



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 2월
석사학위논문

*Acinetobacter baumannii*의
다제내성에 대한 유출펌프 유전자
*AdeIJK*의 역할

조선대학교 대학원

의과학과

최 지 애

2016년 2월

석사학위논문

*Acinetobacter baumannii*의 다제내성에 대한 유출펌프 유전자 *AdeIJK*의 역할

최지애



2016년 2월

석사학위논문

*Acinetobacter baumannii*의
다제내성에 대한 유출펌프 유전자
*AdeIJK*의 역할

조선대학교 대학원

의과학과

최 지 애

*Acinetobacter baumannii*의
다제내성에 대한 유출펌프 유전자
*AdeIJK*의 역할

Role of Efflux Pump gene *AdeIJK* to Multidrug Resistance
in *Acinetobacter baumannii*

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

의과학과

최 지 애

*Acinetobacter baumannii*의
다제내성에 대한 유출펌프 유전자
*AdeIJK*의 역할

지도교수 장 속 진

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

의과학과

최 지 애

최지애의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 문대수 인

위 원 조선대학교 교수 박 건 인

위 원 조선대학교 교수 장속진 인

2015년 11월

조선대학교 대학원

목차

ABSTRACT

I. 서론	1
II. 연구방법	4
A. 연구 대상 균주	4
B. 대상 균주의 배양과 genomic DNA 추출	4
C. <i>A. baumannii</i> 균종 동정 확인용 PCR 검사	5
D. RNA추출과 cDNA 합성	6
E. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응 (real-time RT PCR)	6
F. 통계적 분석 방법	7
III. 결과	8
A. 임상균주의 항생제 내성 비율	8
B. MDRAB와 non-MDRAB 임상 균주의 <i>adeJ</i> 발현량 비교	8
C. 각 항생제에 대한 감수성균과 비감수성균 임상 균주의 <i>adeJ</i> 발현량 비교	9
IV. 고찰	10
V. 참고문헌	17
VI. 감사의 말씀	22

표 목 차

Table 1. The distribution of specimens from which 100 clinical isolates of *A. baumannii* were isolated 12

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study 13

그림 목차

Figure 1. Antimicrobial Susceptibility Pattern of 100 clinical isolates of *A. baumannii* 14

Figure 2. Relative levels of expression of *adeJ* gene in *A. baumannii* type strain (ATCC19606), multidrug resistant *A. baumannii* AYE strain, 70 multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) and 30 non-MDRAB. 15

Figure 3. Relationship between *adeJ* pump gene expression and resistance to various antibiotics. 16

ABSTRACT

Role of Efflux Pump gene *AdeIJK* to Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*

Choi, JiAe

Adviser: Prof. Jang, Sook-Jin, M.D., Ph.D

Department of Biomedical Sciences,

Graduate School of Chosun University

Background: *A. baumannii* constitutes a major public health problem due to its propensity to develop resistance to numerous drugs and isolates exhibiting multidrug resistance are emerging in clinical settings. The aim of this study is to evaluate the role of efflux pump gene *adeJ* for the multidrug resistance of *A. baumannii* clinical isolates.

Materials and methods: Two reference strains of *A. baumannii* and 100 clinical isolates including 70 multidrug-resistant *A. baumannii* and 30 non-multidrug-resistant *A. baumannii* were used in this study. Antimicrobial susceptibility results obtained by VITEK II system were used in data analysis and bacterial group allocation. We performed real-time reverse transcription PCR assay to determine relative expression of *adeJ* gene.

We compared relative expression of *adeJ* efflux pump gene in comparison groups according to two viewpoint: i) multidrug-resistant *A. baumannii* and non-multidrug-resistant *A. baumannii* group and ii) susceptible and non-susceptible group for various antibiotics.

Results: The mean value of relative expression of *adeJ* gene of multidrug resistant *A. baumannii* and non multidrug resistant *A. baumannii* group determined by real-time reverse transcription PCR were 0.92 and 1.4, respectively. The difference of them was statistically significant. The mean values of relative expression of *adeJ* gene of susceptible and non-susceptible group for most tested antibiotics including cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, tigecycline, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, piperacillin and gentamicin showed statistically significant differences.

Conclusion: Because relative expression of *adeJ* gene of MDRAB and non-MDRAB group of *A. baumannii* clinical isolates showed significant difference, AdeIJK efflux pump may contribute to the multi-drug resistance of *A. baumannii*. It seems to be that overexpression of *adeIJK* gene may contribute the resistance to various antibiotics including cefepime, ceftazidime, cefotaxime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, tigecycline, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and gentamicin.

1. 서 론

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*)는 자연에서 흔히 분리되는 호기성 그람 음성 구균이며, 균의 미생물학적 성상으로 편성 호기성균이고 편모가 없어 운동성이 없다. 또한 oxidase 음성, catalase 양성, 포도당을 발효하지 않고, nitrate를 환원하지 않는 것이 특징이다(1). 원래는 정상피부 상재 균으로 중시되지 않았으나, 항생제 내성(multidrug resistant)을 쉽게 획득하고 적응력이 높아 다약제 내성을 보이는 *A. baumannii* 균주가 급증하면서 폐렴, 피부, 연조직감염, 요로감염, 균혈증, 폐혈증, 뇌수막염 환자 등의 다양한 병원 내 감염과 관련된 중요한 원인균으로 부상하고 있어 공중보건에 위협적인 균주이다(2).

