Mutation Patterns of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* Genes Related to Fluoroquinolone Resistance in *Ureaplasma* Species Isolated from Urogenital Specimens

Eun-Jung Cho¹, Yu Yean Hwang¹, Bon-Kyeong Koo¹, Jesoep Park², Young Kwon Kim², and Sunghyun Kim³

¹Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul 06351, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

³Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

비뇨생식기계 검체로부터 분리된 *Ureaplasma* 종의 Fluoroquinolone 내성과 관련된 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자의 돌연변이 양상

조은정¹, 황유연¹, 구본경¹, 박제섭², 김영권², 김성현³

¹삼성서울병원 진단검사의학과, ²건양대학교 의과대학 임상병리학과, ³부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과

Ureaplasma species can normally colonize in the bodies of healthy individuals. Their colonization is associated with various diseases including non-gonococcal urethritis, chorioamnionitis, neonatal meningitis, and prematurity. In 2012, the sum of the resistant and intermediate resistant rates of *Ureaplasma* spp. to ofloxacin and ciprofloxacin was 66.08% and 92.69%, respectively. DNA point mutations in the genes encoding DNA gyrase (topoisomerase II) and topoisomerase IV are commonly responsible for fluoroquinolone resistance. Each enzyme is composed of two subunits encoded by *gyrA* and *gyrB* genes for DNA gyrase and *parC* and *parE* genes for topoisomerase IV. In the current study, these genes were sequenced in order to determine the role of amino acid substitutions in *Ureaplasma* spp. clinical isolates. From December 2012 to May 2013, we examined mutation patterns of the quinolone resistance-determining region (QRDR) in *Ureaplasma* spp. DNA sequences in the QRDR region of *Ureaplasma* clinical isolates were compared with those of reference strains including *U. urealyticum* serovar 8 (ATCC 27618) and *U. parvum* serovar 3 (ATCC 27815). Mutations were detected in all ofloxacin- and ciprofloxacin-resistant isolates, however no mutations were detected in drug-susceptible isolates. Most of the mutations related to fluoroquinolone resistance occurred in the *parC* gene, causing amino acid substitutions. Newly found amino acid substitutions in this study were Asn481Ser in GyrB; Phe149Leu, Asp150Met, Asp151Ile, and Ser152Val in ParC; and Pro446Ser and Arg448Lys in ParE. Continuous monitoring and accumulation of mutation data in fluoroquinolone-resistant *Ureaplasma* clinical isolates are essential to determining the tendency and to understanding the mechanisms underlying antimicrobial resistance.

Keywords: *Ureaplasma* spp., Quinolone resistance-determining region, DNA gyrase, Topoisomerase IV mutations

Corresponding author: Young Kwon Kim
Department of Biomedical Laboratory Science,
College of Medical Sciences, Konyang
University, 158 Gwanjeodong-ro, Seo-gu,
Daejeon 35365, Korea
Tel: 82-42-660-6371
Fax: 82-42-543-6370
E-mail: ykkim3245@konyang.ac.kr

Co-Corresponding author: Sunghyun Kim
Department of Clinical Laboratory Science,
College of Health Sciences, Catholic University
of Pusan, 57 Oryundae-ro, Geumjeong-gu,
Busan 46252, Korea
Tel: 82-51-510-0560
Fax: 82-51-510-0568
E-mail: shkim0423@cup.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2016 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: April 3, 2016
Revised: April 23, 2016
Accepted: April 27, 2016

서 론

Ureaplasma 종은 일반적으로 인체의 호흡기계나 비뇨기계의 점막에 집락을 형성하기 때문에 건강한 성인의 요도에서 분리될 경우 통상적으로 상재균으로 간주한다. 하지만, 면역력이 약해진 경우 기회감염균으로서 비임균성 요도염, 자궁경부염, 자궁내막염, 산후열, 전립선염, 부고환염, 불임, 신우신염, 관절염, 요로 결석 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 특히 임신부에서의 감염은 산과적 합병증인 조기 분만진통과 조기 양막 파열등의 원인이 되고, 자궁내 태아 발육지연, 저체중아 출산을 유발한다. 또한, 신생아의 경우 산모로부터의 수직감염에 의한 신생아 폐렴, 만성 폐 질환, 균혈증, 뇌수막염의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[1-4].

