



### 저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



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](#)

2012년 8월  
박사학위논문

*Acinetobacter* 균종 검출을 위한  
종-특이 PCR 기법 개발

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

2012년 8월

박사학위논문

*Acinetobacter* 균종 검출을 위한 종-특이 PCR 기법 개발

이 학 민

*Acinetobacter* 균종 검출을 위한  
종-특이 PCR 기법 개발

Development of species-specific PCR method for  
detection of *Acinetobacter* species

2012년 8월 24일

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

*Acinetobacter* 균종 검출을 위한  
종-특이 PCR 기법 개발

지도교수 장 숙 진

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012년 4월

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

이학민의 박사학위논문을 인준함.

위원장    조선대학교    교수    문 대 수    인

위    원    조선대학교    교수    국 중 기    인

위    원    조선대학교    교수    박    건    인

위    원    조선대학교    교수    강 성 호    인

위    원    조선대학교    교수    장 속 진    인

2012년 6월

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차 .....	ii
도목차 .....	iii
Abstract .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
III. 결과 .....	8
IV. 고찰 .....	12
V. 결론 .....	15
참고문헌 .....	17

# 표 목 차

Table 1. PCR primers used in this study .....	22
Table 2. PCR conditions used for the detection of <i>Acinetobacter rpoB</i> genes .....	23
Table 3. The results of molecular identification of 83 clinical strains of <i>Acinetobacter</i> species in this study .....	24
Table 4. Distribution of 382 strains of <i>Acinetobacter</i> used for evaluation of <i>Acinetobacter</i> species-specific PCR .....	25
Table 5. Result of evaluation for <i>Acinetobacter</i> species-specific PCR .....	26

# 도 목 차

Fig. 1. Result of the gradient PCR for <i>A. calcoaceticus</i> -specific PCR .....	27
Fig. 2. Result of the gradient PCR for <i>A. baumannii</i> -specific PCR ..	28
Fig. 3. Result of the gradient PCR for <i>A. pittii</i> -specific PCR .....	29
Fig. 4. Result of the gradient PCR for <i>A. nosocomialis</i> -specific PCR .....	30
Fig. 5. Result of the gradient PCR for <i>A. ursingii</i> -specific PCR .....	31
Fig. 6. Result of the gradient PCR for <i>A. lwoffii</i> -specific PCR .....	32
Fig. 7. Result of the gradient PCR for <i>A. bereziniae</i> -specific PCR ·	33
Fig. 8. Result of <i>A. calcoaceticus</i> -specific PCR .....	34
Fig. 9. Result of <i>A. baumannii</i> -specific PCR .....	35
Fig. 10. Result of <i>A. pittii</i> -specific PCR .....	36
Fig. 11. Result of <i>A. nosocomialis</i> -specific PCR .....	37
Fig. 12. Result of <i>A. ursingii</i> -specific PCR .....	38
Fig. 13. Result of <i>A. lwoffii</i> -specific PCR .....	39
Fig. 14. Result of <i>A. bereziniae</i> -specific PCR .....	40
Fig. 15. Result of the detection limit of <i>A. calcoaceticus</i> -specific PCR (Lane 1 through 7) and <i>gyrB</i> Multiplex 2 PCR (Lane 8 through 14) .....	41
Fig. 16. Result of the detection limit of <i>A. baumannii</i> -specific PCR (Lane 1 through 7) and <i>gyrB</i> 1 PCR (Lane 8 through 14)	42
Fig. 17. Result of the detection limit of <i>A. pittii</i> -specific PCR (Lane 1 through 7) and <i>gyrB</i> Multiplex 2 PCR (Lane 8 through 14) .....	43



Fig. 18. Result of the detection limit of *A. nosocomialis*-specific PCR  
(Lane 1 through 7) and *gyrB* Multiplex 2 PCR (Lane 8  
through 14) .....44

Fig. 19. Result of the detection limit of *A. ursingii*-specific PCR ....45

Fig. 20. Result of the detection limit of *A. lwoffii*-specific PCR .....46

Fig. 21. Result of the detection limit of *A. bereziniae*-specific PCR  
.....47

# ABSTRACT

## Development of species-specific PCR method for detection of *Acinetobacter* species

Li, Xue Min.

Advisor: Prof. Sook Jin Jang, M.D., Ph.D

Dept of Bio New Drug Development

Graduate School of Chosun University

Background: The accurate identification of each species of *Acinetobacter* by biochemical identification methods is very difficult. Even by 16S rDNA PCR sequencing, many species of *Acinetobacter* could not be differentiated because of high sequence similarity among them. The aim of this study is to develop species-specific PCR method for identification of frequently isolated *Acinetobacter* in clinical specimens.

Methods: The *A. calcoaceticus*-, *A. baumannii*-, *A. pittii*-, *A. nosocomialis*-, *A. lwoffii*-, *A. ursingii*- and *A. bereziniae*-specific PCR primers were designed based on the nucleotide sequences of *rpoB* gene using PrimerSelect program. The specificity of these primers were investigated with the genomic DNAs of 19 reference strains of *Acinetobacter* species and 15 reference strains belong to genera other than *Acinetobacter*. To obtain clinical test strains of various species of *Acinetobacter*, 293 *Acinetobacter* strains identified by Vitek 2 automated system were further identified to the species

level by molecular method. By performing *gyrB* Multiplex 1 PCR for the detection of *A. baumannii* and *A. nosocomialis* developed by Higgins, we detected 210 strains of *A. baumannii*. The remaining 83 strains were further identified by 16s rDNA sequencing, and *rpoB* gene PCR–sequencing. Previously identified strains of 89 *Acinetobacter* clinical isolates and 293 *Acinetobacter* strains identified in this study were used for evaluation of *Acinetobacter* species–specific PCR.