세계적으로 *A. baumannii* 다약제 내성 균주는 2002년 이후 증가하는 추세를 보이고 있다. 우리나라의 통계 조사 자료를 보면, 다양한 항생제에 대해 내성을 보이는 *A. baumannii*가 연도별로 증가하고 있다(3,4). 내성균 보균자의 발생 빈도도 조사대상 균들 중 *A. baumannii*가 가장 높아 2011년과 2012년의 1년 사이에 2배에 가까운 증가를 보였다(5). 또한 multidrug resistant (MDR) *A. baumannii*로 감염된 환자를 치료 시, 균이 다약제 내성을 나타내기 때문에 치료에 사용할 수 있는 약제 선택에 어려움이 많다. *A. baumannii*는 다음과 같은 다양한 내성 기전을 통해 항생제에 내성을 나타낸다. 첫째, 세포막 투과성의 감소로 항생제 유입을 차단, 둘째, 유전자의 돌연변이로 불활성화시키는 효소를 생성해서 항생제를 불활성화, 셋째, 항생제가 표적으로 삼는 분자의 변화, 넷째, 유출펌프 유전자 발현 증가 등으로 인한 약제의 유출 증가 등의 기전들이 주된 내성기전이다(6).

여러 항생제 내성의 기전 중 efflux pump (유출펌프) 내성기전은 유출펌프라고 불리는 세포질 막에 위치해 있는 운반체에 의해 항생제를 세균 세포 밖으로 배출 하는 기전이다. 이 기전으로 배출되는 항생제 기질에는 β -lactams, tetracyclines, fluoroquinolone, carbapenems 등의 항생제들이 있으며 유출펌프 활성이 높은 세균은 이 항생제들을 배출하여 세균 내 항생제 농도가 낮아지므로 이 항생제들에 대해 내성을 나타낸다(7). 유출펌프 중에는 그 기질이

소수의 항생제에 한정되어 있는 것과 여러 약제에 작용하는 것이 있다. 일반적으로 서로 연관이 없는 다양한 항생제에 대해 내성을 나타내는데 주요한 역할을 하는 내성기전으로는 염색체성 유출펌프 유전자의 발현증가가 중요한 기전이라고 알려져 있다.

균주들의 유출펌프는 아미노산 배열과 물질 수송을 위해 이용되는 에너지원에 따라 Major Facilitator Superfamily (MFS), Small Multidrug Resistance family (SMR), ATP - binding Cassette Superfamily (ABC), multidrug and toxic compound extrusion family (MATE), Resistance - Nodulation - Cell Division family (RND)의 5가지 유형으로 분류된다(8,9).

그람 음성 균인 *A. baumannii*가 흔히 가지고 있는 RND 유출펌프의 구조는 다음과 같은 3가지 구성분(tripartite)으로 이루어져 있다(10). Major Fusion Protein (MFP), multidrug transporter, Outer Membrane Factor (OMF)의 3성분으로 이루어져있으며, 이러한 RND 유출펌프는 세포의 항상성, 독력결정인자들의 배출, 그리고 독성화합물의 배출 등 다양한 기능과 관련되어 있다(11,12).

*A. baumannii*의 대표적인 RND 유출펌프 중 *adeABC* 유전자는 다제 내성과의 연관성이 많이 밝혀져 있다. 또다른 RND 유출펌프인 *adeIJK* 유전자는 항상 낮은 수준으로 발현되며 과발현되었을 때, 다제내성을 보인다고 알려져 있다. 따라서, 저자들은 *adeIJK*의 과발현이 항생제 내성에 미치는 역할에 대해 조사하기 위해 본 연구를 시행하였다.

AdeIJK (13)는 하나의 operon 구조로 이루어져 함께 전사되기 때문에 우리는 multidrug transporter인 *adeJ*의 발현을 측정하여 *adeIJK* 유전자의 발현량을 확인하였다(14).

유출펌프의 과발현에 의한 약제 내성에 대해 참조균주나 소수의 돌연변이주를 대상으로 연구한 보고(15)들은 있지만 다수의 임상 분리주를 대상으로 한 연구는 드문 실정이다.

본 연구의 목적은 다수의 임상 분리주를 대상으로 하여 첫째, 다약제 내성을 보이는 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) 군과 non-multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (non-MDRAB) 군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량에 차이가 있는지를 비교하고 둘째, 각 항생제별로 항생제 감수성군과 비감수성군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량에

차이가 있는지를 비교함으로써 AdeIJK 유출펌프의 과발현이 임상분리주에서 항생제 내성에 기여하는지 파악하는데 있다.