세포벽이 결합되어 있는 *Ureaplasma* 종과 *Mycoplasma* 종은 β -lactam 계 항생제와 glycopeptides와 같이 세포벽 합성 저해 항생제들에 대한 자연 내성을 가지므로 감염 치료에 사용되는 항생제의 종류가 매우 제한적이다. 따라서 tetracycline과 macrolide와 같이 단백질 합성에 영향을 주는 항생제 또는 DNA 복제를 억제하는 fluoroquinolone과 같은 항생제가 치료에 주로 사용된다[5]. 이 중 fluoroquinolone 약제는 세균 DNA의 복제(replication), 전사(transcription), 복구(repair)에 필수적 효소인 DNA gyrase (topoisomerase II)와 topoisomerase IV를 억제한다. 이 두 효소에 돌연변이가 생기면 fluoroquinolone 약제에 대한 내성이 생긴다. 2009년 발표된 국내 논문에 의하면 진주 소재의 병원에서 fluoroquinolone 계열의 약제인 ofloxacin (OFL)과 ciprofloxacin (CIP)에 내성인 *Ureaplasma* 종의 비율은 각각 21.9%와 4.8%였고, 중등도 내성의 비율은 각각 62.9%와 39%였다[4]. 그리고 2011년 루마니아에서 발표된 논문에 의하면 OFL과 CIP에 내성 또는 중등도 내성인 *Ureaplasma* 종의 비율은 72.04%로 매우 높았다[6].

따라서 본 연구에서는 국내의 비뇨생식기계 검체로부터 분리된 *Ureaplasma* 종의 fluoroquinolone 계열 약제에 대한 내성정도를 파악하고 내성과 관련된 *Ureaplasma* 종의 DNA gyrase와 topoisomerase IV를 각각 암호화하고 있는 유전자인 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자의 돌연변이 여부 및 그 양상을 조사하여 fluoroquinolone 계열 약제 내성과 특정 유전자의 돌연변이와의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

2012년 12월부터 2013년 5월까지 서울소재 상급병원인 S 의원의 응급실, 산부인과, 비뇨기와 환자의 비뇨생식기계 검체로부터 *Ureaplasma* 종으로 분리 동정된 임상 분리 균주를 본 연구에 사용하였다. *Ureaplasma* 종으로 동정된 임상 분리 균주는 총 92주였으며, 이 중 항생제 감수성 결과가 불분명한 13주를 결과 분석에서 제외하였고, *Ureaplasma* 종으로 단독 분리된 79개를 대상으로 fluoroquinolone 약제에 대한 감수성 양상을 기준으로 4개의 그룹으로 분류하였다(Table 1).

OFL과 CIP 모두에서 내성을 나타낸 경우를 1그룹으로, OFL과 CIP 중 한 개의 약제가 내성을 나타낸 경우를 2그룹으로, OFL과 CIP 중 한 개 이상의 중등도 내성(intermediate resistance)을 나타낸 경우를 3그룹으로, OFL과 CIP 모두에서 감수성을 나타낸 경우를 4그룹으로 분류하였다. 네 개의 그룹 중 강한 내성 양상을 나타낸 1, 2그룹과 강한 감수성 양상을 나타낸 4그룹을 대상으로 하여 quinolone resistance-determining region (QRDR) 부위의 돌연변이 양상을 분석하였다. 임상 분리 균주의 돌연변이 양상 비교 분석을 위한 대조 균주로 표준 균주인 *U. urealyticum* serovar 8 strain (ATCC 27618, AAYN02000002.1)와 *U. parvum* serovar 3 strain (ATCC 27815, CP000942.1)의 QRDR 부위의 염기서열을 이용하였다. 염기서열 상동성 분석을 위한 데이터베이스는 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)를 통해 얻었다.

2. 연구 방법

1) 유전체 DNA 추출

Mycoplasma IST-2 kit (bioMerieux Co., Macrcy-l'Etoile, France)와 A7 한천배지(bioMerieux Co., Macrcy-l'Etoile,

Table 1. Classification of *Ureaplasma* spp. by fluoroquinolone antibiotics susceptibilities

Group	AST	No. of samples (%)	
1	OFL R, CIP R	17 (21.52)	17 (21.52)
2	OFL I, CIP R	33 (41.77)	34 (43.03)
	OFL S, CIP R	1 (1.27)	
3	OFL I, CIP I	6 (7.60)	25 (31.65)
	OFL I, CIP S	1 (1.27)	
	OFL S, CIP I	18 (22.78)	
4	OFL S, CIP S	3 (3.80)	3 (3.80)
Total		79 (100)	

Abbreviation: AST, antimicrobial susceptibility test; OFL, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin; R, resistance; I, intermediate resistance; S, susceptible.

