

Genetic Classification and Antimicrobial Resistance of *Ureaplasma urealyticum* Isolated from Urine

Myungwon Choi and Indal Park*

Department of Microbiology and Research Institute for Antimicrobial Resistance, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Recently, polymerase chain reaction (PCR)-based methods have been used to reclassify *Ureaplasma urealyticum* into two independent species (*spp.*), designating *U. parvum* and *U. urealyticum*. In the current study, we aim to reclassify *U. urealyticum* and to analyze the correlation between the presence of a genetic marker and an antibiotic resistance of *U. urealyticum*. Susceptibility test against tetracycline, levofloxacin or moxifloxacin was performed by broth microdilution method. The presence of *tet(M)* gene and the mutations of quinolone resistance-determining regions (QRDRs) were analyzed by PCR and sequencing. Among fourteen *Ureaplasma* isolates, three were identified as *U. parvum* and eleven were identified as *U. urealyticum*, and this is first report showing that two independent *spp.* of *U. urealyticum* isolated from Korean are present. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranges for *Ureaplasma* isolates were as follows: tetracycline 0.25~128 µg/ml, levofloxacin 1~8 µg/ml, and moxifloxacin 0.5~4 µg/ml. The *tet(M)* determinant was found in 3 among 14 *Ureaplasma* isolates with tetracycline MIC of >16 µg/ml, suggesting that the presence of the *tet(M)* determinant is associated with tetracycline resistance. Mutations of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes in the QRDRs were found in 3 among 14 *Ureaplasma* isolates, exhibiting only *parE* gene mutation is associated with fluoroquinolone resistance.

Key Words: *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *tet(M)*, Fluoroquinolones, Mutation

서 론

*Ureaplasma*는 가장 작고 단순한 세포벽이 없는 자가 증식 생명체로 *Mycoplasma* 과에 속하며, 다른 *mycoplasma*와는 다르게 에너지원으로 urea를 분해해서 사용하기 때문에 *ureaplasma*로 이름이 지어졌다. 주로 하부 비뇨생식기에 서식하며, 임신 가능 여성의 40~80% 정도

에서 분리되고, 용모양막염, 비임균성 요도염, 조산 등을 일으키는 반면, 신생아에서는 폐렴이나 만성폐질환, 수막염을 일으키기도 한다 (1~3). 예전에는 사람에서 질병을 일으키는 *Ureaplasma*는 *U. urealyticum* 1종으로 14개의 혈청형으로 구분하였고, *U. urealyticum*을 다시 2종류의 생물형으로 나누어 *U. urealyticum* biovar 1에는 혈청형 1, 3, 6, 14가, *U. urealyticum* biovar 2에는 혈청형 2, 4, 5, 7-13이 속하는 것으로 분류했었다. 1999년부터 여러 가지 분자생물학적 기법들을 사용하여 *U. parvum*과 *U. urealyticum* 2종으로 분류하려는 시도가 있었고, 2002년 이후에는 *U. urealyticum* biovar 1은 *U. parvum*으로, *U. urealyticum* biovar 2는 *U. urealyticum*으로 재분류하여 사용하고 있다 (4, 5). 이 균에 의한 감염 치료에는 주로 tetracycline (Tc)이 사용되었으나, 내성균의 출현으로 macrolides나 fluoroquinolones (FQs)의 약제들을 사용

Received: May 7, 2012/ Revised: May 15, 2012

Accepted: May 24, 2012

*Corresponding author: Indal Park. Department of Microbiology and Research Institute for Antimicrobial Resistance, Kosin University College of Medicine 34, Amnam-dong, Seo-gu, Busan 602-703, Korea.
Phone: +82-51-990-6423, Fax: +82-51-990-3081

e-mail: microdal@kosin.ac.kr

**This study was supported by the 2012 research fund of the Kosin University College of Medicine.

하고 있지만, 이 약제에 대한 내성균들 역시 보고되고 있다 (6~8). *Ureaplasma*의 DNA gyrase는 *gyrA*와 *gyrB*, topoisomerase IV는 *parC*와 *parE* 유전자에 의해 코딩되는데, 이 유전자가 모여 있는 부위인 quinolone resistance-determining regions (QRDR)에 변이가 생기면 FQ는 DNA gyrase, topoisomerase IV와 상호작용이 제대로 안되어 FQ에 대한 내성이 생기게 된다 (9~11).