II. 연구 방법

A. 연구 대상 균주

연구대상 균주는 *A. baumannii* 임상분리주 100주와 참조균주 2주를 포함한 총 102주를 대상으로 하였다. 참조균주로 *A. baumannii*의 표준균주(ATCC19606)와 NCBI에 연쇄정보가 등록되어 있는 다제내성 임상균주 *Acinetobacter baumannii* AYE (*A. baumannii* AYE) 주를 사용하였다(16). *A. baumannii* 임상분리주 100주는 조선대학교병원 진단검사의학과 미생물검사실에 의뢰된 배양 검체에서 분리된 *A. baumannii*로서 MDRAB 70균주와 non-MDRAB 30 균주로 구성되었다. 균주의 항생제 감수성검사는 VITEK II 자동분석기(VITEK2, BioMérieux Vitek, USA)로 측정하였으며 그 결과에 따라 연구대상 균주의 균을 분류하였다. MDRAB의 정의는 Magiorakos 등의 논문에 의거하여 3가지 이상의 항생제 category에 대해 각 category에 속한 항생제 중 1개 이상의 항생제에 대해 비감수성인 균으로 정하였다(17). 또한 각 항생제별로 VITEK II 결과에 따라 감수성균과 비감수성균을 분류하였다. 대상균주가 분리된 환자들의 남녀 성비는 2.1 : 1로서 남자환자에서 더 많이 분리되었으며, 대상균주들이 주로 분리된 검체는 sputum (56.0%)과 open pus (26.0%)였다(Table1).

B. 대상 균주의 배양과 genomic DNA 추출

A. baumannii 임상분리주들의 배양을 위해 우선 혈액한천평판(BAP)에 균주를 획선 도말 후, 37°C 배양기에서 하룻밤 배양한 후, 다음날 형성된 집락을 취해, Luria-Bertani (LB) 한천 배지에 획선 도말 방법으로 계대 배양하여 37°C 배양기에서 하룻밤 배양하여, 단일 집락을 취했다. 균 접종을 위해 Luria-Bertani (LB) broth (Difco™ LB broth, Miller (USA), BD) 에 단일 집락을 접종하였으며, 37°C 진탕배양기에서 220 rpm으로 하룻밤 진탕배양을 하였다.

다음날 새로운 LB broth 10 mL에 진탕배양한 균주 100 μ L (1%)를 균 접종 후, 3시간동안 추가로 진탕배양하였다(18).

3시간 진탕배양 후, 4,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후에 얻은 pellet을 Phosphate buffer saline (PBS) 200 μ L에 부유하였다. 이를 genomic DNA extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 시약사용설명서에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 100주의 임상분리주 및 *A. baumannii* AYE, *A. baumannii* 표준균주(ATCC19606)로부터 추출된 genomic DNA는 PCR의 template DNA로 사용하였다.

C. *A. baumannii* 균종 동정 확인용 PCR 검사

VITEK II 자동분석기로 *A. baumannii* 로 동정된 임상분리주들은 분자생물학적 기법을 사용해 *A. baumannii* 종이 맞는지 정확히 확인하기 위해 blaOXA-51-like PCR과 *gyrB* Multiplex 1 PCR 검사를 수행하였다. 각각의 임상분리주에서 추출한 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 통상적인 PCR (CFX-96™ real-time system, Bio-Rad, Korea)을 수행하였다(19,20).

blaOXA-51-like PCR의 경우, 95°C에서 5분 predenaturation 후, 95°C에서 25초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension하는 3단계를 30회 반복하였고, 72°C에서 7분간 postelongation시켰다. *gyrB* Multiplex 1 PCR은 94°C에서 2분 동안 denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C 1분의 extension하는 3단계를 25회 동안 반복하였고, 72°C 7분간 postelongation시켰다(Table2)

증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel을 이용하여, 전기영동 후, Image analysis system (Digital Image stocker DS-100, ToYoBo, Japan)으로 판독하였다 (Table 2). blaOXA-51-like PCR 산물 크기가 353 bp이고, *gyrB* Multiplex 1 PCR에서 490 bp와 294 bp 길이의 증폭산물이 함께 나올 때 균종을 *A. baumannii* 로 판단하였다.

D. RNA추출과 cDNA 합성

LB broth에서 위와 동일한 방법으로 하룻밤 진탕배양한 균액을 1%가 되도록 새로운 LB broth에 접종하여 3시간동안 추가로 진탕배양하였다. 3시간 후, OD₆₀₀이 0.8~0.9가 되도록 탁도를 조정하였다. 탁도를 맞춘 균부유액을 4,000 rpm, 15분동안 원심분리 하였으며, 상층액을 제거 후, 균의 pellet을 PBS 200 µL에 다시 부유하여 RNA extraction Kit (Roche, Mannheim, germany)를 사용하여 시약설명서에 따라 total RNA를 추출하였다. genomic DNA의 제거는 DNase 처리과정이 포함된 RNA kit를 사용하여 진행되었다. total RNA를 추출한 직후 그 농도를 측정하였다. 순도가 확인된 RNA를 SuperScript® VILO™ master mix (Invitrogen Inc., CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA합성을 위해 1 µg의 RNA 검체를 RNA 합성용 SuperScript® VILO™ master mix 4 µL에 넣은 후 distilled water (DW)를 첨가하여 용액의 총량을 20 µL로 만든 후 반응시켰다. 이렇게 합성한 cDNA를 -80℃ 냉동고에 보관한 후, real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction (real-time RT PCR) template로 사용하였다.

E. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(real-time RT PCR)

A. baumannii adeIJK 유출펌프의 발현량과 항생제 내성간의 상관관계를 알아보기 위해 *A. baumannii adeIJK* 중 *adeJ* primer를 제작하여 real-time RT PCR을 수행하였다. 디자인된 *adeJ* primer의 적합성을 확인하기 위해 NCBI에 수록된 모든 *A. baumannii* 임상균주들의 *adeJ* sequence 와 align하여 100% 일치한 것을 확인하여 primer의 적합성을 확인하였으며, 염기서열 GC% (GC퍼센트) 값을 조절하여 annealing 온도를 57℃로 맞추어 제작하였다(Table2)

real-time RT PCR을 위해 합성된 CDNA 4 µL (200ng), 10 µM forward primer와 reverse primer를 각각 1 µL, iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix

(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 10 μ L, DW 4 μ L를 mix하여 총량 20 μ L가 되도록 준비 후, CFX-96™ real-time system (Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 real time RT-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 30분 동안 predenaturation 단계를 거쳐 95°C에서 5초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension하는 3단계를 35회 동안 반복하였다. 추가적으로 실험 조건 최적화 및 target 검증을 하기 위해 65°C부터 95°C까지 0.5°C씩 5초 간격으로 melting-curve 확인을 하였다.

이때, 검체의 housekeeping 유전자로 *rpoB*를 사용하였으며, 각 균주의 *rpoB* 유전자와 *adeJ* 유전자 각각의 critical threshold cycle (Ct)값을 *A. baumannii* 표준균주 (ATCC 19606)의 Ct값과 비교하여 상대발현량을 산정하였다. 또한 *A. baumannii* ATCC 19606 DNA를 10배 계단희석하여 $4 \times 10^7 \sim 4 \times 10^0$ copy/ μ L가 되도록 준비하여 *adeJ* template DNA로 수행한 후, standard curve를 작성하였으며, 이를 통해 PCR의 효율성과 상관 계수를 확인할 수 있었다(Table 2).

F. 통계적 분석 방법

VITEK II 자동분석기로 측정된 항생제 감수성 결과에 따라 균군을 각 항생제에 대한 감수성균과 내성균으로 각각 나누어 각 군별 *adeJ* 유전자 발현량을 비교하여 유의한 차이가 있는지 Student T-test로 평가하였다. MDRAB 군과 non-MDRAB 군에 대해서도 같은 방식으로 평가하였다. SPSS version 22.0에 의해 $P < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판단하여 분석하였다. (vision IBM SPSS Inc., New York, USA)

III. 결과

A. 임상균주의 항생제 내성 비율

대상균주들의 각 항생제에 대한 내성 비율을 살펴보면 tigecycline 39.0%, minocycline 7.0%, colistin 1.0%, aztreonam 99%, cefotaxime 77%이었고, ampicillin/Sulbactam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole은 72.0% 그리고 gentamicin과 meropenem은 71.0%로 내성을 나타내었다(Figure1).

B. MDRAB와 non-MDRAB 임상 균주의 *adeJ* 발현량 비교

연구 대상 균주들의 *adeJ* 발현량을 real-time RT-PCR로 측정하고 *A. baumannii* 표준균주(ATCC19606)를 calibrator 로 삼아 상대 정량 한 결과(21) *A. baumannii* AYE의 발현량은 1.06, non-MDRAB 군의 *adeJ* 유전자 평균발현량은 0.92, MDR 군의 *adeJ* 유전자 평균발현량은 1.4이었다. non-MDRAB 군과 MDR 군의 *adeJ* 유전자 발현량은 통계적으로 유의한 차이($P = 0.002$)를 나타내었다(Figure2).

A. baumannii 표준균주(ATCC 19606)의 DNA를 추출하여 $4 \times 10^7 \sim 4 \times 10^0$ copy/ μ L 까지 10배씩 단계희석하여 standard를 제작하였고, *adeJ* real-time RT-PCR 검사의 효율성을 평가 하였을 때 접종한 DNA 량과 Ct 값은 직선적인 정비례관계를 나타냈고 *adeJ* real-time RT-PCR의 효율성은 90.6%이며, 상관관계수(R^2)는 0.998로 좋은 성적을 보였다.

C. 각 항생제에 대한 감수성균과 비감수성균 임상 균주의 *adeJ* 발현량 비교

각 항생제에 대한 연구대상균주들의 VITEK II 감수성검사결과에 따라 감수성균과 비감수성균을 나누고 각 균의 *adeJ* 유전자 발현량을 비교한 결과 minocycline 을 제외한 대부분의 항생제에 대해 비감수성균이 감수성균에 비해 유전자 발현량이 유의하게 높게 나왔다.

특히 cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanicacid 항생제에 대한 감수성균과 비감수성균간에 *adeJ* 유출펌프유전자의 유전자 발현량 차이가 뚜렷하였다($P < 0.001$). 또한 piperacillin과 trimethoprim/sulfamethoxazole ($P = 0.001$), tigecycline ($P = 0.005$), cefotaxime ($P = 0.006$), gentamicin ($P = 0.019$) 항생제에 대해서도 감수성균과 비감수성균간 *adeJ* 유전자 발현량에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 그리고 aztreonam의 비감수성균과 colistin의 감수성균에 속한 균주수가 너무 작아 aztreonam과 colistin은 통계적으로 유의한 차이가 있는지 분석할 수 없었다(Figure3).