France)에서 동시에 *Ureaplasma* 종으로 동정된 균주를 대상으로 유전체 DNA를 추출하기 위해 Mycoplasma IST-2의 R2 용액을 실험 전까지 -20°C에 냉동보관 하였다. 배양된 임상 분리 균주가 냉동보관 되어있는 Mycoplasma IST-2의 R2 용액을 실온에서 해동시킨 후 1.5 mL Eppendorf 튜브에 분주하였다. 배지 성분을 제거하기 위해 17,979 g로 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다. 1 mL의 멸균 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 17,979 g로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 배지 성분의 완전한 세척을 위해 이 과정을 2회 반복하였다. 멸균 증류수 50 µL를 세포 침전물에 첨가한 후 heating block에서 100°C로 5분 동안 가열하였다. 가열 후 17,979 g로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 중합효소 연쇄반응을 위한 주형 DNA로 사용하였다.

2) 종 동정과 염기서열 분석을 위한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

Ureaplasma 종의 동정과 QRDR 부위의 돌연변이 양상 분석을 위해 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, 그리고 *parE* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머(primer) 쌍의 제작은 기존 다른 연구 그룹들에서 종 동정과 QRDR 부위의 염기서열 분석을 위해 사용하였던 염기서열을 참조하여 제작하였다(Table 2). 중합효소 연쇄반응을 위한 PCR premix는 AccuPower PCR PreMix kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였다. 종 동정과 QRDR 부위의 유전자를 증폭하기 위해 10 pmol의 전방 프라이머(forward primer) 2 µL, 10 pmol의 후방 프라이머(reverse primer) 2 µL, 주형 유전체 DNA 5 µL를 첨가하였고, 최종적으로 반응액의 용량이 20 µL가 되도록 멸균 증류수를 첨가하였다. 염기서열 분석을 위한 모든 핵산 증폭반응은 ABI Thermal Cycler 9700 기기(Applied Biosystems Co., Foster, USA)을 이용하여 수행하였다. 핵산 증폭을 위한 반응 조건은 전 해리 반응(predenaturation)을 위해 94°C에서 5분간 1회 반

응시킨 후 해리 반응(denaturation)을 위해 94°C에서 1분, 프라이머 부착반응(primer annealing)을 위해 61°C에서 1분, 신장반응(extension)을 위해 72°C에서 1분 조건으로 반응하였고, 이 반응을 30회 반복하였으며, 마지막으로 최종 신장반응(final extension)을 위해 72°C에서 5분간 1회 반응하였다. 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭된 표적 DNA의 확인을 위해 1.5% TAE agarose gel를 이용해 150 volt에서 30분간 전기영동 하였다. 이후 ethidium bromide (EtBr) 염색 용액을 이용해 증폭된 증폭 산물의 염색을 수행하였으며, Gel document system (InGenius Co., Frederick, USA)을 이용해 염색된 증폭 산물을 관찰하였다.

3) 유전체 DNA 염기서열 분석(sequence analysis) 및 돌연변이 양상 분석

중합효소 연쇄반응으로부터 얻은 증폭 산물의 정제를 위해 AccuPrep PCR Purification kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였으며, 정제된 증폭 산물을 *Ureaplasma* 종의 QRDR 부위 염기서열 분석을 위해 사용하였다. 유전체 DNA 염기서열 분석은 ABI PRISM 3730XL 기기(Applied Biosystems Co., Foster, USA)를 사용하였다. 임상 균주로부터 분석된 QRDR 염기서열은 Sequencher 5.1 software (Gene Codes Co., Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 표준 균주의 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 부위의 염기서열과 대조하여 분석하였다. 기존의 연구들을 참고하여 *U. parvum*으로 동정된 경우에는 표준 균주 *U. parvum* serovar 3 strain (ATCC 27815)과 염기서열을 대조하였고, *U. urealyticum*으로 동정된 경우에는 *U. urealyticum* serovar 8 strain (ATCC 27618)과 대조하였다[9].

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study for PCR amplification

Name	Target	Sequence (5'→3')	Tm (°C)	Size (bp)	Reference
U-parF	<i>Ureaplasma parvum</i>	CATCATTAAATGTCGGCCGAATGG	56.6	812	Kong et al. [7]
U-parR		TAGAATCCGACCATATGAATTTTTA	57.4		
U-ureF	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	CAGGATCATCAAATCAATTCAC	65.8	418	
U-ureR		CATAATGTTCCCTTCGTCTA	57.6		
gyrA_F	<i>gyrA</i>	TTGCTGCTTTCGAAAACGG	55.2	336	Bebear et al. [8]
gyrA_R		CTGATGGTAAACACTTGG	53.0		
gyrB_F	<i>gyrB</i>	CCTGGTAAATTAGCTGACTG	56.4	310	
gyrB_R		TTCGAATATGACTGCCATC	53.0		
parC_F	<i>parC</i>	ACGCAATGAGTGAATTAGG	53.0	309	
parC_R		CACTATCATCAAAGTTTGGAC	55.5		
parE_F	<i>parE</i>	ATGGGCGGAAAATTAACGC	55.2	313	
parE_R		CTTGGATGTGACTACCATCG	58.4		

