

2011년 2월
석사학위논문

rpoB 유전자를 이용한
Acinetobacter 임상분리주의 동정

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 민 정

rpoB 유전자를 이용한
Acinetobacter 임상분리주의 동정

Identification of *Acinetobacter* species
clinical isolates
by *rpoB* gene sequencing

2011년 2월 25일

조선대학교대학원

바이오신약개발학과

이 민 정

rpoB 유전자를 이용한
Acinetobacter 임상분리주의 동정

지도교수 장 속 진

이 논문을 석사학위 청구논문으로 제출함

2010년 10월

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 민 정

이민정의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 영 진(인)

위 원 조선대학교 교수 장 속 진(인)

위 원 조선대학교 교수 문 대 수(인)

2010년 11월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

I . 서론.....	1
II . 연구방법.....	3
1. 연구 대상.....	3
2. 연구 방법.....	3
1) DNA 추출.....	3
2) 중합효소연쇄반응.....	3
3) 염기서열 분석과 동정.....	4
4) <i>Acinetobacter</i> 균종별 항균제 감수성 결과 비교.....	5
III . 결과.....	6
1. <i>rpoB</i> 유전자 분석법과 16S rRNA 유전자 분석법, Vitek 2 system 이용한 균종 동정결과 비교	6
2. <i>Acinetobacter</i> 균종별 항균제 감수성검사 결과 비교	7
IV . 고찰.....	8
V . 참고문헌.....	12
VI . 감사의 말씀.....	24

표 목 차

표 1. <i>Acinetobacter</i> strains used in this study.....	17
표 2. Primers used for amplification and sequencing of 16S rRNA gene and <i>rpoB</i> gene of <i>Acinetobacter</i>	18
표 3. Comparison of the identification results by <i>rpoB</i> gene analysis, 16s rRNA gene analysis and Vitek 2 system.....	19
표 4. Comparison of antimicrobial susceptibility test results according to <i>Acinetobacter</i> species.....	20

그림 목차

- 그림 1. Comparison of phylogenetic trees of the *rpoB* gene and 16S rRNA A gene of *Acinetobacter* species.....21
- 그림 2. The result of identification of 95 clinical isolates of *Acinetobacter* based on the phylogenetic analysis of *rpoB* gene sequence analysis22
- 그림 3. The result of identification of 95 clinical isolates of *Acinetobacter* based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence analysis.....23

ABSTRACT

Identification of *Acinetobacter* clinical isolates by *rpoB* gene sequencing

Lee, Min-Jung

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

Dep. of Bio New drug Development

Chosun University Graduate school

Background: The importance of *Acinetobacter* is increasing as the serious etiologic agent of nosocomial infection because of their frequent isolation and multidrug resistance. It is necessary to apply molecular biological methods for the identification of *Acinetobacter* species. because conventional methods has limitation to identify them. The 16S rRNA gene analysis is the one of the most commonly used molecular methods. The differentiation of closely related species of *Acinetobacter* by 16S rRNA gene analysis is difficult due to high interspecies similarity among them. Recently the *rpoB* gene analysis is increasingly applied for the identification of various bacteria because of its high discriminatory power. The purpose of this study is to assess the usefulness of the *rpoB* gene analysis for the identification of *Acinetobacter* species and to know the distribution of *Acinetobacter* species in the clinical isolates of a university hospital in Korea. We also compared the results of identification by *rpoB* gene analysis, 16S rRNA gene analysis, and Vitek 2 system.

Materials and Methods: We tested 95 clinical isolates of *Acinetobacter* species which were identified as *Acinetobacter* by Vitek 2 system in Chosun University Hospital. We performed PCR-direct sequencing of *rpoB* gene and 16S rRNA gene with 95 clinical isolates of *Acinetobacter* species. The phylogenetic study on them was conducted with DNASTAR program. We compared the distribution of *Acinetobacter* species in 95 clinical isolates which were determined by *rpoB* gene analysis, 16S rRNA gene analysis, and Vitek 2 system. We compared antimicrobial resistance rate according to the species of *Acinetobacter* also.

Results: The identification rates and discriminatory power of *rpoB* gene analysis were better than those of 16S rRNA gene analysis or Vitek 2 system. The numbers of species identified by *rpoB* gene analysis, 16S rRNA gene analysis, and Vitek 2 system were seven, six, and four, respectively.

The most common *Acinetobacter* species identified by *rpoB* gene analysis was *A. baumannii*(55.8%), followed by *A. bereziniae*(12.6%), Genomic species 3 (5.3%), Genomic species 16 (4.2%), *A. junii/A. grimontii*(3.1%), *A. calcoaceticus* (1.1%), and *A. ursingii* (1.1%). The results of 16S rRNA gene analysis were similar to those of *rpoB* gene analysis. However the discriminatory power of the former is lower than the latter. Fifty-two (98.1%) of 53 *A. baumannii* identified by *rpoB* gene analysis were identified as *A. baumannii*/Genomic species 13 by 16S rRNA gene analysis. The identification rate of 16S rRNA gene analysis was lower than that of *rpoB* gene analysis. Because the number of strains which were not identified at species level were 16 (16.8%) by *rpoB* gene analysis and 33 (34.7%) by 16S rRNA gene analysis. Only 53 (74.6%) of 71 strains identified as *A. baumannii* by Vitek 2 system was identified as *A. baumannii* by *rpoB* gene analysis. Among the remaining 18 strains, 12 strains were not identified at the species level. Comparison of the antimicrobial susceptibility test results of 91 strains of *Acinetobacter* according to the species of *Acinetobacter* identified by *rpoB* gene

analysis revealed the difference among species of *Acinetobacter*. *A. baumannii* showed more than 70% of high resistance rate on the most antibiotics. On the other hand, the other species of *Acinetobacter* showed high susceptibility on them.

Conclusion: The *rpoB* gene analysis is useful for the identification of clinical isolates of *Acinetobacter*. The results of 16S rRNA gene analysis were relatively similar to those of *rpoB* gene analysis. However the discriminatory power and identification rate of the former were lower than the latter. There was the difference in the antimicrobial resistance rate among species of *Acinetobacter*.

Key words: *Acinetobacter*, *rpoB* gene, 16S rRNA, Vitek 2, identification

1. 서론

1970년도 이래 위중한 입원환자들에서 분리되는 다제내성 *Acinetobacter* strains의 전파와 뒤이은 유행 때문에 *Acinetobacter*는 중요한 감염 원인이 되었다 (1). 임상적으로 중요한 거의 모든 항생제들에 내성인 *Acinetobacter* 균주들이 이제는 전세계적으로 검출되고 있고 *Acinetobacter* 병원 감염은 항생제에 대한 내성 때문에 악명이 높아 이에 대한 공중보건학적 관심이 날로 증가하고 있다 (2).