IV. 고찰

다수의 *A. baumannii* 임상분리주를 대상으로 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량을 조사한 본 연구에서 MDRAB 군이 non-MDRAB 군에 비해 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량이 유의하게 높았기 때문에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 *A. baumannii* 의 다약제내성에 기여한다고 생각되었다. *adeIJK* 유전자의 발현량은 별로 높지 않았는데 이는 Rosenfeld 등의 결과와 유사한 결과였다(13).

adeJ 유출펌프 유전자는 ticarcillin, cephalosporins, aztreonam 같은 β -lactams 항생제와 fluoroquinolones, tetracyclines, tigecycline에 내인성 내성을 나타내는데 기여하는 것으로 알려져 있다. 각 항생제별로 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량을 비교해보았을 때 대부분의 항생제에 대해 감수성군에 비해 비감수성군에서 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량이 유의하게 높았기 때문에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 이러한 다양한 항생제들의 내성에 일조하는 것으로 여겨졌다. 본 연구에서 ticarcillin, ceftazidime, cefepime, meropenem, ciprofloxacin, tigecycline, trimethoprim 등에 대한 감수성군보다 비감수성군의 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높아 이들 항생제에 대한 내성에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 기여한다고 한 Yoon 등의 결과와 일치하였다. 반면 Yoon 등의 결과와 불일치한 소견을 보인 항생제는 imipenem과 minocycline이었다. 본 연구에서 imipenem에 대한 비감수성군이 감수성군에 비해 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높았으나 Yoon 등의 결과에서는 큰 차이가 없었다. minocycline 항생제에 대한 내성에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 기여한다고 한 Yoon 등의 결과(22)와 달리 본 연구에서는 minocycline에 대한 감수성군과 비감수성군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량에 유의한 차이가 없었다. 또한 gentamicin 에 대한 감수성군보다 비감수성군에서 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높았는데 이는 aminoglycosides 는 *adeJ* 유출펌프 유전자의 기질이 아니라고 한 Coyne 등의 연구와는 대조적인 결과였다(14). Fernando 등의 연구에서 *adeIJK* 과다발현이 *A. baumannii* 군주의 다제내성과 연관되는 점

은 우리 결과와 유사하였으나 ceftazidime, imipenem 약제에서 *adeIJK* 발현량에 차이를 보이지 않은 점은 우리와 다른 결과였다(23). Rumbo 등이 PFGE-ROC-10XA-58 clone의 *A. baumannii* 균주에서 Tigecycline 내성에 *adeJ*의 과다발현이 관련되었다고 한 점은 우리 결과와 유사했으나 gentamicin과 minocycline에 대해서는 본연구와 상이한 결과를 나타냈다(24). 우리는 항생제 내성에 대해 VITEK II 자동분석기의 기준으로 균주 군을 나누었으나 그들은 임의로 정한 기준에 따라 균주 군을 나누었기 때문에 결과에 차이가 보였을 가능성이 있다. 그러나 동일하게 연구한 다른 clone의 균주에서는 다른 결과가 나왔기 때문에(24) 균주의 특성에 따라 결과가 다르다는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구를 종합해 볼 때 다수의 임상균주를 대상으로 한 우리의 결과 또한 참조균주들을 대상으로 한 여러 연구들과 유사하게 *adeIJK* efflux 발현량이 다제 내성 *A. baumannii* 균주에서 유의하게 높았기 때문에 *A. baumannii* 균의 다제 내성에 *adeJ* 유출펌프유전자 과다 발현이 기여한다는 것을 시사해주는 소견이라고 생각할 수 있었다. 비록 MDRAB 군과 non-MDRAB 군간에 *adeJ* 유출펌프유전자의 발현량에 유의한 차이를 보이기는 했지만, MDRAB 균주에서 *adeJ* 유출펌프유전자의 발현이 낮은 균주들도 있었고 non-MDRAB 균주 중에서도 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현이 높은 균주들도 관찰되었다. 이와 같이 균주별로 발현 량에 차이가 있는 점은 다른 연구에서도 관찰된 현상으로 균주별 차이가 작용하는 것으로 생각된다(24,25). 또한 내성 균주의 정량 값과 감수성균주의 정량 값의 평균치들 간에 현격한 차이가 나지 않은 것으로 보아 이들의 내성기전에 다른 유출펌프의 과다발현이나 다른 내성기전이 함께 영향을 미쳤을 가능성이 있을 것으로 추정된다(26,27). 따라서 *A. baumannii*의 내성 기전에 대해 앞으로도 꾸준한 연구가 필요할 것으로 생각된다(28,29).

Table 1. The distribution of specimens from which 100 clinical isolates of *A. baumannii* were isolated

	Male		Female		Total	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Sputum	33	(58.9)	23	(41.1)	56	(56.0)
Open pus	22	(84.6)	4	(15.4)	26	(26.0)
Catheterized urine	4	(100)	0	(0.0)	4	(4.0)
Endotracheal intubator	3	(75.0)	1	(25.0)	4	(4.0)
WB (culture)	1	(25.0)	3	(75.0)	4	(4.0)
Bile juice	1	(100)	0	(0.0)	1	(1.0)
Central venous catheter tip	0	(0.0)	1	(100)	1	(1.0)
Closed pus	1	(100)	0	(0.0)	1	(1.0)
Pleural fluid	1	(100)	0	(0.0)	1	(1.0)
Random urine	1	(100)	0	(0.0)	1	(1.0)
cerebrospinal fluid	1	(100)	0	(0.0)	1	(1.0)
Total	68	(68.0)	32	(32.0)	100	(100)