Results: The species composition of 293 *Acinetobacter* species identified in this study is as follows: 210 *A. baumannii*, 62 *A. nosocomialis*, 4 *A. pittii*, 1 *A. calcoaceticus*, 4 *A. junii*, 2 *A. johnsonii*, 3 *A. lwoffii*, 3 *A. bereziniae*, 3 *A. guillouiae*, and 1 *A. radioresistens*. The sensitivity of the *A. calcoaceticus*–, *A. pittii*–, *A. nosocomialis*–, *A. lwoffii*–, *A. ursingii*– and *A. bereziniae*–specific PCR were 100% and the sensitivity of *A. baumannii*–specific PCR was 98.9%. The specificity of all the PCR methods including *A. calcoaceticus*–, *A. baumannii*–, *A. pittii*–, *A. nosocomialis*–, *A. lwoffii*–, *A. ursingii*– and *A. bereziniae*–specific PCR were 100%. *A. baumannii*– and *A. nosocomialis*–specific PCR primers detected 10–fold lower genomic DNA than *gyrB* Multiplex 1 PCR primers. In addition, *A. calcoaceticus*– and *A. pittii*–specific PCR primers also detected 10–fold lower genomic DNA than *gyrB* Multiplex 2 PCR primers.

Conclusion: These results revealed that the *A. calcoaceticus*–, *A. baumannii*–, *A. pittii*–, *A. nosocomialis*–, *A. lwoffii*–, *A. ursingii*– and *A. bereziniae*–specific PCR would be useful for the detection of *Acinetobacter* clinical isolates at the species level.

# I. 서 론

*Acinetobacter* 종(species)은 흔히 토양이나 물 등의 자연환경에 널리 존재하며 특히 병원환경에 오랫동안 서식하다가 면역력이 약한 환자에게서 결막염, 피부염, 폐렴, 뇌수막염, 패혈증, 심내막염, 복강 내 감염, 수술부위 감염, 요로감염 등의 합병증을 일으키는 전형적인 병원감염균이다(1).

현재까지 기술된 *Acinetobacter* 속(family)에 포함되는 종명이 부여된 균종은 27종 (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>)이고 이외에도 DNA-DNA hybridization 방법으로 동정되는 genomic species(genomospecies)는 11종이 있다(2). 그중에서 *A. calcoaceticus* (genospecies 1형), *A. baumannii* (genospecies 2형), *A. pittii* (genospecies 3형) 및 *A. nosocomialis* (genospecies 13 TU)는 유전적으로 밀접하게 연관되어 있어서 일상적으로 검사실에서 사용하는 표현형적 방법들로는 감별하기 어렵다. 그래서 이들 균종들을 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (ACB complex)라는 군으로 묶어서 지칭해왔다(3).

*A. baumannii*가 아닌 다른 균종들이 병원감염질환에 관여된다고 여겨지고 있으나 그들의 역할은 아직 분명하지 않다. 이런 균들이 대개 다수의 항생제에 감수성이지만 인체 질환 병원균으로서의 빈도와 역할을 조사하기 위해 이들을 *A. baumannii* 균종으로부터 구별해야만 한다(4).

일상적인 검사실에서 흔히 쓰고 있는 API 20NE나 Vitek 2, Phoenix 및 MicroScan Walk-Away 등의 수기적 및 자동화된 미생물 동정 장비가 이들 균종들을 구별하지 못하여 ACB complex에 속하는 25%의 *Acinetobacter* 균주를 *A. baumannii*로 잘못 동정하고 있다(5).

이러한 표현형적 동정법의 한계 때문에 다양한 분자생물학적 균종 동정법이 개발되어 왔다. 그 중 DNA-DNA hybridization과 amplified rRNA restriction analysis(ARDRA)와 같은 분자생물학적 기법들은 노동력이 많이 필요하고 판독이 어려우며 임상적으로는 거의 쓰이지 않고 있다. 세균을 종 수준으로 동정하는 데 DNA-DNA hybridization법과

더불어 golden standard로 사용되는 16S rDNA 핵산염기서열비교법이 일반적으로 사용되고 있다. 하지만, *Acinetobacter* 종 간의 16S rDNA 핵산염기서열간의 상동성이 매우 크기 때문에 16S rDNA 핵산염기서열 결정법은 *Acinetobacter* 종의 검출 또는 동정에는 사용하기 어렵다. 최근 RNA polymerase beta-subunit gene(*rpoB*), flanking spacer regions, 16S-23S rRNA gene spacer regions의 핵산염기서열분석을 이용하여 *Acinetobacter* 균주를 종 수준으로 동정하는 방법이 제안되어 왔다(5). *A. baumannii*를 포함한 *Acinetobacter* genomic species가 중요한 병원균으로 증가하고 있기 때문에 최근 연구들은 신뢰성있는 동정법의 개발에 주안을 두고 있다. 이러한 방법들 중에서 *rpoB*가 *Acinetobacter* 균종을 포함한 다양한 세균 균종의 분류학적 분류와 동정에 가장 유용한 도구 중 하나로 여겨지고 있다(4, 6).