Table 3. Results of antimicrobial susceptibility tests with *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* clinical isolates in 2012

	<i>Ureaplasma</i> spp. N (%)			<i>M. hominis</i> N (%)			Mixed infection of <i>U. urealyticum</i> & <i>M. hominis</i> N (%)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Doxycycline	331 (96.78)	3 (0.88)	8 (2.34)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	37 (92.50)	1 (2.50)	2 (5)
Josamycin	339 (99.12)	3 (0.88)	0 (0)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	36 (90)	2 (5)	2 (5)
Ofloxacin	116 (33.92)	157 (45.91)	69 (20.18)	5 (71.43)	2 (28.57)	0 (0)	11 (27.50)	16 (40)	13 (32.50)
Erythromycin	272 (79.53)	60 (17.54)	10 (2.92)	0 (0)	0 (0)	7 (100)	1 (2.50)	5 (12.50)	34 (85)
Tetracycline	329 (96.20)	2 (0.58)	11 (3.22)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	35 (87.50)	0 (0)	5 (12.50)
Ciprofloxacin	25 (7.31)	96 (28.07)	221 (64.62)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (7.50)	9 (22.50)	28 (70)
Azithromycin	299 (87.43)	38 (11.11)	5 (1.46)	0 (0)	5 (71.43)	2 (28.57)	3 (7.50)	14 (35)	23 (57.50)
Clarithromycin	281 (82.16)	53 (15.50)	8 (2.34)	0 (0)	0 (0)	7 (100)	4 (10)	3 (7.50)	33 (82.50)
Pristinamycin	342 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	39 (97.50)	0 (0)	1 (2.50)
Total		342			7			40	

Abbreviation: S, susceptible; I, intermediate resistance; R, resistance N, number.

Fig. 1. The results of PCR amplification to identify *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. Abbreviation: U-par, *Ureaplasma parvum*; U-ure, *Ureaplasma urealyticum*. **Fig. 2.** PCR amplification of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes from *Ureaplasma* clinical isolates.

결 과

1. *Ureaplasma* 종의 항생제 내성 양상

2012년 1년 동안 서울소재 상급병원인 S 의료원의 진단검사의학과에 *Ureaplasma* 및 *Mycoplasma* 검사 의뢰 건수는 총 1,055건 이었고, 이 중 389건이 *Ureaplasma* 및 *Mycoplasma* 검사 양성을 나타내어 양성률은 36.87%였다. 양성 검체 중 *Ureaplasma* 종의 단독 감염형태가 342건(87.91%)으로 가장 많았고, *Ureaplasma* 종과 *M. hominis*의 혼합 감염형태가 40건(10.28%), *M. hominis*의 단독 감염형태가 7건(1.80%)이었다(Table 3). *Ureaplasma* 종 양성 검체 중 fluoroquinolone계 항생제인 OFL과 CIP의 내성율은

Fig. 3. Resistance and intermediate resistance rates of *Ureaplasma* spp. to antibiotics in 2012.

각각 20.18%와 64.62%였으며, 중등도 내성은 45.91%와 28.07%, 감수성은 33.92%와 7.31%로 나타났다. OFL과 CIP 약제에 대한 내성율과 중등도 내성율을 합한 총 내성율은 각각 66.08%, 92.69%로 OFL에 대해서는 절반 이상이 내성을 나타냈으며, CIP에 대해서는 대부분(약 92% 이상)이 내성을 나타냈다(Fig. 3). *Ureaplasma* 종과 *M. hominis* 혼합 감염 시 OFL과 CIP의 내성율은 32.50%와 70%였으며, 40%와 22.50%가 중등도 내성을 나타내어 완전 내성율과 중등도 내성율을 합한 총 내성율이 72.50%, 92.50%를 나타냈다. 이는 *Ureaplasma* 종의 단독 감염 시 완전 내성과 중등도 내성을 합한 총 내성율이 66.08%, 92.69%인 것과 비교하였을 때 OFL의 내성도가 더 높아짐을 확인할 수 있었다.