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

	Gene	Primer	Sequences (5' → 3')	Annealing temperature	References
conventional PCR	bla OXA51-like	F	TAATGCTTTGATCGGCCCTTG	55° C	(22)
		R	TGGATTGGCACTTCATCTTGG		
	gyrB Multiplex 1	Sp4F	CACGCCCGTAAGAGTGCATTA	60° C	(23)
		Sp4R	AACGGAGCTTGTCAAGGGTTA		
real-time RT-PCR	tpoB	F	CTCACTATGGTCGTTTGTTC	57° C	this study
		R	CCAAGAAACCCGAAGTCATTCCG		
	adeJ	F	CAAGTTATTGCATTCTAATTCACCCAG	57° C	this study
		R	GACCTGTACCTCACCACAACAC		

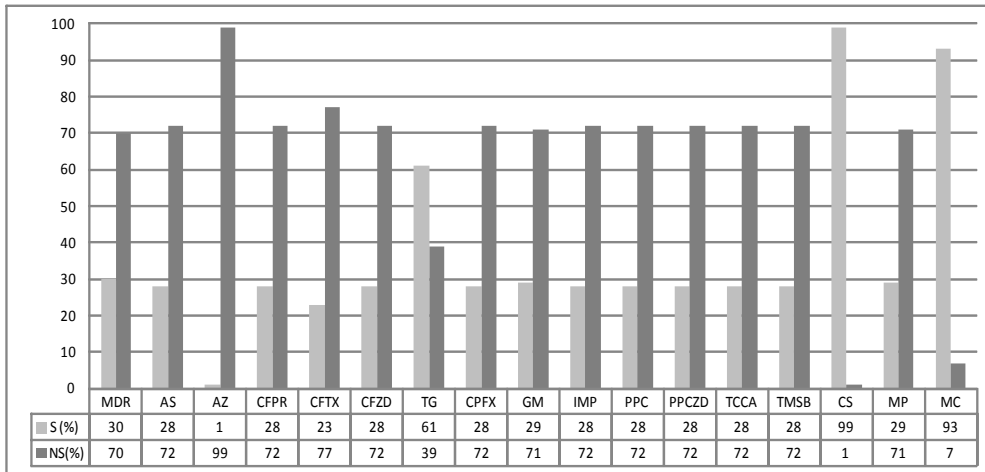


Figure 1. Antimicrobial Susceptibility Pattern of 100 clinical isolates of *A. baumannii*. Susceptibility tests were performed using VITEK II automated system. AS, ampicillin/sulbactam; AZ, aztreonam; CFPR, cefepime; CFTX, cefotaxime; CFZD, ceftazidime; TG, tigecycline; CPMX, ciprofloxacin; GM, gentamicin; IMP, imipenem; PPC, piperacillin; PPCZD, piperacillin/tazobactam; TCCA, ticarcillin/clavulanic acid; TMSB, trimethoprim/sulfamethoxazole; CS, colistin; MP, meropenem; MC, minocycline (30).

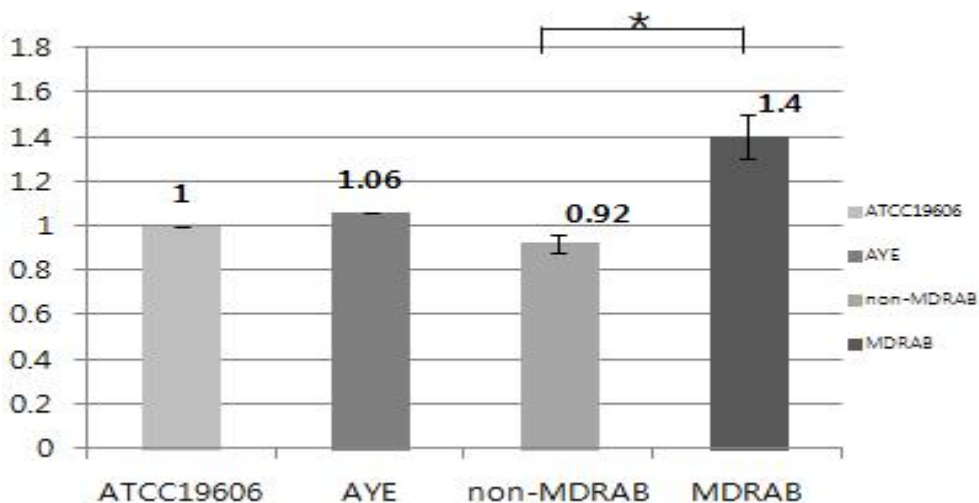


Figure 2. Relative levels of expression of *adeJ* gene in *A. baumannii* type strain (ATCC19606), multidrug-resistant *A. baumannii* AYE strain, 70 multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) and 30 non-MDRAB clinical isolates. Gene expression (means±SE) relative to that of *rpoB* was determined by RT-qPCR. The bars represent the means and the error bars the standard deviations. *, $P = 0.002$ (Student T-test).