따라서 본 실험에서는 국내에서 분리한 *Ureaplasma*의 종을 분류하고, Tc 내성과 연관된 *tet(M)* 유전자를 (12, 13) 보유하고 있는지, FQ 약제의 내성과 연관이 있는 QRDR에 유전자 돌연변이 (14)가 있는지 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

대상 균주

초저온냉동고에 보관하고 있던 시료들 중 1999-2000년에 산부인과 외래에 내원한 환자의 소변에서 분리한 *U. urealyticum* 60주와 2009-2010년에 정상 성인 소변에서 분리한 *U. urealyticum* 21주를 해동하여 10-B 액체배지 (100 ml 당 PPLO broth 1.5 g, 10% 마혈청, 25% 신선 효모액, 2% L-시스테인, 10% urea)에 접종하였다. 증식이 가능한 균은 액체배지에 계대하고, 다시 평판배지에 접종

하여 집락이 확인된 균을 실험 균주로 사용하였다.

항균제 감수성 검사

실험에 사용한 항균제는 Tc (BioShop, Canada Inc., Canada), levofloxacin (LFX, 제일제약주식회사, 한국), moxifloxacin (MFX, 바이엘코리아, 한국)이며, 항균제 농도는 256 µg/ml 부터 2배 계단희석 하였다. *Mycoplasma*과에 속하는 균들은 크기가 너무 작아 육안으로 집락을 관찰할 수 없으므로 균을 액체배지에 10배 계단희석하여 배양한 후 배지에 함유되어 있는 phenol red에 의한 배지 색깔의 변화를 color changing unit (CCU)으로 표시하고 있다. 본 실험에서는 균 농도가 $10^4 \sim 10^5$ CCU/ml이 되도록 항균제 용액에 접종하였고, 48시간 동안 관찰하여 색깔 변화가 일어나지 않은 가장 낮은 농도를 최저발육저지농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)로 하였다.

DNA 분리

실험 균주가 배양된 배양액 5 ml를 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 균을 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2번 세척하였다. 증류수 50 µl를 넣어 잘 섞은 후 100℃에서 5분간 가열하고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 중합효소연쇄반응(PCR)을 위한 DNA 주형으로 사용하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Name	Target gene	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Reference
U-parF	<i>Ureaplasma parvum</i>	CATCATTAATGTCTCGGCCCGAATGG	812	5
U-parR		TAGAATCCGACCATATGAATTTT		
U-ureF	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	CAGGATCATCAAATCAATTCAC	418	5
U-ureR		CATAATGTTCCCCTTCGTCTA		
tet-F	<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	10
tet-R		CGGTAAAGTTCGTACACAC		
gyrAF	<i>gyrA</i>	TTGCTGCTTTCGAAAACGG	336	8
gyrAR		CTGATGGTAAACACTTGG		
gyrBF	<i>gyrB</i>	CCTGGTAAATTAGCTGACTG	310	8
gyrBR		TTCGAATATGACTGCCATC		
parCF	<i>parC</i>	ACGCAATGAGTGAATTAGG	309	8
parCR		CACTATCATCAAAGTTTGAC		
parEF	<i>parE</i>	ATGGGCGGAAAATTAACGC	313	8
parER		CTTGGATGTGACTACCATCG		

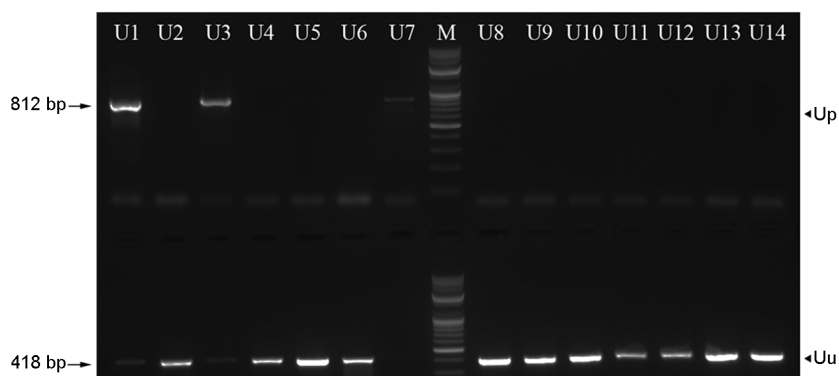


Figure 1. Analysis of the PCR products of 16S rRNA gene or urease gene from *Ureaplasma* spp for species classification of *U. urealyticum* and *U. parvum*. MW: 100 bp DNA ladder, Uu: *U. urealyticum*, Up: *U. parvum*