Acinetobacter 임상분리주에 대한 표현형적 동정법으로 종 수준까지 동정하기에는 불충분하기 때문에 분자생물학적 기법을 이용한 유전형적 기법들이 genomic species 동정을 위해 개발되어져 왔다 (3). *Acinetobacter* 균종 동정에 사용되고 있는 분자생물학적 기법에는 DNA-DNA hybridization analysis, 16s rRNA sequence analysis, 16S-23S rRNA gene intergenic spacer(ITS) sequence, amplified rRNA gene restriction analysis(ARDRA), ribotyping, genomic DNA analysis by amplified fragment length polymorphisms(AFLP) analysis, protein-encoding genes sequencing 등이 있다 (3,4). *Acinetobacter* 동정에 이용된 분자생물학적 기법 중 16s rRNA sequence analysis, DNA-DNA hybridization analysis 와 phenotyping으로 동정한 결과를 비교했을 때 genomic species 의 연쇄들이 균종간에 매우 유사하여 서로 구별할 수 없어 잘못 동정되는 경우가 있다 (5,6). protein-encoding genes들은 생존에 불가결한 중요 단백질이어서 잘 보존되어 있으면서도 16S rRNA 유전자보다 유전적 진화의 과정에서 더 빨리 분화하여 균종간 차이가 더 크기 때문에 균종 감별능이 더 우수하다 (5,7). 이러한 protein-encoding genes들 중 종 수준에서 세균을 분류하기 위해 사용되어 온 유전자로는 recombinase A(*recA*), chaperonin *groEL(groEL)*, *hsp7.5*, RNA polymerase beta-subunit gene(*rpoB*), RNA polymerase Sigma D(*rpoD*), DNA gyrase subunit B(*gyrB*) gene sequencing 등이 있다 (8-13). *gyrB* 나 *recA* 유전자는 최근에 기술된 *Acinetobacter* 10 균종에 대한 연쇄가 아직 나와 있지 않아서 *Acinetobacter*의 다양한 균종을 비교하는데 제한점이 있다

(14-16). 16s rRNA sequence는 한 세균 내에 여러 copy가 있을 수 있고 그들간에 미소한 변이가 있을 수 있어 동정에 영향을 줄 수 있는데 반해, *rpoB* 유전자는 *Acinetobacter* spp. ADP1 유전체내에 오직 한 copy 만 있어 계통발생학적으로 신뢰성이 높을 수도 있다고 알려져 있다 (17). 최근 들어 *rpoB* 유전자에 대한 분석법이 여러 세균들의 동정에 이용되고 있다 (18). *rpoB* 유전자 분석법이 *Bartonella*나, *Spirochete*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Afipia*와 *Bosea*, *Corynebacterium*, *Pasteurellaceae*, *Streptomyces* 그리고 *Kitasatospora*, *Mycoplasma*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* 등의 다양한 세균종을 동정하는데 유용하게 적용되어 왔다 (19). 최근 *Acinetobacter* 표준 균주의 *rpoB* 유전자 연쇄가 밝혀졌고 (18) 유럽의 임상균주에 대해 350 bp의 *rpoB* 유전자 PCR 산물을 sequencing 하여 *rpoB* 유전자 분석법의 성능을 입증한 논문이 나와 있다 (20).

본 연구에서는 860 bp의 *rpoB* 유전자 PCR 산물을 sequencing 하여 *rpoB* 유전자 분석법의 유용성을 평가하고 한국에서 분리된 *Acinetobacter* 임상분리주에서 *Acinetobacter* 균종의 분포를 알아보려고 본 연구를 시행하였다. 또한 현재 한국에서 흔히 사용되는 통상적 동정법인 Vitek 2 system을 이용한 동정 결과와 16S rRNA 유전자 분석법을 함께 시행하여 각 방법의 성적을 비교한 결과도 함께 제시하였다.

II. 연구 방법

1. 연구 대상

조선대학교병원 환자 검체에서 Vitek 2 system에 Vitek GNI card (bioMeriex Vitek Inc., Hazewood, Mo., U.S.A)를 사용한 검사 결과 *Acinetobacter*로 동정된 95주를 대상으로 하였다. 계통수 분석에 사용한 표준균주 연쇄는 GenBank database에서 내려받은 *rpoB* 유전자 24종과 Eztaxon 2.1 site database에서 내려받은 16S rRNA 유전자 28종을 사용하였다 (Table 1). 공공 database 에 아직 연쇄가 등록되어 있지 않은 *A.beijerinckii*, *A.gyllenbergii*, *A.venetianus* 균주는 표준균주를 구입하여 직접 염기서열 분석하였다.

2. 연구 방법

1) DNA 추출

BAP에 계대 배양하여 한개의 집락을 백금으로 취한 후 LB broth(Difco™ LB Broth, Miller(Luria-Bertani), BD)에 집락을 풀고 shaking incubator(ViSion SCIENCE Co.,LTD, Korea)에서 18-24시간 배양한다. 배양된 균액 200 μ l 으로 DNA를 추출(AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer, Korea)하였다.

2) 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction)

PCR 반응액은 0.5U Taq DNA polymerase, 250 mM의 dNTPs, 50mM의 Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM의 KCl, 1.5mM의 MgCl₂, gel loading dye가 포함되어 있는 PCR premixture(AccuPower® PCR PreMix, Boioneer, Korea)에 DNA 2 μ l, 10 pmole/ μ l의 forward, reverse primer(Table 2)를 각각 1 μ l 씩 넣고 멸균된 3차 증류수를 반응액 총량이 20 μ l가 되게 넣어 준비하였다. PCR 반응은 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler(Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용

하여 수행하였다.

rpoB 유전자 분석을 위한 PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 30초 denaturation, 56°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 하는 3 단계를 35주기 반복한 후에 72°C에서 10분 동안 연장반응 시켰다. 16S rRNA 유전자 분석을 위해서는 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초간 반응시키는 3단계주기를 30회 반복한 후 72°C에서 10분 동안 연장시켰다. PCR 산물은 0.5 ng/ml Ethidium bromide(Etbr, Bioneer, Korea)를 넣은 2.0% agarose gel(For electrophoresis Agarose, Bioneer, Korea)에 Mupid-2plus(TaKaRa Code AD110)로 100V(0.5X TAE buffer, Bioneer, Korea)에 20분간 전기영동을 하였으며, Image analysis system(IMAGE STOCKER DS-100 & FAS-III, TOYOBO, Japan)으로 증폭된 DNA를 촬영하였다.

3) 염기서열 분석과 동정

PCR하여 증폭된 샘플들은 솔젠트(주) (SolGent Co., Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 검사된 염기서열의 확인 및 교정 (editing), contig 합성, 유사성 검정 및 계통수 분석의 모든 과정은 DNASTAR(DNA STAR Lasergene V,7.1) 프로그램을 사용하여 수행하였다. DNASTAR의 MagAlign프로그램에서 이용 가능한 기법 중 'Clustal W Method'를 선택하여 각 균종간의 % similarity 와 phylogenetic Tree 결과를 얻었다. *Acinetobacter* 임상분리주 95주로 검사하여 얻은 *rpoB* 유전자 염기서열들과 표준균주 24주의 *rpoB* 유전자 염기서열들을 찾아 함께 alignment시켜 계통수 분석을 하였다. 16S rRNA 유전자는 임상분리주 95주로 검사하여 얻은 16S rRNA 유전자 염기서열들과 표준균주 28주의 유전자 염기서열들을 찾아 함께 alignment 시켜 계통수 분석을 하였다.