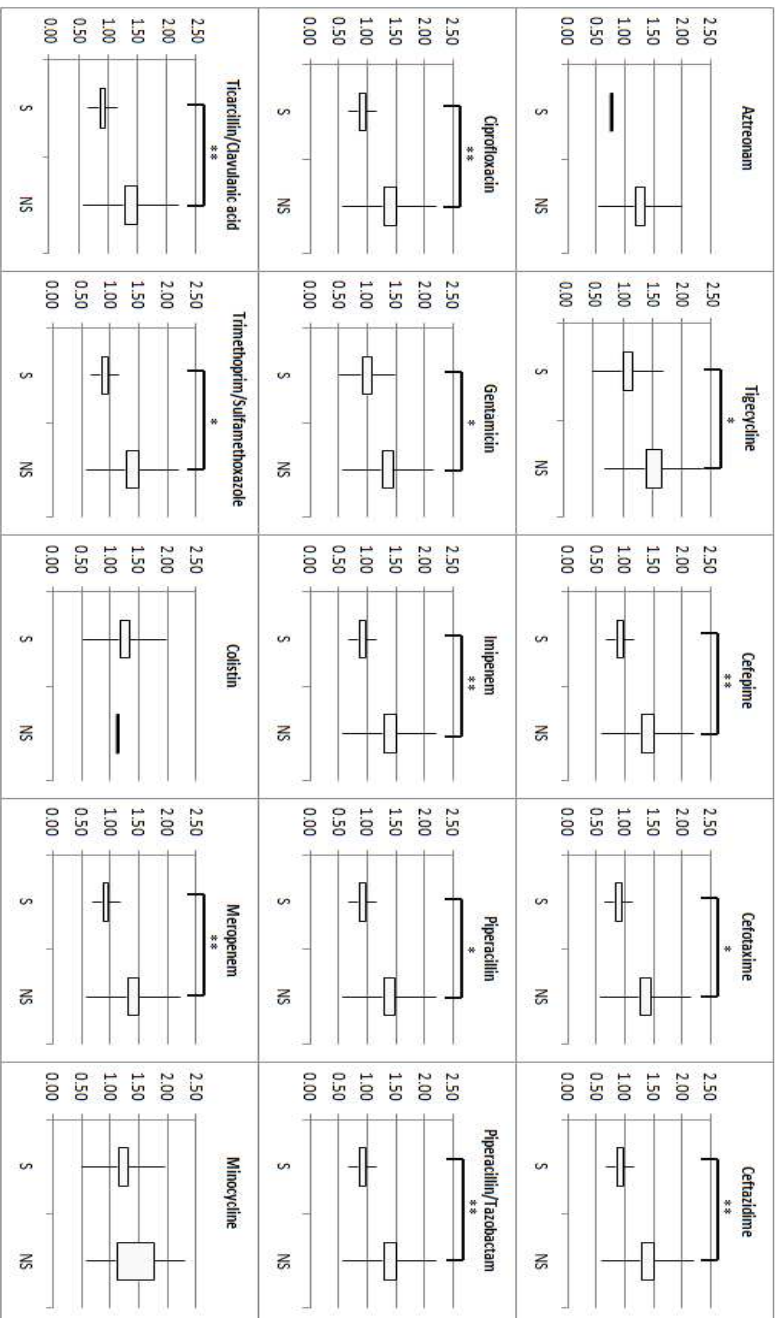


Figure 3. Relationship between *adeJ* pump gene expression and resistance to various antibiotics.

The clinical isolates were divided into two groups of susceptible (S) / non-susceptible (NS) group by antimicrobial susceptibility test results by VITEK 2 system. The strains belonging to NS group had more gene expression (mean±SE) of *adeJ* gene than the more susceptible strains for most antibiotics tested. * $P < 0.05$. ** $P < 0.001$.

V. 참고문헌

- (1) Kwon Bae, Seok Hoon Jeong, Kyung won Lee. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean J Clin Microbiol 2012;15(1):1-8.
- (2) Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996;9(2):148-65.
- (3) Sung Kuk Hong, Moon-Woo Seong, Do Hoon Lee, Eui Chong Kim. Correlation between Carbapenem Prescription Trends and Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* at an Intensive Care Unit between 2006 and 2010. Lab Med Online 2012;2(4):232-34.
- (4) Kyung won Lee. Trend of Bacterial Resistance for the Past 50 Years in Korea and Future Perspectives - Gram - negative Bacteria. Infect Chemotherapy 2011;43(6):458-67.
- (5) Hong-Bin Kim, Kyung won Lee, Hyuk Min Lee. Korea Centers for Disease Prevention and control. Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System 2012 Annual Report. 2014;12-56.
- (6) Seok Hoon Jeong. Mechanisms of Acquiring Carbapenem-resistance in *Acinetobacter* Species. Korean J Clin Microbiol 2009;12:1-5.
- (7) Kyung won Lee, Seok Hoon Jeong, Hee Jung Kim, et al. Increasing Prevalence of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* spp. *Pseudomonas* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia*., 서흥 출판사 2014;56-85.

- (8) Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(8):629-36.
- (9) Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(12):3375-80.
- (10) Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):947-53.
- (11) Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;59:1210-15.
- (12) Wiczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - the role of *AdeABC* (RND family) efflux pump. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):257-67.
- (13) Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Périchon B. Expression of the Resistance-Nodulation-Cell Division Pump *AdeIJK* in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by *AdeN*, a TetR-Type Regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(5):2504-10.
- (14) Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Périchon B. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):333-40.
- (15) Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. *AdeIJK*, a Resistance-Nodulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):557-62.