*Acinetobacter* 균종들의 *rpoB* 핵산염기서열도 16S rDNA처럼 종간의 상동성이 높은 conserved region과 상동성이 떨어지는 variable region이 교대로 존재하기 때문에, variable region의 핵산염기서열을 비교분석하여 *Acinetobacter* 종을 동정하는 데 이용될 수 있다. 하지만, 현실적으로 병원 검사실에서 이러한 방법을 이용하기에는 시간적 및 경제적 제한이 있다. 현재까지 개발된 세균 검출법 중에서 임상에서 비교적 경제적이면서 신속하게 이용될 수 있는 방법은 일반 PCR기법이다. 그러므로, 본 연구에서는 임상에서 주로 많이 검출되면서도 감별이 필수적인 ACB complex에 속하는 4개 *Acinetobacter* 균종(*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*)과 *A. lwoffii*, *A. ursingii*, *A. bereziniae*를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 종-특이 PCR 프라이머를 개발하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상 균주 및 균주 배양

본 연구에서는 34주의 참고균주와 382주의 임상분리균주를 대상으로 연구하였다. 그중 34주의 참고균주들은 다음과 같다. *Acinetobacter baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>, *Acinetobacter calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>, *Acinetobacter haemolyticus* KCTC 12404<sup>T</sup>, *Acinetobacter johnsonii* KCTC 12405<sup>T</sup>, *Acinetobacter junii* KCTC 12406<sup>T</sup>, *Acinetobacter parvus* KCTC 12408<sup>T</sup>, *Acinetobacter schindleri* KCTC 12409<sup>T</sup>, *Acinetobacter ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>, *Acinetobacter baylyi* KCTC 12413<sup>T</sup>, *Acinetobacter grimontii* KCTC 12416<sup>T</sup>, *Acinetobacter tandoii* KCTC 12417<sup>T</sup>, *Acinetobacter bereziniae* KCTC 12683, *Acinetobacter guillouiae* KCTC 12684, *Acinetobacter soli* KCTC 22184<sup>T</sup>, *Acinetobacter lwoffii* KCCM 40172, *Acinetobacter gyllenbergii* CCUG 51248<sup>T</sup>, *Acinetobacter beijerinckii* CCUG 51249<sup>T</sup>, *Acinetobacter nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>, *Acinetobacter pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>, *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358<sup>T</sup>, *Vibrio fluvialis* KCCM 40827, *Vibrio vulnificus* KCCM 41665, *Vibrio mimicus* KCCM 42257, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917<sup>T</sup>, *Salmonella pneumoniae* KCTC 1925<sup>T</sup>, *Shigella sonnei* KCTC 2518<sup>T</sup>, *Staphylococcus pyogenes* KCTC 3208<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* KCTC 29213<sup>T</sup>, *Escherichia coli* ATCC 25922<sup>T</sup>, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212<sup>T</sup>, *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327<sup>T</sup>, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324<sup>T</sup>, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603<sup>T</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>T</sup>이다. 임상분리균주는 2004년 4월부터 2012년 4월까지 조선대학교 병원의 환자 검체에서 분리된 균주 중 Vitek 2 GNI card(bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., U.S.A.) 검사 결과, *Acinetobacter* species로 동정된 임상분리균주 382주를 대상으로 하였다.

*Acinetobacter* 균종들의 표준균주와 참고균주 및 임상분리균주들은 LB broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 사용하였다.

## 2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1.5 ml를 10,000 x g의 원심력을 이용하여 수확하고, G-spin™ 지놈 DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균 유전체 DNA를 추출하였다. 즉, 수확한 세균에 50 µl의 Pre-incubation solution과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 후 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 µl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 10,000 x g에서 1분간 원심분리 하였다. Column에 500 µl의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리 하였다. 여기에 500 µl의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 µl의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 10,000 x g에서 1분간 원심분리 하여 세균 지놈 DNA를 추출하였고, 이를 4°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

## 3. 분자생물학적 방법을 이용한 임상균주들의 동정

Vitek GNI card로 *Acinetobacter* species로 동정된 임상분리균주 293주는 분자생물학적 방법으로 재동정하였다. 즉, 각 임상분리균주들로부터 *gyrB* 일부분을 증폭하는 *gyrB* Multiplex 1 PCR(증폭산물 294bp, 490bp)을 시행하였다(7). 이때 사용한 프라이머는 sp2F(5' -GTT CCT GAT CCG AAA TTC TCG-3' ), sp4F(5' -CAC GCC GTA AGA GTG CAT TTA-3' )와 sp4R(5' -AAC GGAGCT TGT CAG GGT TA-3' )이었으며, 이때 PCR 조건은 다음과 같다. 초기 변성은 94°C에서

2분간 시행하였고, 변성(94℃, 1분), 결합(60℃, 1분), 및 신장(72℃, 1분)의 세 과정을 25회 반복하고, 추가적인 중합(72℃, 7분)을 시행하였다.

위 *gyrB* Multiplex 1 PCR 결과에서 *A. baumannii*로 판정된 균주들은 더 이상 검사를 진행하지 않았다. *A. baumannii*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 종으로 판정된 균주들은 아래와 같은 검사를 더 진행하였다. 16S rDNA(약 1.4kbp) 및 *rpoB* 일부분(350bp)을 증폭하는 PCR을 시행하였다(8, 9). 이때 16S rDNA의 증폭을 위해 사용한 프라이머는 27F(5 '-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R(5 '-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')이었으며, 이때 PCR 조건은 다음과 같다. 초기 변성은 94℃에서 5분간 시행하였고, 변성(94℃, 1분), 결합(55℃, 30초), 및 신장(72℃, 45초)의 세 과정을 30회 반복하고, 추가적인 중합(72℃, 10분)을 시행하였다. *rpoB* 일부분의 증폭을 위해 사용한 프라이머는 696F(5 '-TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G-3')와 1093R(5 '-CMA CAC CYT TGT TMC CRT GA-3')이었다. 이때 PCR 조건은 다음과 같다. 초기 변성은 94℃에서 5분간 시행하였고, 변성(94℃, 30초), 결합(56℃, 30초), 및 신장(72℃, 1분)의 세 과정을 35회 반복하고, 추가적인 중합(72℃, 10분)을 시행하였다.