PCR

Ureaplasma 속의 균을 동정하기 위해 각 균에 특이적인 primer를 만들어 PCR을 시행하였다(Table 1). *U. parvum*은 812 bp, *U. urealyticum*은 418 bp의 크기의 증폭된 DNA가 관찰된다. 또한 Tc 내성 유전자인 *tet(M)* 유전자의 존재유무, FQ 내성 관련 유전자의 돌연변이를 관찰하기 위한 PCR을 시행하였다. Smart Taq pre-mix (SolGent, 한국)를 사용하여, PCR thermal cycler (TaKaRa, Japan)에서 94℃에서 10분간 전처리하고, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분간의 반응을 35회 반복한 후 72℃에서 10분간 더 반응시켰다. 반응 결과물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 관찰하였다. 사용한 primer들의 염기서열은 Table 1에 있다. QRDR 부위의 PCR 결과 산물의 염기서열은 자동염기분석기인 ABI PRISM 3730X Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

균의 분류

1999-2000년 동안 산부인과 외래에 내원한 환자에서 분리된 60균주 중에서 4주, 2009-2010년 동안 정상 성인에서 분리된 21주 중에서 10주가 증식되어, 모두 14주가 배양되었다. 배양된 균들의 목표 유전자를 PCR로 증폭하여 분석한 결과, U-par primer에만 반응하여 812 bp의 산물이 관찰된 *U. parvum*은 3주(21%), U-ure primer에만 반응하여 418 bp의 산물이 관찰된 *U. urealyticum*은 11주(79%)였다(Fig. 1). 일반적으로 *U. urealyticum* 보다는 *U. parvum*이 더 높은 비율로 분리되는 것으로 알려져 있고,

Kong 등 (15)은 임신부의 질분비물에서 분리한 263주의 *Ureaplasma* 중 228주(87%)가 *U. parvum*이라고 보고하였다. 이는 본 실험에 사용한 균주의 수도 적을 뿐만 아니라 장기간 보관하던 것 중에서 생존한 균만을 사용하였기 때문에 이러한 차이가 생겼을 수 있다고 생각하며, 따라서 앞으로 더 많은 균들을 분리하여 분류해 볼 필요성이 있다고 생각한다.

항균제 감수성 검사와 내성 기전

Mycoplasma 균들의 감염 치료제로는 주로 Tc를 사용하였는데, Tc에 대한 감수성 검사 결과 MIC 범위는 0.25~128 µg/ml였으며, FQ 제제인 LFX에 대한 MIC 범위는 1~8 µg/ml, MFX는 0.5~4 µg/ml로 분리된 균들은 LFX 보다는 MFX에 더 감수성이 있는 것으로 관찰되었다(Table 2). Tc에 대한 내성 발생기전은 약제를 빠르게 배출하거나 약제 결합능을 떨어뜨리는 것으로, 특히 *Ureaplasma* 속의 균들은 주로 *tet(M)* 유전자에 의해 생산된 단백질이 리보솜에 부착하여 약제 결합능을 방해하여 내성을 갖는 것으로 밝혀져 있다 (16). 본 실험에서는 Tc에 대한 MIC 범위가 0.25~128 µg/ml로 다양한 감수성을 나타내었고, 그 중에서도 16 µg/ml 이상인 3균주에서만 *tet(M)* 유전자를 갖고 있는 것으로 관찰되어 *tet(M)* 유전자와 Tc 내성과의 연관성을 확인할 수 있었다(Fig. 2, Table 2). Tc에 대한 내성균의 출현이 많아지면서 치료 약제로 macrolides나 quinolones를 많이 사용하게 되었는데 이러한 약제에 대한 내성균들의 출현도 증가하였고 더불어 그 기전에 관한 연구도 많이 이루어졌다. 주로 *Ureaplasma*의 QRDR 부위에 존재하는 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자에 변이가 생겨서 다른 아미노산으로 치환되면 FQ에 내성을 갖게 되는데, 본 실험에서는 *gyrA*과