- (16) Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet 2006;2(1):e7.
- (17) Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18(3):268-81.
- (18) Fernando D, Kumar A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012;67:569-572.
- (19) Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Distribution of *bla*OXA Genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from Patients at Tehran Hospitals. Jpn. J. Infect 2008;61(4):274-78.
- (20) Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. Clin Microbiol Infect 2007;13(12):1199-201.
- (21) Chen Y, Pi B, Zhou H, Yu Y, Li L. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Journal of Medical Microbiology 2009;58:1086-91.
- (22) Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, Grillot-Courvalin C., Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. MBio 2015;6(2):1226-1734.

- (23) Fernando DM, Xu W, Loewen PC, Zhanel GG, Kumar A. Triclosan Can Select for an *AdeIJK*-Overexpressing Mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 That Displays Reduced Susceptibility to Multiple Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(11):6424-31.
- (24) Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(11):5247-57.
- (25) Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2015;xx:1-8.
- (26) Coldham NG, Webber M, Woodward MJ, Piddock LJ. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(8):1655-63.
- (27) Amin IM, Richmond GE, Sen P, Koh TH, Piddock LJ, Chua KL. A Method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Amin et al. *BMC Microbiology* 2013;13:158.
- (28) McConnell MJ, Pérez-Ordóñez A, Pérez-Romero P, Valencia R, Lepe JA, Vázquez-Barba I, et al. Quantitative real-time PCR for Detection of *Acinetobacter baumannii* Colonization in the Hospital Environment. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1412-14.
- (29) Man Hwan Oh, Je Chul Lee, Jungmin Kim, Chul Hee Choi, Kyudong Han.

Simple method for markerless gene deletion in multidrug - resistant *Acinetobacter baumannii*., Applied and Environ Microbiol 2015;81(10):3357-68.

(30) Kor SB, Tou BSY, Chieng CKL, Hiew MSY, Chew CH. Distribution of the multidrug efflux pump genes *adeA*, *adeI*, *adeJ*, *adeY* and integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Malaysian hospitals. Biomedical Research 2014;25(2):143-148.

VI. 감사의 말씀

아직 많이 부족하지만 저에게 많은 관심을 가져주셔서 진심으로 감사드립니다. 많은 시행착오를 겪고, 이렇게 논문을 마무리 하려고 합니다. 힘들었던 만큼 이시간이 너무나도 값지게 느껴집니다. 또한 감사한분들이 많아서 어떻게 인사를 드려야할지 많은 생각을 하게 됩니다. 먼저, 한결같은 마음으로 제가 길을 열어 갈 수 있도록 도와주신 장숙진 교수님 감사합니다. 교수님의 가르침으로 저에게는 한 걸음 더 나아갈 수 있는 큰 힘이 생겼습니다. 진심으로 감사드립니다.

냉철한 카리스마 뒤에 따뜻한 마음을 가지고 계신 문대수 교수님, 올해 좋은 결실을 맺을 수 있도록 도와주셔서 감사합니다. 항상 인자한 미소로 맞아주시고, 긍정의 에너지를 가지고 계신 박건 교수님 감사합니다. 풀리지 않았던 수수께끼의 해결책처럼 교수님의 가르침으로 많은 것을 배웠습니다. 어려움이 생길 때마다 찾게 되는 김춘미 박사님, 친절하게 설명해주시고 도와주셔서 감사합니다. 언제나 안부인사해주는 김동민 교수님, 너그러운 목소리로 숭기 없는 저에게 먼저 다가와 주셔서 감사드립니다.

또한 힘들고 지칠 때 힘이 나는 비타민처럼 언제나 밝고 활기 찬 분자 방 선생님들 감사합니다. 저를 항상 딸처럼 아껴주시고 보듬어 주시는 이병설 선생님, 무슨 일이든 저를 믿어주시고 든든한 힘이 되어주신 심재광 선생님, 위로와 격려를 아끼지 않고 마음까지 읽어 다독여 주시는 김세훈 선생님, 많은 응원으로 용기와 꿈과 희망을 갖게 해주는 박우관 선생님, 언제나 두팔벌려 맞아주시고 챙겨주시는 박선옥 선생님 감사드립니다.

그리고 우리 LAb.식구들 감사합니다. 먼저, 이런저런 시시콜콜한 얘기도 다 들어 주고, 걱정과 고민 잊고 힐링 할 수 있게 언제나 옆에서 힘이 되어준 유미언니 정말 고마워요. 또 마음이 너무 이쁜 커플, 힘든 순간 함께 같은 길을 걸어온 Piyush와 나만의 통역사이자 영어선생님이자 분위기 메이커

Babita, 함께한 시간이 즐거웠고, 지나온 시간보다 남은시간이 적어서 아쉽고, 내가 도와주는 것보다 받는 게 많았던 거 같아서 미안하고 고마워요.

마지막으로 항상 그들과 함께하면 행복해지는 행복바이러스 우리가족, 언제나 뒤에서 밀어주고, 앞에서 끌어주는 언제나 변치 않는 내편, 말로 다 표현 못할 정도로 미안하고 고맙고 사랑합니다.

초심 잃지 않고 매사에 감사하며 모든 일에 도전을 두려워하지 않고, 노력하며 살아가겠습니다. 감사합니다.