PCR 증폭산물은 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 와 ABI PRISM 3730 DNA analyzer(PE Applide Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하는 솔젠트 회사(Solgent Co, Daejeon, Korea)에 핵산염기서열분석을 의뢰하였다. 이들 분석한 핵산염기서열을 미국국립보건원에서 제공하는 Blast 검색 프로그램을 이용하여 세균 종을 판정하였다. 이때, 기존의 *Acinetobacter* spp. 표준균주와 상동성이 98%이상이면서 상동성이 가장 높은 균종명으로 동정하였다.

그리고 이전 연구에서 위 분자생물학적 방법(*gyrB* Multiplex 1 PCR, 16S rDNA PCR, *rpoB* PCR)으로 동정된 임상분리균주 89주를 더 사용하였다. 그 89주의 균종 분포는 *A. baumannii* 54주, *A. calcoaceticus* 6주, *A. pittii* 5주, *A. nosocomialis* 2주, *A. bereziniae* 14주, *A. gyllenbergii* 4주, *A. junii* 3주, *A. ursingii* 1주로 구성되었다.



#### 4. 중합효소연쇄반응 프라이머의 설계 및 제작

GenBank의 데이터 베이스에서 *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. urisingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae*의 *rpoB* 핵산염기서열을 얻었다. 이런 핵산염기서열을 MegAlign 컴퓨터 프로그램(Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, USA)을 이용하여 상동성을 분석하였고, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. urisingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae*의 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 하고, PrimerSelect 프로그램 (DNASTAR Inc.)을 이용하여 *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. urisingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae*를 검출할 수 있는 PCR 프라이머 쌍을 각각 설계하여 Acal-F와 Acal-R, Abau-F와 Abau-R, Apit-F와 Apit-R, Acon-F와 Acon-R, Aurs-F와 Aurs-R, Alwo-F와 Alwo-R 및 Aber-F와 Aber-R로 명명하였다(Table 1). 이때 설계된 primer 쌍은 Bioneer회사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 프라이머 쌍을 제작하였다.

#### 5. *Acinetobacter* 종-특이적 중합효소연쇄반응 프라이머의 종-특이도 및 민감도 측정

앞에서 설계 및 제작된 *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. urisingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae* 검출 및 동정을 위한 *Acinetobacter* 종-특이적 PCR 프라이머의 종-특이도 및 민감도를 측정하기 위해 사용한 균주들은 다음과 같다. 즉 *Acinetobacter* 속에 속한 19종의 표준균주와 *Acinetobacter*가 아닌 다른 속에 속한 표준균주나 참고균주 15주, 본 연구에서 분자생물학적 동정법으로 동정된 293주와 이전 연구에서 분자생물학적 방법으로 동정된 임상분리균주 89주 총 416주를 사용하였다.

*A. baumannii*-specific PCR, *A. calcoaceticus*-specific PCR, *A.*

*pittii*-specific PCR, *A. nosocomialis*-specific PCR에서는 위의 416주를 다 검사하여 종-특이도 및 민감도를 측정하였다. *A. lwoffii*-specific PCR과 *A. ursingii*-specific PCR, *A. bereziniae*-specific PCR은 종-특이도 및 민감도를 측정할 때는 임상분리주 수를 각 균종을 대표하는 균주들을 모은 41주와 표준균주나 참고균주 34주를 합친 총 75주로 검사하여 평가하였다.

*Acinetobacter* 종-특이적 PCR 프라이머를 이용한 각 PCR의 최적온도를 찾아내기 위해 gradient PCR을 시행하였다. 52°C-72°C의 온도 범위를 균등분배하여 12가지 결합온도로 PCR을 시행한 후 최적의 결합온도를 선택하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 template DNA 2ng, forward primer(10pM/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, reverse primer(10pM/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l 넣고 증류수를 혼합하여 총 20  $\mu$ l PCR 반응액을 만들었다. AccuPower PCR PreMix에는 4가지 deoxynucleotide triphosphate가 5 nmole씩 들어있고, 0.8 mole의 KCl, 0.2 mole의 Tris-HCl( pH 9.0), 0.03 mole의 MgCl<sub>2</sub>, 1 unit의 *Taq* polymerase가 들어있다. PCR 반응 혼합액은 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Co, CT, USA)으로 Table 2와 같은 조건으로 시행하였다.