2. Fluroquinolone 계 항생제 내성 균주의 돌연변이 분석

1) 제 1그룹의 QRDR 부위 돌연변이 분석

Ureaplasma 종의 QRDR부위에 존재하는 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자에 변이가 생겨 다른 아미노산으로 치환될 경우 fluoroquinolone계의 약제에 대한 내성을 갖게 된다고 알려져 있

으며, 본 연구에서는 4가지의 변이를 관찰할 수 있었다. OFL과 CIP 모두에 대해 내성을 나타낸 제1그룹의 검체 중 OFL $\geq$ 4과 CIP $\geq$ 2을 나타낸 17건의 검체를 대상으로 QRDR 부위의 염기서열 분석을 하였다. 그 결과 17건 중 3건은 PCR에 의한 증폭이 이루어지지 않아 염기서열 분석을 실시할 수 없었다. 17건 중 PCR에 의한 증폭이 이루어진 14건의 QRDR 부위의 염기서열 분석 결과, GyrB의 아미노산 481번 부위가 asparagine에서 serine (A1442G)으로 치환된 것을 1건 확인하였고, ParC의 아미노산 83번 부위가 serine에서 leucine (C248T)으로 치환된 경우가 9건, 아미노산 87번 부위가 glutamic acid에서 lysine (G259A)으로 치환된 경우가 3건, ParE의 아미노산 446번 부위가 proline에서 serine (C1336T)으로 치환된 경우가 1건이었다. 아미노산 결사슬의 특성에 따른 특징을 확인해 본 결과 GyrB에서는 asparagine이 serine으로 치환되어 극성의 변화는 없었다. ParC에서는 serine에서 leucine으로 치환되어 극성에서 비극성으로 아미노산의 특성이 변화됨을 확인할 수 있었으며, glutamic acid가 lysine으로 치환되어 산성에서 염기성으로 아미노산의 특성이 변화됨을 확인하였다. ParE에서는 proline이 serine으로 치환되어 비극성에서 극성으로 아미노산의 특성이 변화됨을 알 수 있었다.

2) 제 2그룹의 QRDR부위 돌연변이 분석

OFL에 대해 중등도 내성, CIP에 대해 완전 내성을 나타낸 제2그룹의 검체 중 15건의 검체를 대상으로 QRDR 부위의 염기서열 분석을 실시하였다. 그 결과 ParC의 아미노산 83번 부위가 serine에서 leucine (C248T)으로 치환된 경우가 1건, 아미노산 82번 부위가 aspartic acid에서 asparagine (G244A)으로 치환된 경우가 2건, 그리고 염기서열 447 부위의 T가 삭제되어 아미노산 149번 부위가 phenylalanine에서 leucine으로, 150 부위가 aspartic acid에서 methionine으로, 151 부위가 aspartic acid에서 isoleucine으로, 152번 부위가 serine에서 valine으로 치환된 경우가 3건이었다. ParE의 아미노산 448번 부위가 arginine에서 lysine (G1343A)으로 치환된 경우는 3건이었다. 아미노산 결사슬의 특성에 따른 특징을 확인해 본 결과 ParC에서는 serine에서 leucine으로 치환되어 극성에서 비극성으로, aspartic acid에서 asparagine으로 치환되어 산성에서 중성으로 아미노산의 특성이 변화됨을 확인하였다. 염기서열 447 부위의 T가 삭제됨으로 인해 phenylalanine에서 leucine으로 치환되었으나 극성의 변화는 없었고 150 부위가 aspartic acid에서 methionine으로 치환되어 산성에서 중성으로, 151 부위가 aspartic acid에서 isoleucine으로 치환되어 산성에서 중성으로, 152번 부위가 serine에서 valine으로 치환되어 극성에서 비극성으로 아미노산의 특성이 변화됨을 확인할 수 있었다.

ParE에서는 arginine에서 lysine으로 치환되어 산성에서 산성으로 아미노산 특성 변화는 확인할 수 없었다.

3) 제 4그룹의 QRDR부위 돌연변이 분석

OFL $\leq$ 1, CIP $\leq$ 2로 두 가지 약제에서 모두 감수성을 나타낸 제4그룹의 3건의 검체를 대상으로 QRDR 부위의 염기서열 분석을 하였다. 3 건의 검체 모두에서 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 유전자의 아미노산 및 DNA 염기서열의 돌연변이가 확인되지 않았으며, ParE 유전자의 DNA 1473 부위에서 T가 C로 치환됨이 확인되었지만, 아미노산의 변환은 확인되지 않았다.