4) *Acinetobacter* 균종별 항균제 감수성 결과 비교

rpoB 유전자 분석법에 의해 동정된 *Acinetobacter* 균종별로 항균제의 감수성 및 내성결과를 수집하여 균종별 차이가 있는지 살펴보았다. 항균제의 감수성검사 결과는 Vitek 2 system에서 AST- N055 나 AST- N056 kit(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 검사한 결과를 이용하였다.

III . 결과

1. *rpoB* 유전자 분석법과 16S rRNA 유전자 분석법, Vitek 2 system을 이용하여 동정한 균종 동정결과 비교

Acinetobacter 임상분리주 95주를 대상으로 *rpoB* 유전자 분석법과 16S rRNA 유전자 분석법, Vitek 2 system을 이용하여 동정된 균종의 종류는 각각 7종, 6종, 4종으로 나왔다 (Table 3).

rpoB 유전자 분석법에 의해 동정된 균종의 분포를 빈도순으로 살펴보면 *A. baumannii*가 53주 (55.8%)로 가장 많았고 그 다음은 *A.berezinae*, Genomic species 3, Genomic species 16, *A. junii/A. grimontii* 등의 순이었다. *rpoB* 유전자 분석법과 16S rRNA 유전자 분석법으로 동정된 결과를 함께 비교해보면 16S rRNA동정법의 분별력이 다소 낮으나 대체로 유사한 결과를 보였다. 16S rRNA 유전자 분석법으로는 *A. baumannii*와 Genomic species 13 이 구별되지 않아 *A. baumannii*/ Genomic species 13와 같이 두 균종 중 하나일 가능성을 함께 제시할 수밖에 없었으나 *rpoB* 유전자 분석법으로는 *A. baumannii*와 Genomic species 13 표준균주들이 분명히 구분되었고 검사한 임상분리주 95주중에는 Genomic species 13 으로 나온 균주는 없었다. *A. calcoaceticus*와 Genomic species 3 역시 16S rRNA 유전자 분석법으로는 감별되지 않았으나 *rpoB* 유전자 분석법으로는 양자가 잘 구별되었다(Fig 1). *rpoB* 유전자 분석법에서 *A. berezinae*, Genomic species 16, *A. junii/A. grimontii* 으로 동정된 균들이 16S rRNA 유전자 분석법에서는 모두 종 수준까지 동정되지 못하여 *Acinetobacter* species 로 나왔다.

두 방법으로 종 수준까지 동정되지 못한 *Acinetobacter* species의 수를 비교해보면 *rpoB* 유전자 분석법으로는 95주 중 16주 (16.8%), 16S rRNA 유전자 분석법에서는 33주 (34.7%)가 균종 동정이 안되어, 16S rRNA 유전자 분석법의 동정능이 더 낮음을 알 수 있었다. 또한 20주 (21.1%)가 Vitek 2 system에서 *A. lwoffii*로 나왔지만 *rpoB* 유전자나 16S rRNA 유전자 분석결과

*A. lwoffii*로 나온 균주는 한 주도 없었다 (Fig 2,3).

Vitek 2 system에 의한 동정결과를 *rpoB* 유전자 분석법의 결과와 비교해 보았을 때 상당한 차이가 드러났다. Vitek 2 system에서 *A. baumannii* complex 로 나온 71주 중 53주 (74.6%)만이 *A. baumannii*였고, *A. baumannii* complex가 아니었던 나머지 18균주 중 12주 (16.9%)는 종 수준까지 균종을 확정할 수 없는 *Acinetobacter* species로 결론지었다. *rpoB* 로 *A. baumannii*로 나온 53주와 genomic species 3으로 나온 4주와 *A. calcoaceticus*(genomic species 1)로 나온 1주, *Acinetobacter* spp.로 나온 12주가 모두 Vitek 2 system에서는 *A. baumannii* complex(ACB complex에 해당함)로 동정되었다. Vitek 2 system으로 동정시 95주중 20주 (21.1%)가 *A. lwoffii*로 나왔지만 *rpoB* 유전자와 16S rRNA 유전자 분석결과 *A. lwoffii*로 나온 균주는 한 주도 없었다 (Table 3).

2. *Acinetobacter* 균종별 항균제 감수성검사 결과 비교

rpoB 유전자 분석법으로 동정한 균종의 종류별로 Vitek 2 system에 의한 항균제 감수성검사 결과의 양상을 비교하였을 때 균종별 차이를 관찰할 수 있었다 (Table 4). *A. baumannii*는 ceftazidime과 piperacillin에 대하여 100%의 내성률을 보였고, imipenem과 meropenem에서 대해 72.5%의 내성률을 보였으며, gentamicin, piperacillin/tazobactam, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해서도 50% 이상의 높은 내성률을 나타내었다. *A. bereziniae*, Genomic species 3, Genomic species 16에서는 낮은 내성률을 보였고, *A. junii/A. grimontii*, *A. calcoaceticus*, *A. ursingii*는 대부분의 항생제에 대해 내성을 보이지 않았다. Vitek 2 system에 의해 동정한 균종의 종류별로 항균제 감수성검사 결과의 양상을 비교하였을 때 균종별로 내성률에 차이가 나는 것은 유사하였다(Table 4). 그러나 *rpoB* 유전자 분석법으로 동정한 *A. baumannii* complex 균종의 항생제 내성률이 Vitek 2 system으로 동정한 *A. baumannii* 균종의 항생제 내성률에 비해 전체적으로 높게 나타났다.

IV. 고찰

rpoB 유전자 분석법과 16S rRNA 유전자 분석법으로 *Acinetobacter* 균종을 동정한 결과를 함께 비교해 보면 대체로 유사하지만 16S rRNA 동정법의 분별력이 다소 낮은 것으로 보였다. 이와 같이 *rpoB* 유전자 분석법이 16S rRNA 동정법보다 더 높은 동정능을 보이는 것은 corynebacterial 균종의 동정에서도 나타났다 (21). *rpoB* 유전자 분석법에 의해 동정된 균종의 빈도는 *A. baumannii*가 55.8%로 가장 많았고 그 다음은 *A. bereziniae*, Genomic species 3, Genomic species 16, *A. junii/A. grimontii* 등의 순이었다. amplified rRNA gene restriction analysis(ARDRA)를 이용하여 *Acinetobacter* 58주를 동정하였을 때 40주가 genomic species 2 (*Acinetobacter baumannii*), 9주가 13 sensu Tjernberg and Ursing(13TU), 5주가 *Acinetobacter phenon 6/ct 13TU*, 4주가 *Acinetobacter* genospecies 3 이라고 한 결과와 (22) 본 연구의 16S rRNA 유전자 분석법 결과에서 나오는 균종의 종류가 비교적 유사한 것을 볼 때 16S rRNA 유전자 분석법의 성적이 나쁘다기보다는 *rpoB* 유전자 분석법의 *Acinetobacter*에 대한 감별력이나 동정률이 높아 차이가 난 것으로 보인다.