본 연구에서 개발한 여러 *Acinetobacter* 종-특이적 PCR의 최저검출 한계를 측정하기 위해 *Acinetobacter* 표준균주 지놈 DNA를 2 ng에서 2 fg까지 연속 10배 희석한 후 각 희석액을 주형으로 PCR을 시행하였다. PCR은 전술한 바와 같이 AccuPower PCR PreMix와 Gene Amp PCR System 9600을 이용하여 시행하였다. PCR 증폭산물 20  $\mu$ l 중 2  $\mu$ l를 1.5% agarose gel과 Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-actate, 0.001 M EDTA, [pH 8.0])를 이용해서 100V에서 30분간 전기영동을 시행하였다. 증폭산물은 ethidium bromide로 염색한 후 UV transillumination로 발색시켜 최저검출한계를 확인하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. *Acinetobacter* 균종의 분자생물학적 동정 결과

본 연구에서는 병원 환자에서 분리된 균주 중 Vitek GNI card를 통해 ACB complex나 *Acinetobacter* 속에 포함되는 균종으로 동정된 293주를 대상으로 *gyrB* Multiplex 1 PCR을 진행한 결과, 210주가 *A. baumannii* 양성으로 나타나서 *A. baumannii*로 동정하였다. 나머지 83주는 *gyrB* Multiplex 1 PCR *A. baumannii* 음성을 나타내서 16S rDNA PCR, *rpoB* PCR을 더 시행한 후 증폭산물을 Solgent 회사에 핵산염기서열분석을 의뢰한 후 그 핵산염기서열을 NCBI나 EZTAXON database에 조회하여 분석한 결과, *A. nosocomialis* 62주, *A. pittii* 4주, *A. calcoaceticus* 1주, *A. Iwoffii* 3주, *A. bereziniae* 3주, *A. guillouiae* 3주, *A. junii* 4주, *A. johnsonii* 2주, *A. radioresistens* 1주로 동정되었다(Table 3).

#### 2. *Acinetobacter* 종-특이 PCR 프라이머 설계

본 연구에서 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc.)을 이용하여 설계한 *Acinetobacter* 7균종(*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. ursingii*, *A. Iwoffii*, *A. bereziniae*)에 대한 종-특이적 PCR 프라이머들의 핵산염기서열과 예상되는 PCR 증폭산물의 크기는 Table 1에 정리하였다.

#### 3. *Acinetobacter* 종-특이 PCR 프라이머 쌍의 최적의 결합온도 측정

본 연구에서 설계 제작한 7종의 *Acinetobacter* 종-특이적 PCR 프라이머 쌍으로 gradient PCR을 시행한 결과, Acal-F/Acal-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 68℃, Abau-F/Abau-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 66℃, Apit-F/Apit-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 68℃,

Anos-F/Anos-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 66°C, Aurs-F/Aurs-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 68°C, Alwo-F/Alwo-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 66°C, Aber-F/Aber-R 프라이머 쌍의 최적의 결합온도는 64°C이다.

#### 4. *Acinetobacter* 종-특이 PCR 프라이머 쌍의 종-특이성 검증

Acal-F/Acal-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 *A. calcoaceticus*의 표준균주와 *Acinetobacter* 다른 균종의 표준균주 및 임상분리균주, 416주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. calcoaceticus*로 판정된 균주 8주 중 8주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. calcoaceticus*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 408주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 8).

Abau-F/Abau-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 416주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. baumannii*로 판정된 균주 265주 중 262주(98.86%)가 양성으로 나타났고 3주(1.14%)가 음성으로 나타났으며 *A. baumannii*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 동정된 151주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 9).

Apit-F/Apit-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 416주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. pittii*로 판정된 균주 10주 중 10주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. pittii*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 406주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 10).

Anos-F/Anos-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 416주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. nosocomialis*로 판정된 균주 64주 중 64주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. nosocomialis*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 352주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 11).

Aurs-F/Aurs-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 75주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. ursingii*로 판정된 균주 2주 중 2주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. ursingii*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 73주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 12).

Alwo-F/Alwo-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 75주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. lwoffii*로 판정된 균주 4주 중 4주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. lwoffii*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 71주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 13).

Aber-F/Aber-R 프라이머 쌍에 대한 종-특이성을 검증하기 위하여 75주의 PCR 평가 대상 균주들의 유전체 DNA로 PCR을 시행한 결과, *A. bereziniae*로 판정된 균주 17주 중 17주(100%)가 양성으로 나타났으며 *A. bereziniae*가 아닌 다른 *Acinetobacter* 균종으로 판정된 균주 58주 모두(100%) 음성으로 나타났다(Fig 14).

## 5. *Acinetobacter* 종-특이 PCR 프라이머 쌍의 지놈 DNA 최저검출한계 측정

Acal-F/Acal-R 프라이머로 *Acinetobacter calcoaceticus* 표준균주 (KCTC 2357) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었고 *gyrB* Multiplex 2 PCR 프라이머로 *Acinetobacter calcoaceticus* 표준균주 (KCTC 2357) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 2 ng이었다(Fig 15).

Abau-F/Abau-R 프라이머로 *Acinetobacter baumannii* 표준균주 (KCTC 2508) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 20 pg이었고 *gyrB* Multiplex 1 PCR 프라이머로 *Acinetobacter baumannii* 표준균주(KCTC 2508) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었다(Fig 16).

Apit-F/Apit-R 프라이머로 *Acinetobacter pittii* 표준균주(CCUG

61664) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 20 pg이었고 *gyrB* Multiplex 2 PCR 프라이머로 *Acinetobacter pittii* 표준균주(CCUG 61664) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었다(Fig 17).

Anos-F/Anos-R 프라이머로 *Acinetobacter nosocomialis* 표준균주(CCUG 61663) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 20 pg이었고 *gyrB* Multiplex 1 PCR 프라이머로 *Acinetobacter nosocomialis* 표준균주(CCUG 61663) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었다(Fig 18).

Aurs-F/Aurs-R 프라이머로 *Acinetobacter ursingii* 표준균주(KCTC 12410) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 20 pg이었다(Fig 19).