4) Fluroquinolone 계 항생제 내성 균주의 돌연변이 양상 비교 분석

기존 연구의 보고들과는 달리 본 연구에서는 *gyrA* 유전자의 염기서열 치환이 확인되지 않았으며, GyrB의 481번째 아미노산의 asparagine에서 serine으로 치환됨을 확인하였다. ParC에서는 149번째 아미노산의 phenylalanine에서 leucine으로의 치환, 150번째 아미노산의 aspartic acid에서 methionine으로의 치환, 151번째 아미노산의 aspartic acid에서 isoleucine으로의 치환, 152번째 아미노산의 serine에서 valine으로의 치환을 확인하였고, ParE에서는 446번째 아미노산의 proline에서 serine으로의 치환, 448번째 아미노산의 arginine에서 lysine으로의 치환을 추가로 발견할 수 있었다. 또한, ParC의 82번째 아미노산의 aspartic acid에서 asparagine으로 치환, 83번째 아미노산의 serine에서

Table 4. Summary of amino acid changes in QRDR with fluoroquinolone resistant *Ureaplasma* isolates between 2002 and 2014

Authors	Amino acid changes in QRDR
Zhang et al. [10]	GyrA: Asp112Glu ParC: Ser83Leu
Bebear et al. [11]	GyrA: Asp112Glu ParC: Ser83Leu, Glu87Lys, Ala125Thr, Ala136Thr
Duffy et al. [12]	GyrA: Gln104Lys ParC: Ser83Leu, Ala88Gly, Ser301Gly, Ala734Thr ParE: Ala457Thr
Beeton et al. [13]	ParC: Asp82Asn
Kamiya et al. [14]	GyrA: Asp112Glu ParC: Ser83Leu
Cho et al. (in this study)	GyrB: Asn481Ser ParC: Ser83Leu, Asp82Asn, Glu87Lys, Phe149Leu, Asp150Met, Asp151Ile, Ser152Val ParE: Pro446Ser, Arg448Lys*

*Boldface indicate that newly found amino acid substitutions in this study.

leucine으로 치환, 87번째 아미노산의 glutamic acid에서 lysine으로 치환됨이 이전 보고와 동일하게 나타남을 확인할 수 있었다 (Table 4).

고 찰

Fluoroquinolone 계 항생제들에 대한 내성을 갖는 기전은 다양하게 나타나는데, 세균이 지닌 효소의 돌연변이, 세균의 상승된 세포질 막의 투과성, drug efflux의 활성화, Qnr 단백질(quinolone resistance protein)의 발현 등이 대표적이다[10]. 이 중 DNA gyrase와 topoisomerase IV 유전자에 돌연변이가 생길 경우 fluoroquinolone 계 약제들이 이 효소들의 활동을 방해하지 못하게 하여 fluoroquinolone 계 항생제들에 대한 내성을 나타내게 된다. DNA gyrase는 A와 B 2개의 소단위로 이루어져 있으며, *gyrA*와 *gyrB* 유전자에 의해 암호화되어 있고, DNA의 ATP-dependent negative supercoiling의 촉매작용을 한다고 알려져 있다. Topoisomerase IV는 *parC*와 *parE* 유전자에 의해 암호화되어 있으며, C2E2 4개의 소단위로 이루어져 있고 염색체 DNA의 해리작용에 필수적인 효소로 알려져 있다[11].

2002년 Zhang 등[12]의 보고에 의하면 fluoroquinolone 계 항생제에 내성을 나타낸 *Ureaplasma* 중 GyrA의 112번째 아미노산이 Asp에서 Glu로 치환, ParC 유전자 83번째 아미노산이 Ser에서 Leu으로 치환됨을 밝혀냈다. 또한 2003년 Bebear 등[13]은 *Ureaplasma* 중 GyrA의 112번째 아미노산이 Asp에서 Glu로 치환되고 ParC의 83번째 아미노산이 Ser에서 Leu으로 치환됨을 재확인 했을 뿐만 아니라 87번째 아미노산이 Glu에서 Lys로 치환, 125번째 아미노산이 Ala에서 Thr로 치환, 136번째 아미노산이 Ala에서 Thr로 치환됨을 보고하였다. 2006년 Duffy 등[14]의 보고에 따르면, *Ureaplasma* 종의 GyrA의 104번째 아미노산이 Gln에서 Lys으로 치환되고, ParC 유전자의 83번째 아미노산이 Ser에서 Leu으로 치환, 88번째 아미노산이 Ala에서 Gly으로 치환, 301번째 아미노산이 Ser에서 Gly으로 치환, 734번째 아미노산이 Ala에서 Thr으로 치환되며, ParE의 457번째 아미노산이 Ala에서 Thr로 변화됨을 확인하였다. 2009년 Beeton 등[15]은 *Ureaplasma* 중 ParC의 82번째 아미노산이 Asp에서 Asn로 치환됨을 보고하였고, 2012년 Yasuyoshi Kamiya 등[13-16]은 GyrA의 112번째 Asp에서 Glu으로 치환, ParC의 83번째 아미노산이 Ser에서 Leu으로 치환됨을 보고하였다.