Vitek 2 system에 의한 동정결과는 다른 두 방법에 비해 정확도가 낮은 것으로 보였다. 이는 ID32 GN system과 같은 생화학적 동정법과 ARDRA와 같은 분자생물학적 동정법을 비교해 보았을 때 ID32 GN system이 *A. baumannii* 와 13TU를 감별하지 못해 부적절하였다는 보고와 유사한 결과이다 (3). *A. baumannii*(genomic species 2) 와 genomic species 1, 3, and 13 sensu Tjernberg and Ursing (13TU)는 유전적으로 밀접하게 연관되어 있고 표현형적으로 매우 유사하여 이들을 총칭하여 *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex (ACB complex)로 부른다 (3,26). *Acinetobacter* 임상분리주의 대부분을 차지하는 이 ACB complex 에 속한 균들을 genomic species 1, 2, 3, 13TU와 같은 각각의 genomic species로 동정하기보다 ACB complex 로 총칭하여 동정하면 상용화된 표현형적 동정기법의 효율성은 더 높ی 평가되겠지만 그 기법들이 *Acinetobacter* genomic species를 각각 감별해내는

능력은 그만큼 제한된다고 할 수 있다 (26). *rpoB* 유전자 분석법으로 *A. baumannii*와 genomic species 3, *Acinetobacter calcoaceticus*(genomic species 1)로 구별된 균주들이 Vitek 2 system에서 모두 *A. baumannii* complex (ACB complex에 해당함)로 나온 것이 이를 반영해준다.

이전에 16가지의 생화학적 동정검사를 이용하여 *Acinetobacter* strains을 동정한 결과 nosocomial isolates 299주 중 253 주가 *A. baumannii*로, 20주가 *Acinetobacter* genospecies 3으로, 8주가 *A. haemolyticus*로, 8주가 *A. lwoffii*로, 4주가 *A. johnsonii*로, 6주가 아직까지 명명되지 않은 종으로 나왔던 보고 (25)와 균분포상 약간 차이는 있지만 본 연구의 Vitek 2 system 동정결과상 *A. baumannii* complex가 대부분이었고 *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *Acinetobacter spp.*가 나온 점은 유사하였다. 즉 생화학적 동정법으로 동정되는 결과끼리는 서로 유사하지만 그 결과와 분자생물학적 분석법에 의한 결과는 다르다는 것을 확인할 수 있었다. Vitek 2 system으로 20주 (21.1%)가 *A. lwoffii*로 동정되었지만 *rpoB* 유전자나 16S rRNA 유전자 분석결과 *A. lwoffii*로 나온 균주는 한 주도 없었던 것을 보아도 Vitek 2 system과 같은 표현형적 검사법을 이용한 동정법은 16S rRNA 유전자 분석법이나 *rpoB* 유전자 분석법과 같은 분자생물학적 동정법에 비하면 균감별력과 동정능이 낮은 편으로 여겨졌다.

Taiwan과 네델란드, 벨기엄 (유럽)의 균혈증 환자에서 분리한 291주의 항생제 감수성 검사 결과 *A. baumannii* strains 는 *Acinetobacter* genomic species 3 균주보다 항생제에 대한 감수성이 더 낮은 것으로 나왔다. 모든 *Acinetobacter* genomic species 3 균주들은 ampicillin/sulbactam, imipenem, meropenem에 대해 감수성이 있었으나 *A. baumannii* 균주의 67.4%, 90%, and 86% 만이 ampicillin/sulbactam, imipenem, meropenem에 대해 각각 감수성이 있었다고 한다 (24). *Acinetobacter* 분리주의 genomic species에 따라 *Acinetobacter* species의 항생제 내성 양상과 내성보유 유전자는 현저히 다른 것으로 알려져 있다 (26). 본 연구에서 *Acinetobacter* 균종별 항균제 감수성 검사 결과를 비교해 보았을 때 *A. baumannii*는 대부분의 항생제에 높은 내성을 보였으나 *A. bereziniae*, Genomic species 3, Genomic species 16에서는

낮은 내성률을 보였고, *A. junii/A. grimontii*, *A. calcoaceticus*, *A. ursingii*는 대부분의 항생제에 대해 내성을 보이지 않았다. 이는 균혈증 환자에서 분리한 291주의 항생제 감수성 검사 결과 *A. baumannii* 균주는 *Acinetobacter* genomic species 3 균주보다 항생제에 대한 감수성이 더 낮은 것으로 나왔다는 보고와 유사한 결과이다 (24). *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex 내에 속해 있는 균종들 간에도 항생제 감수성 검사 결과에서 유의한 차이가 나타나는 것을 볼 때 이 complex 안에 있는 균종간의 감별이 임상적-역학적 관점에서 의미가 있다는 것이 알려져 있다 (24).

본 연구에서 *rpoB* 유전자 분석법으로 동정한 *A. baumannii* 균종의 항생제 내성률이 Vitek 2 system으로 동정한 *A. baumannii complex* 균종의 항생제 내성률에 비해 전체적으로 높게 나타났다. 그 이유는 Vitek 2 system으로 *A. baumannii complex* 으로 동정한 균종 중에 *A. baumannii* 이외의 다른 균종들이 포함되어 있고 그들의 내성률이 낮는데 연유한 희석효과 때문인 것으로 여겨졌다. 현재 우리나라의 병원 진단검사의학과에서는 분자생물학적 동정법은 거의 사용되지 않고 있고 Vitek 2 system 등의 미생물자동분석기를 이용하여 동정이 이루어지고 있는 실정이다. 현재 *A. baumannii complex* 에 속한 균종 중에 *A. baumannii* 가 가장 흔하고, *A. baumannii complex* 라는 용어가 일반 검사실과 임상에서 생소하게 여겨질 것을 고려하여 *A. baumannii complex* 로 동정된 균들을 *A. baumannii* 로 변환시켜 결과가 나가도록 설정되어 있는 병원들이 있으나 검사실이나 임상에서 이런 내용을 인식하지 않고 있는 경우가 흔하다. 이러한 미생물자동분석기로 동정한 *A. baumannii complex* 안에는 *A. baumannii*(genomic species 2) 이외에도 genomic species 1, 3, 13 sensu Tjernberg and Ursing(13TU)가 함께 포함되어 있으며 이 균종의 내성률은 *A. baumannii* 의 항생제 내성률에 비해 낮게 나온다는 점을 인식하는 것이 필요하다고 본다. Vitek 2 system에서 *A. baumannii complex* 로 나온 71주중 53주(74.6%)만이 *A. baumannii* 이었던 점과, 본 연구에서 종 수준까지 동정할 수 없었던 *Acinetobacter* species 12주와 *A. baumannii complex*가 아닌 다른 균종 6주도 *A. baumannii complex*로 동정된 것을 감안하면 Vitek 2 system에서 *A. baumannii complex*로 나온 균들의 항생제 내성률이 *A. baumannii*의 내성률을 대변한다고 보는 데에는 우리가 있다고 생각된다. 편의상 *A. baumannii complex* 로 동정된 균들의 항생제

내성률을 *A. baumannii* 의 내성률을 대변하는 값으로 보려고 한다면 그 내성률이 위와 같은 이유로 저평가되고 있음을 기억할 필요가 있다.