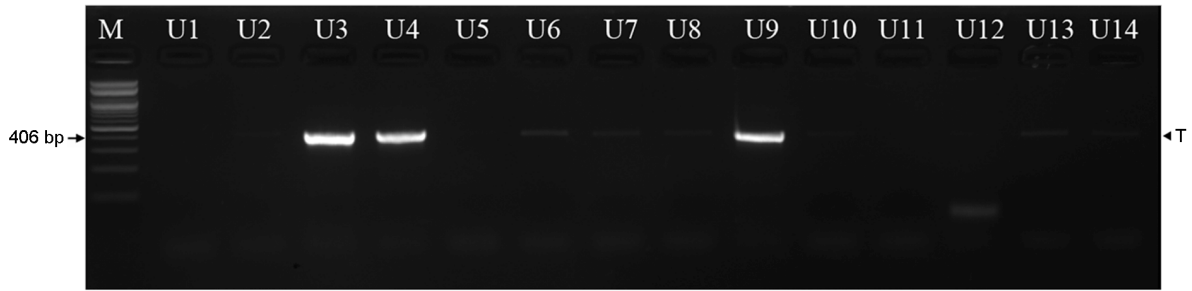


Figure 2. Analysis of the PCR products of *tet(M)* gene from *Ureaplasma* spp. MW: 100 bp DNA ladder, T: *tet(M)* gene

Table 2. Minimal inhibitory concentrations of *Ureaplasma* species

Isolate	Species ^a	<i>tet</i> (M)	MICs (μg/ml)			Amino acid change in QRDR				
			Tc	LFX	MFX	GyrA	GyrB	ParC	ParE	
U1	Uu	Up	–	0.25	8	2	N	N	N	D427N
U2		–	0.5	1	0.5	N	N	N	N	
U3	Uu	Up	+	64	4	2	N	N	N	N
U4		+	16	2	0.5	N	N	D104N, N148Y	N	
U5	Uu	–	0.5	1	0.25	N	N	D141E, V143I, S146N	N	
U6	Uu	–	8	4	4	N	N	N	N	
U7	Uu	Up	–	0.25	1	0.5	N	N	N	N
U8		–	4	2	1	N	N	N	N	
U9	Uu	+	128	4	2	N	N	N	N	
U10	Uu	–	0.25	2	0.5	N	N	N	N	
U11	Uu	–	8	4	4	N	N	N	N	
U12	Uu	–	2	2	0.5	N	N	N	N	
U13	Uu	–	1	2	1	N	N	N	N	
U14	Uu	–	2	2	1	N	N	N	N	

Tc, tetracycline; LFX, levofloxacin; MFX, moxifloxacin; N, none.

^aUp: *U. parvum*, Uu: *U. urealyticum*

*gyrB*에서 아미노산의 치환을 일으키는 변이는 관찰되지 않았다. *parC*에서는 균주 U4 (LFX 2 μg/ml, MFX 0.5 μg/ml)에서 104번 위치의 아미노산 aspartic acid가 asparagine으로, 148번 위치의 asparagine이 tyrosine으로 치환을 일으키는 변이가 있었으며, U5 (LFX 1 μg/ml, MFX 0.25 μg/ml)에서는 141번 위치의 aspartic acid가 glutamic acid로, 143번 위치의 valine이 isoleucine, 146번 위치의 serine이 asparagine으로 치환을 일으키는 변이가 있었다. *parE*에서는 U1 (LFX 8 μg/ml, MFX 2 μg/ml)에서 427번 위치의 aspartic acid가 asparagine으로 치환을 일으키는 변이가 관찰되었다(Table 2).