본 연구에서는 fluoroquinolone 계 항생제인 OFL과 CIP의 감수성 검사 결과에 따라 *Ureaplasma* 종을 4그룹으로 나누어 QRDR 부위의 돌연변이를 여부를 분석해 본 결과, 항생제들에 내성을 보

인 검체들에서 *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자의 DNA 염기서열과 아미노산 치환을 확인할 수 있었다. 기존 연구에서 보지 못했던 GyrB의 Asn481Ser, ParC의 Phe149Leu, Asp150Met, Asp151Ile, Ser152Val, ParE의 Pro446Ser, Arg448Lys로 아미노산 변환을 추가로 확인할 수 있었고, 아미노산 특성 또한 변화됨을 확인할 수 있었다. 반면에 이 항생제들에 대해 감수성을 나타낸 균주들에서는 DNA 수준에서의 점 돌연변이(point mutation)가 나타났으나, 아미노산 수준에서는 변화가 없는 잠재 돌연변이(silent mutation)임을 알 수 있었다. 최종적으로 fluoroquinolone 계 항생제들에 대한 내성을 나타낸 *Ureaplasma* 종에서 ParC 부위의 아미노산 치환이 가장 많이 발견된 것으로 보아 topoisomerase IV 유전자의 돌연변이가 fluoroquinolone 계 항생제들에 대한 내성과 밀접한 관련이 있음을 추정할 수 있다.

본 연구에서 CLSI M43-A 가이드라인을 기준으로 균주의 항생제 감수성검사 결과가 OFL $\geq$ 4, CIP $\geq$ 2일 때 내성이고, OFL $\leq$ 1, CIP $\leq$ 1일 때 감수성이라는 것을 알 수 있었지만 각 임상 분리 균주별로 정확한 MIC를 알 수는 없었다. 추후 정확한 최소억제농도(MIC)와 돌연변이 유전자와의 상관관계를 분석한다면 항생제 내성의 정확한 원인을 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 본 연구에서는 임상 분리 균주의 돌연변이 양상 비교 분석을 위해 대조 균주로 표준 균주 *U. parvum* serovar 3 strain (ATCC 27815)의 QRDR 부위의 염기서열을 이용하였다. 그러나 *U. parvum*은 혈청형 3형뿐만 아니라 1, 6, 14형도 포함하고 있으므로 혈청형에 따른 polymorphism에 의한 염기서열의 차이가 있을 수 있다. 따라서 빈번히 나온 *parE* 유전자의 T1473C 치환은 비록 아미노산 수준의 치환은 없었지만, 혈청형에 따른 polymorphism 일 가능성이 있고, 본 연구에서 밝혀진 항생제 감수성에 영향을 끼치는 다른 돌연변이 역시 단순한 혈청형 차이에 따른 polymorphism 일 수도 있음을 배제할 수는 없다. 그리고 제2그룹을 실험하던 중 *U. urealyticum* 균주가 3주 동정 되었으나 일부 시료에서 염기서열 분석상 mixed peak를 보여 정확한 돌연변이를 확인할 수 없어 *U. urealyticum*의 fluoroquinolone 내성과 관련한 돌연변이를 정의하지 못하였다. 그러나 본 연구를 통해서 임상에서 *U. parvum*이 *U. urealyticum*보다 동정율이 높음을 알 수 있었다.

기존 배양법에 의존한 *Ureaplasma* 종의 균 동정과 항생제 감수성 검사는 작업의 전처리 과정이 매우 복잡하고 배양을 위해 최소 이를 이상의 시간이 소요된다. 또한 항생제 감수성시험 결과를 phenol red 지시약의 색깔 변화로 판단하기 때문에 결과의 해석이 매우 주관적으로 이루어져 검사자 간에 서로 다른 결과를 낼 수 있다는 제한점이 있다. 하지만 본 연구에서와 같이 기존의 배양을 기초로 한 검사에 분자진단학적 검사법을 추가로 시행할 경우, 보다

빠르고 정확한 원인균 동정 및 항생제 감수성 검사를 시행할 수 있을 뿐만 아니라, 여러 항생제에 대한 내성과 이와 관련된 유전자들의 돌연변이 양상 간의 상관관계를 밝히는 데에도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 이렇게 항생제 내성과 관련된 유전자들의 돌연변이 양상에 대한 다년간의 자료 조사와 축적은 새로운 유전자 표적 항생제 발굴 및 항생제 내성 양상의 지속적인 감시체계 구축을 위해 필수적일 것으로 사료된다.