결론적으로 *Acinetobacter* 균종을 잘 감별하려면 균종간 분별력이 더 높은 동정법인 *rpoB* 유전자 분석법을 도입하여 *Acinetobacter* 균종동정을 하는 것이 좋을 것으로 생각된다. *rpoB* 유전자 분석법으로 더 세분화되고 정확한 균종 동정이 될 때 균종에 따른 임상적 소견과 경과 관찰, 적정 항생제 치료 선택 및 향후 환자 진료에 참고할 수 있는 정확한 의학 자료를 제공할 수 있을 것이다.

VII . 참고문헌

- (1) Lenie Dijkshoorn, Alexandr Nemeč & Harald Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 5: 939-951
- (2) Hsien Chang Chang, Yu Fang Wei, Lenie Dijkshoorn, Mario Vaneechoutte, Chung Tao Tang, Tsung Chain Chang. 2005. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(4): 1632-1639
- (3) Shin, M. G., S. H. Kim, J. C. Lee, D. Cho, S. J. Gee, J. H. Shin, S. P. Suh, and D. W. Ryang. 2004. A comparison of ID32 GN system with amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter baumannii*. *Korean J. Lab. Med.* 24: 107-112.
- (4) Hsien Chang Chang. 2005. 16S-23S rRNA gene intergenic spacer (ITS) amplified rRNA gene restriction analysis and genomic DNA analysis by AFLP analysis by using libraries of profiles of reference strains. *JCM*. 43(4): 1632-1639
- (5) Yamamoto, S., and S. Harayama. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 813-819.
- (6) Stackebrandt, E. & Goebel, B. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 846-849.

- (7) Ochman, H. & Wilson, A. C. 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol.* 26: 74–86.
- (8) Bustamante, V. H., Puente, I. L., Sanchez-Lopez, F., Bobadilla, M. & Calva, E. 1995. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using the *rpoB* gene and a cryptic DNA fragment from *C. jejuni*. *Gene* 165:1–8.
- (9) Haake, D. A., Summers, T. A., McCoy, A. M. & Schwartzman, W. 1997. Heat shock response and *groEL* sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Microbiology.* 143: 2807–28.
- (10) Karlin, S., Weinstock, G. M. & Brendel, V. 1995. Bacterial classifications derived from *recA* protein sequence comparisons. *J Bacteriol.* 177: 6881–6893.
- (11) Nowak, A. & Kur, I. 1995. Genomic species typing of *acinetobacters* by polymerase chain reaction amplification of the *recA* gene. *FEMS Microbiol Lett.* 130: 327–332.
- (12) Pai, S., Esen, N., Pan, X. & Musser, J. M. (1997). Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*). *Arch Pathol Lab Med.* 121: 859–864.
- (13) Yamamoto, S. & Harayama, S. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 506–511.

(14) Carr, E. L., P. Kampfer, B. K. Patel, V. Gurtler, and R. J. Seviour. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 953–963.

(15) Nemeč, A., L. Dijkshoorn, I. Cleenwerck, T. De Baere, D. Janssens, T. J. Van Der Reijden, P. Jezek, and M. Vaneechoutte. 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1563–1567.

(16) Nemeč, A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte, T. J. van der Reijden, and L. Dijkshoorn. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1891–1899.

(17) Barbe, V., D. Vallenet, N. Fonknechten, A. Kreimeyer, S. Oztaş, L. Labarre, S. Cruveiller, C. Robert, S. Duprat, P. Wincker, L. N. Ornston, J. Weissenbach, P. Marliere, G. N. Cohen, and C. Medigue. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* 32: 5766–5779.

(18) Bernard La Scola., Vijay A. K. B. Gundi, Atieh Khamis, Didier Raoult. 2006. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(3): 827–832.

(19) Nemeč, A., L. Dijkshoorn, I. Cleenwerck, T. De Baere, D. Janssens, T. J. Van Der Reijden, P. Jezek, and M. Vaneechoutte. 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:

1563–1567.

(20) Vijay A. K. B. Gundi, Lenie Dijkshoorn, Sophie Burignat, Didier Raoult and Bernard La Scola. 2009. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species *Microbiology*, 155: 2333–2341.

(21) Atieh Khamis, Didier Raoult, and Bernard La Scola. 2005. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. 43: 1934–1936.

(22) MARIO VANECHOUTTE, LENIE DIJKSHOORN, INGELA TJERNBERG, ABDESLAM ELAICHOUNI, PAUL DE VOS, GEERT CLAEYS, AND GERDA VERSCHRAEGEN. 1995. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. 33(1): 11–15.

(23) Gerner–Smidt, P., I. Tjernberg, and J. Ursing. 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 29: 277–282.

(24) Wen–Chien Ko, Nan–Yao Lee, Siou Cing Su, Lenie Dijkshoorn, Mario Vaneechoutte, Li–Rong Wang, Jin–Jou Yan, and Tsung Chain Chang. 2008. Oligonucleotide Array–Based Identification of Species in the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* Complex in Isolates from Blood Cultures and Antimicrobial Susceptibility Testing of the Isolates. 46: 2052–2059.

(25) P.J.M Bouvet and P.a.D Grimont. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. 138: 569–578.

(26) Yu Mi Lim, Kyeong Seob Shin, and Jungmin Kim¹. 2007. Distinct Antimicrobial Resistance Patterns and Antimicrobial Resistance-Harboring Genes According to Genomic Species of *Acinetobacter* Isolates. 42: 902-905.

