 ORF 염기서열을 비교해 본 결과, 사람과 해양환경 간에는 서로 다른 mosaic 구조의 존재와 함께 Tn916/1545와 Tn5801이 아닌 새로운 부위를 확인할 수 있었다 ([Fig. 1]). 이 부위는 GenBank를 통해 *Enterococcus faecium*에서 보고된 Tn916 계열 (Rizzotti et al., 2009) 등 다른 transposon과 유사하였으나, 본 연구에서 비교 균주로 사용한 *Streptococcus* spp. K8의 Tn916 구조와는 차이가 있었다. 이러한 결과를 통해, 그람 양성균의 *tet(M)* mosaic 구조는 각 균주의 내성 환경에 따라서 다양하게 나타날 수 있다는 것을 확인하였다. 분명히 *Neisseria gonorrhoeae*와

Neisseria meningitidis, 그리고 *Streptococcus pneumoniae* 등에서의 *tet(M)*은 Tn916과 Tn1545를 중심으로 mosaic 구조가 이루어졌으나 (Oggioni et al., 1996), 지속적인 recombination으로 인해 최근에는 매우 다양한 부위가 포함된 mosaic 구조로 빠르게 진화하고 있다고 여겨진다. 그러나 사람과 해양환경에 존재하는 Staphylococci 균주 간에 나타날 수 있는 *tet(M)*의 유전적 특성 비교를 통해, 상호간에는 아직 뚜렷한 유전적 교류가 존재한다는 증거를 확인할 수 없었다. 향후 Staphylococci가 자연광의 노출로 인해 빠른 시간 안에 불활화되는 (Fujioka et al., 2006) 표층 채수의 문제점 등에 의한 분리균주의 수적 제한성을 개선하여, 사람과 해양환경의 내에서 일어나는 Tc 내성의 유전적 교류관계를 더욱 명확히 밝힐 수 있는 연구가 있어야 할 것이다.

References

- CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. Document M100-S22. CLSI, Wayne PA Vol. 32
- Courvalin, P, Carlier, C.(1987). Tn1545: a conjugative shuttle transposon. Mol. Gen. Genet 206, 259-264.
- De Vries, L. E. · Christensen, H. · Skov, R. L. · Aarestrup, F. M. · Agersø, Y.(2009). Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. J Antimicrob Chemother 64(3), 490-500.
- Eady, E. A. · Ross, J. I. · Tipper, J. L. · Walters, C. E. · Cove, J. H. · Noble, W. C.(1993). Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. J Antimicrob Chemother 31(2), 211-217.
- Fernandez-Astorga, A. · Muela, A. · Cisterna, R. · Iriberry, J. · Barcina, I.(1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. Appl Environ Microbiol 58, 392-398.

- Fujioka, R. S. · Unutoa, T. M.(2006). Comparative stability and growth requirements of *S. aureus* and faecal indicator bacteria in seawater. *Water Sci Technol* 54(3),169~175.
- Huys, G. · D'Haene, K. · Collard, J. M. · Swings, J. (2004). Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* 70(3), 1555~1562.
- Kuroda, M. · Ohta, T. · Uchiyama, I. · Baba, T. · Yuzawa, H. · Kobayashi, I. · Cui, L. · Oguchi, A. · Aoki, K. · Nagai, Y. · Lian, J. · Ito, T. · Kanamori, M. · Matsumaru, H. · Maruyama, A. · Murakami, H. · Hosoyama, A. · Mizutani-Ui. Y. · Takahashi, N. K. · Sawano, T. · Inoue, R. · Kaito, C. · Sekimizu, K. · Hirakawa, H. · Kuhara, S. · Goto, S. · Yabuzaki, J. · Kanehisa, M. · Yamashita, A. · Oshima, K. · Furuya, K. · Yoshino, C. · Shiba, T. · Hattori, M. · Ogasawara, N. · Hayashi, H. · Hiramatsu, K.(2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225~1240.
- Lee, J. Y. · Park, J. H. · Moon, K. H.(2007). Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Busan. *Yakhak hoeji* 51(3), 164~168.
- Neela, F. A. · Nonaka, L. · Rahman, M. H. · Suzuki, S.(2009). Transfer of the chromosomally encoded tetracycline resistance gene *tet(M)* from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1095~1101.
- Oggioni, M. R. · Dowson, C. G. · Smith, J. M. · Provvedi, R. · Pozzi, G.(1996). The tetracycline resistance gene *tet(M)* exhibits mosaic structure. *Plasmid* 35(18), 156~163.
- Oppegaard, H. · Steinum, T. M. · Wasteson, Y.(2001). Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol* 67(8), 3732~3734.
- Park, J. H. · Lee, J. Y. and Moon, K. H.(2008). Characterization of tetracycline resistance plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Yakhak Hoeji* 52(4), 279~282.
- Rice, L. B.(1998). Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 42(8), 1871~1877.
- Rizzotti, L., La Gioia, F., Dellaglio, F., Torriani, S.(2009). Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet(M)*, carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96(1),43~52.
- Schmitz, F. J. · Krey, A. · Sadurski, R. · Verhoef, J. · Milatovic, D. · Fluit, A. C. ; European SENTRY Participants.(2001). Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 47(2), 239~240.
- Schwarz, S. · Roberts, M. C. · Werckenthin, C. · Pang, Y. · Lange, C.(1998). Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet Microbiol* 63(2-4), 217~227.
- Soge, O. O. · Meschke, J. S. · No, D. B. · Roberts, M. C. (2009). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *J Antimicrob Chemother* 64(6), 1148~1155.
- Trzcinski, K. · Cooper, B. S. · Hryniewicz, W. · Dowson, C. G.(2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 45(6), 763~770.
- Warsa, U. C. · Nonoyama, M. · Ida, T. · Okamoto, R. · Okubo, T. · Shimauchi, C. · Kuga, A. · Inoue, M.(1996). Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. *J Antibiot (Tokyo)* 49(11), 1127~1132.

-
- Received : 19 October, 2015
 - Revised : 17 November, 2015
 - Accepted : 22 December, 2015