Alwo-F/Alwo-R 프라이머로 *Acinetobacter lwoffii* 표준균주(KCCM 40172) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었다(Fig 20).

Aber-F/Aber-R 프라이머로 *Acinetobacter bereziniae* 표준균주(KCTC 12683) 지놈 DNA를 증폭할 수 있는 최소 양은 200 pg이었다(Fig 21).

## IV. 고 찰

*Acinetobacter*균은 원내감염을 일으키는 주요 원인 균종으로 해마다 분리빈도가 증가하는 추세를 보이고 있다. *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (ACB complex)에 속해 있는 *A. calcoaceticus* (genospecies 1형), *A. baumannii* (genospecies 2형), *A. pittii* (genospecies 3형), 및 *A. nosocomialis* (genospecies 13형)는 생화학적인 특성이 유사하여서 유전학적 분류가 아닌 표현형 또는 생화학적 특징만으로 정확한 감별은 어렵다(10, 11, 12, 13, 14, 15). 본 연구에서는 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 ACB complex에 속하는 4개 *Acinetobacter* 균종(*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*)과 *A. ursingii*, *A. lwoffii*, *A. bereziniae*들에 대한 각각의 종-특이성 PCR 프라이머를 개발하였다.

본 연구에서 설계 및 제작한 ACB complex에 속하는 4종의 *Acinetobacter* 종-특이성 PCR 결과를 보면, *A. baumannii* 종-특이성 PCR 정확도는 98.9%였고 *A. calcoaceticus*-, *A. pittii*-, *A. nosocomialis*- 종-특이성 PCR 정확도는 모두 100%였다(Table 5). 본 연구에서 설계 및 제작한 *A. baumannii* 균종을 검출하는 Abau-F/bau-R와 *A. nosocomialis* 균종을 검출하는 Anos-F/Anos-R 프라이머는 Higgins 등(7)이 설계한 *gyrB* Multiplex 1 PCR 프라이머보다 10배 더 적은 양의 지놈 DNA를 검출할 수 있었고, *A. calcoaceticus* 균종을 검출하는 Acal-F/Acal-R와 *A. pittii* 균종을 검출하는 Apit-F/Apit-R 프라이머는 Higgins 등(5)이 설계한 *gyrB* Multiplex 2 PCR 프라이머보다 10배 더 적은 양의 지놈 DNA를 검출할 수 있었다(Fig 15-18). Multiplex PCR 프라이머는 특이적인 한 쌍이 아니기에 비특이적인 증폭산물이 증폭될 가능성이 높다. 본 연구에서 개발한 *Acinetobacter* 종-특이성 PCR 기법은 간단한 실험조작으로 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex(ACB complex)에 속하는 *Acinetobacter* 균주들을 신속하게 정확하게 검출할 수 있다. 현재 *Acinetobacter* 균종들 중 *A. calcoaceticus*(genospecies 1형)와 *A. pittii*(genospecies 3형)가 비슷하고 *A. baumannii*(genospecies 2형)와 *A. nosocomialis*(genospecies 13형)가

비슷하여 생화학적으로 감별하는데 한계가 있다(16). 현재 병원 환자에서 분리되는 *Acinetobacter* 균종은 주로 Vitek GNI card나 MicroScan 또는 상업용 kit에 의해 균종이 결정되는데, 표현형적 특성 및 생화학적 특성에 의한 동정법으로는 동일한 특성을 갖고 있는 여러 유전종의 동정에는 한계가 있다. Vitek GNI card로는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex(ACB complex)에 속하는 *Acinetobacter* 균주들을 정확하게 분리하고 동정하지 못하는 경우가 많다. 이러한 연구 결과들에 의하면, 본 연구에서 개발된 Abau-F/bau-R, Acal-F/Acal-R, Anos-F/Anos-R와 Apit-F/Apit-R 프라이머들은 각각 *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* 및 *A. pittii* 균주들을 중 수준으로 신속 정확하게 검출할 수 있어 임상에서 이들 세균 종의 검출에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 개발된 Aurs-F/Aurs-R, Alwo-F/Alwo-R, 및 Aber-F/Aber-R 프라이머들은 각각 *A. ursingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae* 들을 종-특이적으로 검출할 수 있었다(Fig. 12-14). 또한 이들 프라이머들은 각각의 표준균주 지놈 DNA를 20 pg 또는 200 pg까지 검출할 수 있었다(Fig. 19-20). *A. ursingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae* 들도 ACB complex에 해당하는 *Acinetobacter* 균종들보다는 임상적으로 분리되는 빈도는 낮지만 균혈증, 패혈증 환자의 혈액에서 분리되었던 병원감염성 세균 종이다(17, 18, 19, 20, 21). 현재까지 *A. ursingii*, *A. lwoffii* 및 *A. bereziniae* 들에 대한 종-특이 PCR 프라이머가 개발되어 있지 않기 때문에, 본 연구에서 개발된 3가지 균종에 대한 PCR 프라이머는 세계 최초로 개발된 것이라 할 수 있다. 그러므로, 이들 3가지 종-특이 PCR 프라이머들은 임상에서 이들 3가지 균종을 신속 정확하게 검출하는 데 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

자동미생물동정기의 한계성 때문에 많은 연구자들이 다양한 분자생물학적 기법을 통하여 *Acinetobacter* genospecies를 분류하고자 하였다(22). Dolzani 등(23)은 restriction fragment length polymorphism(RFLP)법을 이용하였는데 PCR 증폭산물을 여러 가지 제한효소로 처리하고 4시간 반응한 후 표준균주와 비교해야 하는 이러한 방법은 시간, 노동력 및 경제적