Table 1 . *Acinetobacter* reference strains used in this study

Species name	16S rRNA gene	<i>rpoB</i> gene	Type strain
<i>A.baumannii</i>	X81660	DQ207471	ATCC 19606
<i>A.baylyi</i>	AF509820	DQ207472	DSM 14961
<i>A.beijerinckii</i>	AJ626712		CCUG 51249
<i>A.berezinae</i>	Z93443	DQ207475	ATCC 17924
<i>A.bouvetii</i>	AF509827	DQ207473	CCUG 50766
<i>A.calcoaceticus</i>	AJ888983	DQ207474	ATCC 23055
<i>A.gernerii</i>	AF509829	DQ207482	DSM 14967
<i>A.grimontii</i>	EF611411	DQ207483	CCUG 50767
<i>A.guillouiae</i>	X81659	DQ207476	ATCC 11171
<i>A.gyllenbergii</i>	AJ293694		CCUG 51248
<i>A.haemolyticus</i>	X81662	DQ207484	ATCC 17906
<i>A.johnsonii</i>	Z93440	DQ207485	ATCC 17909
<i>A.junii</i>	X81664	DQ207486	ATCC 17908
<i>A.lwoffii</i>	X81665	DQ207487	ATCC 15309
<i>A.parvus</i>	AJ293691	DQ207488	CCUG 48800
<i>A.radioresistens</i>	X81666	DQ207489	ATCC 43998
<i>A.schindleri</i>	AJ278311	DQ207490	CCUG 45560
<i>A.soli</i>	EU290155		KCTC 22184
<i>A.tandoii</i>	AF509830	DQ207491	DSM 14970
<i>A.tjernbergiae</i>	AF509825	DQ207492	DSM 14971
<i>A.towneri</i>	AF509823	DQ207493	DSM 14962
<i>A.ursingii</i>	AJ275038	DQ231239	CCUG 45559
<i>A.venetianus</i>	AJ295007		ATCC 31012
Genomicspecies3	Z93436	DQ207479	
Genomicspecies6	Z93439	DQ207480	
Genomicspecies9	Z93442	DQ207481	
Genomicspecies13	Z93446	DQ207477	
Genomicspecies16	Z93451	DQ207478	

Table 2 . Primers used for amplification and sequencing of 16S rRNA gene and *rpoB* gene of *Acinetobacter*

Primer	Sequence (5' to 3')	Amplification size(bp)
27F 1492R	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	1400
Ac-rpoB-541F Ac-rpoB-1400R	TAY CGY GGB TCA TGG YTR GAY TT TCR CCN ACW GAA CGN ACR CG	860

Table 3. Comparison of the identification results by *rpoB* gene analysis, 16s rRNA gene analysis and Vitek 2 system

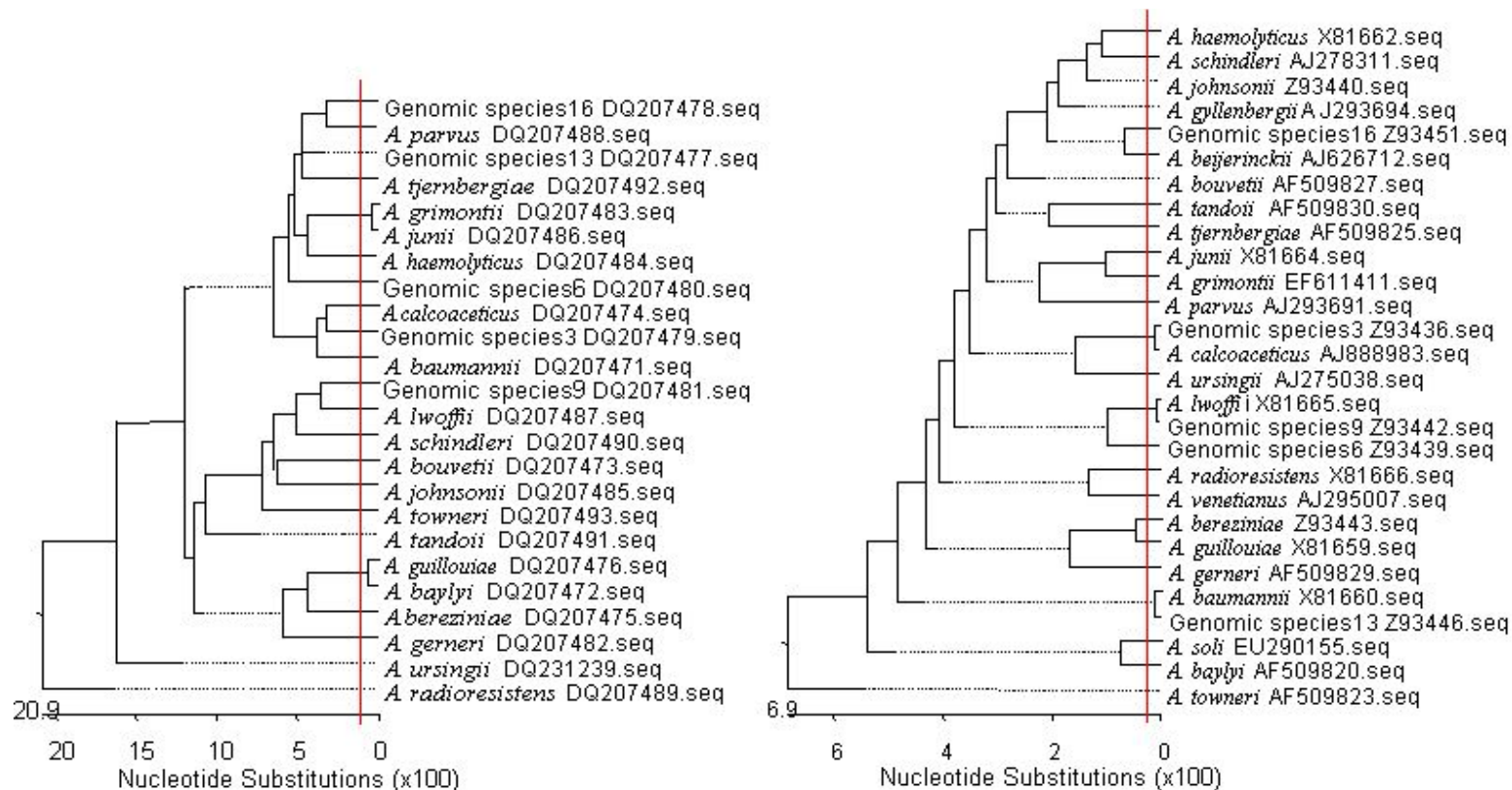
Group*	N	<i>rpoB</i> gene analysis	N	16s rRNA gene analysis	N	Vitek 2 system	N
A	1	<i>A. ursingii</i>	1	<i>A. ursingii</i>	1	<i>A. lwoffii</i>	1
B	75	<i>A. baumannii</i>	53	<i>A. baumannii</i> /Genomic species 13 <i>Acinetobacter spp.</i>	52	<i>A. baumannii complex</i>	53
		Genomic species 3	5	<i>A. calcoaceticus</i> /Genomic species 3	5	<i>A. baumannii complex</i> <i>A. lwoffii</i>	4 1
		<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. calcoaceticus</i> /Genomic species 3	1	<i>A. baumannii complex</i>	1
		<i>Acinetobacter spp.</i>	16	<i>Acinetobacter spp.</i>	14	<i>A. baumannii complex</i>	12
				<i>A. baumannii</i> /Genomic species 13 <i>A. gyllenbergii</i>	1 1	<i>A. lwoffii</i>	4
C	19	<i>A. bereziniae</i>	12	<i>Acinetobacter spp.</i>	12	<i>A. lwoffii</i>	12
		Genomic species 16	4	<i>Acinetobacter spp.</i>	4	<i>A. lwoffii</i> <i>A. baumannii complex</i> <i>A. haemolyticus</i>	2 1 1
		<i>A. junii/A. grimontii</i>	3	<i>Acinetobacter spp.</i>	2	<i>A. junii</i>	3
				<i>A. baumannii</i> /Genomic species 13	1		

* After the comparison of the identification results by *rpoB* gene analysis and 16S rRNA gene analysis, we divided 95 clinical isolates of *Acinetobacter* as follows: Group A, consistent result between two methods; Group B, similar result between two methods; Group C, different result between two methods.