요 약

Fluoroquinolone 계 항생제의 광범위한 사용으로 인해 이 약제에 대한 내성 *Ureaplasma* 종의 분리 비율이 높아지고 있다. Fluoroquinolone 계 항생제 내성은 주로 DNA gyrase와 topoisomerase IV 유전자의 돌연변이로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. DNA gyrase는 A와 B 2개의 소단위로 이루어져 있으며, *gyrA*와 *gyrB* 유전자에 의해 암호화되어 있고, Topoisomerase IV는 *parC*와 *parE* 유전자에 의해 암호화되어 있다. 본 연구가 진행된 서울의 1개 3차 병원에서 2012년부터 2013년까지 1년 동안 *Ureaplasma* 종의 fluoroquinolone 계 항생제인 OFL과 CIP의 항생제감사 감수성 결과를 분석한 결과 내성과 중등도를 합산할 경우 66.08%, 92.69%로 매우 높은 내성 비율을 보였다. 이에 *Ureaplasma* 종을 OFL과 CIP에 대한 감수성을 기준으로 4개 그룹으로 분류하여 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자의 돌연변이 여부를 검사하여 항생제 내성과의 관련성을 밝히고자 하였다. 그 중 *parC* 유전자의 돌연변이 빈도가 높아 topoisomerase IV의 돌연변이가 fluoroquinolone 계 약제에 대한 내성과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 *GyrB*의 Asn481Ser, *ParC*의 Phe149Leu, Asp150Met, Asp151Ile, Ser152Val, *ParE*의 Pro446Ser, Arg448Lys을 추가로 발견할 수 있었다. 최근 fluoroquinolone 계 항생제의 사용이 증가하고 있기 때문에 추후 *Ureaplasma* 종의 fluoroquinolone 계 항생제 내성에 대한 지속적인 모니터링이 필수적일 것으로 사료되며, 이와 관련한 유전자의 돌연변이 양상과의 상관관계를 분석하여 기존 배양검사의 단점을 보완할 수 있는 분자 진단학적 검사법의 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

1. Kim SG, Sung SJ, Choi HS, Kim EC, Suk JS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* using urea broth and commercial medium Mycoscreen GU. Korean J Clin Lab Sci. 1997;29:74-80.
2. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and *ureaplasmas* as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):757-789.
3. Choi M, Parl I. Genetic classification and antimicrobial resistance of *Ureaplasma urealyticum* isolated from urine. J Bacteriol Virol. 2012;42(2):156-161.
4. Koh E, Kim S, Kim IS, Maeng KY, Lee SA. Antimicrobial susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. Korean J Clin Microbiol. 2009;12(4):15-162.
5. Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Therapeutic considerations for *Ureaplasma urealyticum* infections in neonates. Clin Infect Dis. 1993;17(Suppl 1):S208-214.
6. Mihai M, Vaneltin N, Anton G, Coralia B, Nora M, Demetra S. High prevalence of fluoroquinolones resistance in *Ureaplasma* and *Mycoplasma* strains isolated from infertile women under initial evaluation in North-east Romania. Rom Biotechnol Lett. 2011;16(1):5859-62.
7. Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. Int J Syst Bacteriol. 1999;49(Pt 4):1879-1889.
8. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Gruson D, Lefrancois M, Bebear C. In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(9):2557-2560.
9. Robertson JA, Stemke GW, Davis JW Jr, Harasawa R, Thirkell D, Kong F, et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* spp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52(Pt 2):587-597.
10. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006;12(1):83-88.
11. Hooper, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin Infect Dis. 1998;27(Suppl 1):S54-63.
12. Zhang W, Wu Y, Yin W, Yu M. Study of isolation of fluoroquinolone-resistant *Ureaplasma urealyticum* and identification of mutant sites. Chin Med J. 2002;115(10):1573-1575.
13. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S, Bebear C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(10):3323-3325.
14. Duffy L, Glass J, Hall G, Avery R, Rackley R, Peterson S, et al. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the

- United States. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1590-1591.
15. Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S, Spiller OB. Comparison of full *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism. J Antimicrob Chemother. 2009;64(3):529-538.
16. Kamiya Y, Shimada Y, Ito S, Kikuchi M, Yasuda M, Kawamura Y, et al. Analysis of the quinolone-resistance determining region of the *gyrA* gene and the analogous region of the *parC* gene in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected in first-void urine of men with non-gonococcal urethritis. J Antimicrob Chemother. 2013;68:480-482.