측면에서 PCR법에 비해 비효과적인 단점이 있다. Vaneechoutte 등(24)은 amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA) 법을 이용하였는데 PCR 증폭산물을 여러 가지 제한효소로 처리하고 2시간 반응한 후 표준 균주와 비교해야 하는 복잡함과 너무나 다양한 pattern을 나타내는 불확실함이 있었기 때문에 이러한 방법은 시간, 노동력 및 경제적 측면에서 PCR 기법에 비해 비효과적인 단점이 있다고 본다. Koeleman 등(25)은 세균들의 역학조사에 이용되고 있는 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법을 이용하였는데 *Acinetobacter* 균종 감별에서는 증폭되는 분절이 매우 많고 조밀하여 확실한 구별이 어려우며, 무수한 subtype이 발견되었고, 임상분리주들은 너무나 다양한 pattern을 나타내며, 실험 시 표준균주들과 비교해야 하는 복잡함이 있기 때문에 이 방법으로 *Acinetobacter* 균종을 신속하게 동정하는 데는 한계가 있다고 본다(25, 26). 그러므로, 본 연구에서 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 개발된 7종 *Acinetobacter* 균종에 대한 종-특이적 PCR 프라이머들은 임상 샘플에서 적은 수의 세균이 존재하더라도 신속 정확하게 검출하는 데 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 향후 연구에서 다른 *Acinetobacter* 균종에 대한 종-특이적 PCR 프라이머를 개발하는 데에도 *rpoB*가 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 만일 *rpoB* 핵산염기서열의 상동성이 커서 종-특이적 핵산염기서열을 찾아내기 어렵다면, DNA repair나 DNA replication에 관여하는 유전자 등의 여러 다른 housekeeping 유전자들을 이용하여도 가능할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 개발된 7종의 *Acinetobacter* 종-특이적 PCR 프라이머 쌍들은 *Acinetobacter* 균주를 종-특이적으로 신속하고 정확하게 검출할 수 있어 병원 임상검사실에서 편리하고 유용하게 이용될 수 있다고 생각한다.

## V. 결 론

이제까지 임상에서 사용되어 온 생화학적 방법으로는 *Acinetobacter* 균종을 중 수준으로 완벽하게 검출 또는 동정하기 어렵다. 그러므로, 본 연구에서는 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 *Acinetobacter* 균종을 중 수준으로 신속 정확하게 검출 또는 동정할 수 있는 7종의 *Acinetobacter* 균종에 대한 종-특이적 PCR 방법을 개발하고자 하였다. primerselect 프로그램을 이용하여 *rpoB* 핵산염기서열로 *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. lwoffii*, *A. ursingii* 및 *A. bereziniae* 종-특이적 PCR primer를 설계 제작하였다. *Acinetobacter* 균종 참고균주 19주와 *Acinetobacter* 균종이 아닌 다른 균종 참고균주 15주를 이용하여 PCR 특이성을 검증하였다. 임상에서 Vitek 2 자동시스템으로 *Acinetobacter* 균주로 동정된 293주 임상균주를 대상으로 *gyrB* Multiplex 1 PCR과 16S rDNA sequencing, *rpoB* PCR sequencing의 분자생물학적 기법으로 *Acinetobacter* 균종을 동정하였다. 이번 연구에서 동정한 *Acinetobacter* 균주 293주와 이전 연구에서 동정한 *Acinetobacter* 균주 89주를 추가하여 *Acinetobacter* 종-특이적 PCR의 민감도를 평가하였다. *Acinetobacter* 종-특이적 PCR 검사결과를 보면 *A. baumannii* 종-특이적 PCR의 정확도는 98.9%였고 *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. lwoffii*, *A. ursingii* 및 *A. bereziniae* 종-특이적 PCR의 정확도는 모두 100%였다. *A. baumannii*와 *A. nosocomialis* 종-특이적 PCR 프라이머는 *gyrB* Multiplex 1 PCR 프라이머보다 10배 더 적은 양의 지놈 DNA까지 검출할 수 있었고, *A. calcoaceticus*와 *A. pittii* 종-특이적 PCR 프라이머는 *gyrB* Multiplex 2 PCR 프라이머보다 10배 더 적은 양의 지놈 DNA까지 검출할 수 있었다. 이런 결과로 보면, *A. calcoaceticus*-, *A. baumannii*-, *A. pittii*-, *A.*

*nosocomialis*-, *A. lwoffii*- *A. ursingii*- 및 *A. bereziniae*-종-특이적 PCR 기법은 임상에서 *Acinetobacter* 균종을 신속 정확하게 구별하는데 아주 유용할 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Lee KW, Yong DE, Jeong SH, Chong YS. Multidrug-Resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly Problematic Nosocomial Pathogens. J Yonsei Med. 2011;52:879-891.
- 2) Nemeč A, L Krizová, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011;162:393-404.
- 3) Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Leepi, Hsueh PR. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J Antimicrob Chemother. 2011;66:1839-1846
- 4) Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo J. J. Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? Infection, Genetics and Evolution. 2012;12:345-349.
- 5) Higgings PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. gyrB Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. J Clin. Microbiol. 2010;48:4592-4594.