Table 4. Comparison of antimicrobial susceptibility test results according to *Acinetobacter* species

Identification method	Antibiotics Bacteria	N	CAZ		GEN		IPM		PIP		TZP		TOB		TMP		MEM		
			%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R			
<i>rpoB</i> gene	<i>A. baumannii</i>	51	0	100	9.8	86.3	27.5	72.5	0	100	5.9	88.2	9.8	52.9	33.3	66.7	27.5	72.5	
	<i>A. bereziniae</i>	12	8.3	33.3	41.7	33.3	75	25	58.3	33.3	83.3	8.3	50	16.7	50	50	75	25	
	Genomic species 3	5	40	20	100	0	80	20	40	20	80	20	80	0	80	20	80	20	
	Genomic species 16	4	NT *		50	25	50	50	50	25	50	25	50	50	NT *		NT *		
	<i>A. junii</i> / <i>A. grimontii</i>	2	NT *		NT *		100	0	NT *		100	0	100	0	NT *		100	0	
	<i>A. calcoaceticus</i>	1	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	
	<i>A. ursingii</i>	1	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	
	<i>Acinetobacter spp.</i>	15	40	13.3	80.3	13.3	86.7	6.7	46.7	26.7	73.3	6.7	86.7	0	93.3	6.7	80	13.3	
	Vitek 2	<i>A. baumannii</i> complex	69	10.1	79.7	29.0	66.7	43.5	56.5	10.1	78.3	26.1	68.1	29.0	39.1	46.4	53.6	42	58
		<i>A. hwoffii</i>	19	15.8	31.6	57.9	21.1	73.7	21.1	52.6	36.8	73.7	10.5	63.2	15.8	63.2	36.8	73.7	21.2
<i>A. junii</i>		2	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	
<i>A. haemolyticus</i>		1	NT *		0	100	0	100	100	0	NT *		0	100	NT *		NT *		

* N, Number of strains; NT, not tested; Abbreviations for antimicrobials: CAZ; Ceftazidime, GEN; Gentamicin, IPM; Imipenem, PIP; Piperacillin, TZP; Piperacillin/Tazobactam, TOB; Tobramycin, TMP; Trimethoprim/Sulfamethoxazole, MEM; Meropenem.



(a) (b)
 Figure 1: Comparison of phylogenetic trees of the *rpoB* gene (a) and 16S rRNA (b) of *Acinetobacter* species.

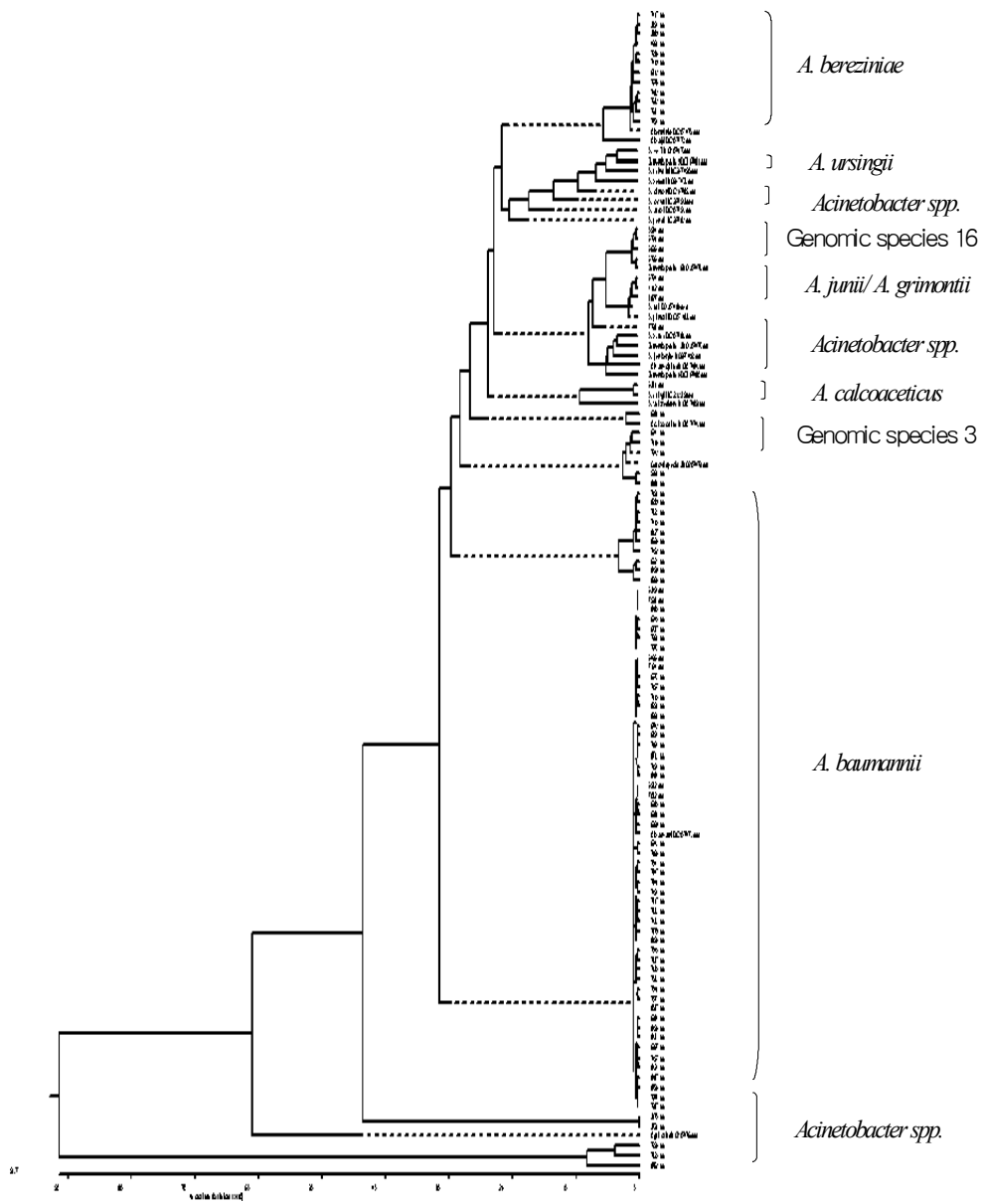


Figure 2. The result of identification of 95 clinical isolates of *Acinetobacter* based on the phylogenetic analysis of *rpoB* gene sequence analysis.