국제적으로 공인된 항균제 감수성 검사기관인 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (17)의 기준에 따르면 LFX가 ≤2 μg/ml이면 감수성, ≥8 μg/ml이면 내성, MFX가 ≤0.5 μg/ml이면 감수성, ≥2 μg/ml이면 내성으로 한다. 이 기준에 의하면 본 실험에서는 균주 U1만이 내성을 갖고 있고, *parE* 유전자에 돌연변이가 생긴 것을 관찰할 수 있어 *parE* 유전자의 돌연변이가 FQ 내성과 연관성이 있음을 알 수 있었다. *parC*의 변이는 균주 U4의 104, 148 위치, U5의 141, 143, 146번 위치에서 아미노산 치환을 일으키지만 LFX에 감수성인 것으로 나타났다. 이는 Akiyama 등 (18)이 *Salmonella enterica*에서 GyrA의

83번 위치의 serine이 phenylalanine으로 아미노산 치환이 있었지만 CFX에 감수성을 나타내었다는 보고와 유사한 결과라 할 수 있다. 그리고 Zhang 등 (19)과, Zie 등 (20)이 *Ureaplasma*에서 GyrA의 112번 위치, ParC의 83번 위치에서의 아미노산 치환이, Duffy 등 (21)은 다른 위치에서의 아미노산 치환이 FQ 내성과 연관성이 있는 것으로 보고하였지만, 본 실험과는 다른 위치이기 때문에 아미노산 치환이 일어났지만 항균제 감수성에는 영향을 미치지 않는 부위일 가능성이 있다. 그 외 U3, U6, U9, U11 등이 MFX에 비교적 낮은 감수성을 나타내었지만 아무런 돌연변이가 관찰되지 않았는데, Takiff 등 (22)이 FQ 내성 *Mycobacterium smegmatis*에서 저농도 FQ 내성에는 membrane efflux pump가 관여한다는 보고를 하여 앞으로 이 균들에서 membrane efflux pump의 존재 여부를 확인 해봐야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 실험에서는 14종의 *U. urealyticum*을 *U. parvum* 3주(21%)와 *U. urealyticum* 11주(79%)로 분류할 수 있었으며, 이러한 분류는 국내에서 최초로 시행된 연구 결과이다. Tc에 16 µg/ml 이상인 균들만 *tet(M)* 유전자를 보유하고 있어 Tc 내성과의 연관성을 확인할 수 있었고, FQ의 내성과 연관성이 있는 QRDR 유전자에서 돌연변이가 발생했으며, *parE* 유전자의 돌연변이가 FQ 내성과 연관성이 있음을 알 수 있었다. 앞으로 보다 많은 시료들을 수집하여 균의 분류와, 항균제 감수성 검사 및 유전자 돌연변이와의 관계를 조사하여 *Ureaplasma* 균에 의한 감염 치료에 도움이 되는 연구들을 지속적으로 해야 할 필요가 있다고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Taylor-Robinson D, McCormack WM. The genital mycoplasmas. N Engl J Med 1980;302:1003-10.
- 2) Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. Clin Microbiol Rev 1993;6:69-87.
- 3) Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, et al. *Ureaplasma urealyticum* is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: A case-control study. J Infect Dis 2011;204:1274-82.
- 4) Robertson JA, Stemke GW, Davis JW Jr, Harasawa R, Thirkell D, Kong F, et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. Nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:587-97.
- 5) 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;49:1879-89.
- 6) Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Therapeutic considerations for *Ureaplasma urealyticum* infections in neonates. Clin Infect Dis 1993;17Suppl 1:S208-14.
- 7) Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1-12.
- 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;44:2557-60.
- 9) Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2380-6.
- 10) Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin Infect Dis 1998;27:S54-63.
- 11) Webber M, Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet Res 2001;32:275-84.
- 12) Roberts MC, Kenny GE. Dissemination of the *tetM* tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. Antimicrob Agents Chemother 1986;29:350-2.
- 13) Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol Cell Probes 2001;15:209-15.
- 14) Bébear CM, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S, Bébear C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3323-5.
- 15) Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. J Clin Microbiol 2000;38:1175-9.

- 16) Brown JT, Roberts MC. Cloning and characterization of *tetM* gene from a *Ureaplasma urealyticum* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1852-4.
 - 17) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Tenth Edition: Approved Standard M02-A10. Wayne, PA, USA: CLSI; 2009.
 - 18) Akiyama T, Khan AA. Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund carrying multidrug resistance isolated from imported foods. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:101-10.
 - 19) 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;115:1573-5.
 - 20) Xie X, Zhang J. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol Lett* 2006;259: 181-6.
 - 21) 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;44:1590-1.
 - 22) Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, *et al.* Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:362-6.
-