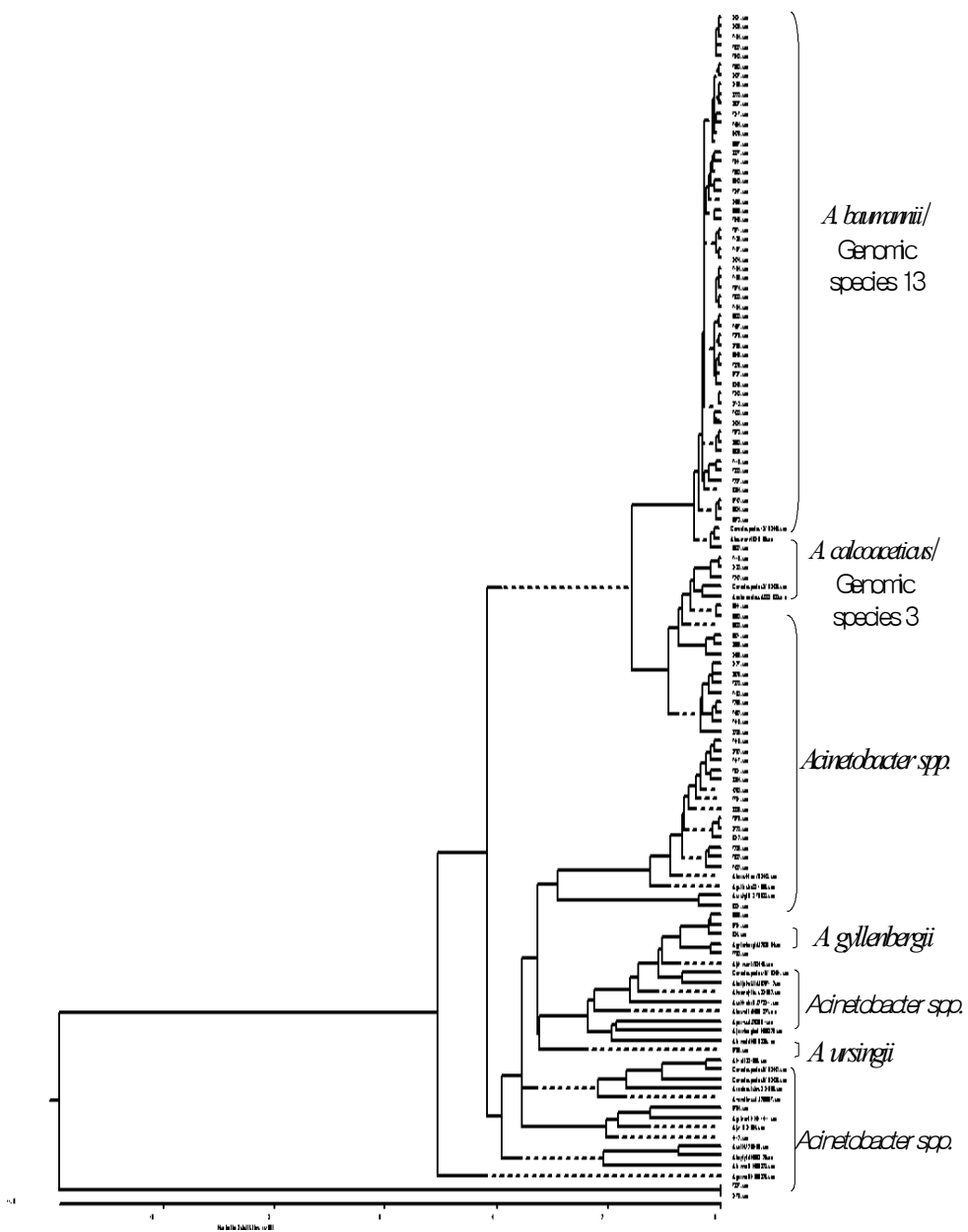


Figure 3. The result of identification of 95 clinical isolates of *Acinetobacter* based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence analysis

VI. 감사의 말씀

논문을 마치고 지금 이렇게 감사의 글을 쓰기까지 많은 시간들이 머릿속에 스쳐지나갑니다. 대학 졸업과 동시에 사회생활을 하여 이제까지 배워왔던 학문과 다른 새로운 분야를 접하게 되면서 스스로 부족함 느끼게 되어 다시 공부를 시작 해야겠다 마음먹게 되었습니다. 지난 2년여의 시간은 많은 분들의 가르침으로 실력향상은 물론 인격적으로 성숙 할 수 있었던 거 같아 그분들께 이렇게 감사의 글을 올립니다.

부족한 저를 끝까지 이끌어 주시고 격려해주시며 많은 인정과 사랑을 베풀어주신 지도 교수 장숙진 교수님의 은혜에 고개 숙여 감사드립니다. 교수님과의 만남이 저에겐 큰 행운이었습니다. 바쁘신 가운데 부족한 저의 논문을 심사해주신 박영진 교수님과 문대수 교수님의 세심한 배려 덕분에 좀 더 나은 논문이 나올 수 있었던거 같아 감사하게 생각합니다. 대학원 전 과정을 통해 저에게 귀감이 되어주시고 좋은 가르침을 주신 여러 교수님과 박사님들께 감사 인사드립니다. 바쁜 업무 중에도 항상 따뜻하게 맞아주시고 도움을 주신 조선대학교 진단검사의학과 미생물검사실과 분자생물검사실 여러 선생님들 덕분에 제가 어려움 없이 많은걸 배울 수 있었습니다. 실험에 어려움이 있거나 조언을 구하고 싶을 때 언제나 큰 도움을 주신 조선대학교 치과병원 구강생화학실의 국중기 교수님과 연구원 선생님들께 감사합니다. 같은 실험실에서 함께한 연구원 선생님들과 친구가 되어준 미선이에게도 고맙다는 말을 전합니다. 다시 학교생활을 하며 힘들어하는 저에게 큰 힘이 되어 주고 격려해주며 지지해준 언니들과 친구들 고맙고 사랑해.

다니던 직장을 그만두고 대학원에 입학한다고 했을 때, 제 의견 존중해주시고 믿어주시며 절대적 사랑으로 지금까지 지켜봐 주신 부모님과 지금 군대에서 제대할 날만을 기다리고 있을 동생 경용이 사랑하고 고맙습니다.

산은 공들여 올라가는 자에게만 자리를 내준다 라는 격언을 새기며 쉽게 얻으려하지 않고, 끊임없이 노력하는 이민정이 되겠습니다. 감사합니다.

2010년 12월 이민정