- 6) Gundi Vijay A. K. B, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, Bernard La Scola. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*. 2009;155:2333–2341.
- 7) Higgins P. G, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1199–1201.
- 8) Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley, 1991.
- 9) Bernard La Scola, Vijay A. K. B. Gundi, Atieh Khamis, Didier Raoult. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *J Clinical Microbiology*. 2006;5:827–832.
- 10) Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F: Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4382–4390.
- 11) Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys *et al*. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:11–15.

- 12) Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, *et al.* Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotype and phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996;34:1519–1525.
- 13) Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S–23S rRNA gene spacer region. J Clin Microbiol. 2005;43:1632–1639.
- 14) Bernads AT, Dijkshoorn L, van der Toorn J, Bochner BR, van Boven CP. characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA–DNA hybridization groups by means of the Biolog system. J Med Microbiol. 1995;42:113–119.
- 15) Lim YM, Choi TS, Kim JM. Determination of Genomespecies and Characterization of Antimicrobial Resistance of Multi-drug Resistant *Acinetobacter* spp. Isolates. J Bacteriology Virology. 2006;36:21–30.
- 16) Shin MG, Kim SH, Lee JC, Duck Cho, Kee SJ, Shin JH, *et al.* A comparison of ID32 GN system with amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter baumannii*. Kor J Lab Med. 2004;24:107–112.
- 17) Loubinoux J, Mihaila–Amrouche L, Le Fleche A, Pigne E, Huchon G, Grimont PA, Bouvet A. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. J Clin Microbiol. 2003;41:1337–1338

- 18) Horii T, Tamai K, Mitsui M, Notake S, Yanagisawa H. Blood stream infections caused by *Acinetobacter ursngii* in an obstetrics ward. *Infect Genet Evol.* 2011;11:52–56.
- 19) Park YK, Jung SI, Park KH, Kim SH, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:81–85.
- 20) Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1891–1899.
- 21) Nemec A, Musil M, Sedo O, De Baere T, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Zdrahal Z, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L. *Acinetobacter bareziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:896–903.
- 22) Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *J Clin Microbiol.* 1996;9:148–165.
- 23) Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C: Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A.calcoaceticus*–*A.baumannii* complex by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1995;35:1108–1113.

- 24) Vaneechoutte M, Dijishoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol. 1995;33:11–15.
- 25) Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke–Grauls CM. Comparison of amplified rimosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 1998;36:2522–2529.
- 26) Graser Y, Klare I, Helle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD, *et al.* Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol. 1993;31:2417–2420.



**Table 1. PCR primers used in this study**

Target gene or species	Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')	Product size (bp)	References
16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1400	(8)
	1492R	TACGGYTACCTGTACGACTT		
<i>rpoB</i>	696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	350	(9)
	1093R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA		
<i>A. nososomal</i>	sp2-F <sup>1)</sup>	GTTCTGATCCGAAATTCCTCG	294	(7)
	sp4-R <sup>1)</sup>	AACGGAGCTTGTCCAGGGTTA		
<i>A. baumannii</i>	sp4-F <sup>1)</sup>	CACGCCGTAAGAGTGCATTA	490	(7)
	sp4-R <sup>1)</sup>	AACGGAGCTTGTCCAGGGTTA		
<i>A. calcoaceticus</i>	D14 <sup>2)</sup>	GACAACAGTTATAAGGTTTCAGGTG	428	(5)
	D19 <sup>2)</sup>	CCGCTATCTGTATCCGCGATA		
<i>A. pittii</i>	D16 <sup>2)</sup>	GATAACAGCTATAAAGTTTCAGGTGGT	194	(5)
	D8 <sup>2)</sup>	CAAAAACGTACAGTTGTACCACTGC		
<i>A. calcoaceticus</i>	Acal-F	TCGTATCTCAATTACACCGTTCACCT	549	this study
	Acal-R	CGCCTTCTGCCAGTTTCACCATA		
<i>A. baumannii</i>	Abau-F	CATAAACTGAGATAACTGGCTTGAACC	529	this study
	Abau-R	CGTCGACTTCACCTTTACCGTTAC		
<i>A. pittii</i>	Apit-F	TGGGCAGTTACCAGATTGACCTA	147	this study
	Apit-R	AACCAGCAGCTTCCATTTGACG		
<i>A. nososomal</i>	Anos-F	GCCGCTCGTGAACGTGTAATC	394	this study
	Anos-R	CATCGTGTGGCATATCTTCAAC		
<i>A. lwoffii</i>	Alwo-F	CCGTGTCCGGTCTGGTTCGTGTA	302	this study
	Alwo-R	CCGGCGTTTCAATTGGACATAC		
<i>A. ursingii</i>	Aurs-F	AGCGTGTATCATCTCTCAG	319	this study
	Aurs-R	CCGCGTAAACGTTCCAGGCACAAGA		
<i>A. bereziniae</i>	Aber-F	ACGGTTCTCCGGGCGTCT	539	this study
	Aber-R	AACACCACCTTCAGCGATTTTA		

<sup>1)</sup>Multiplex PCR primers designed based on *gyrB* for simultaneous detection of *A. nososomal* and *A. baumannii* which was named *gryB* mutiplex I PCR in this study.

<sup>2)</sup>Multiplex PCR primers designed based on *gyrB* for simultaneous detection of *A. calcoaceticus* and *A. pittii* which was named *gryB* mutiplex II PCR in this study.

Table 2. PCR conditions of each PCR assay in this study

PCR name	PCR conditions
16s	Denaturation for 5 min at 94°C; 35cycles of 94°C for 1min, 2°C for 1min, 72°C for 1min; and final extension of 72°C for 7min.
<i>rpoB</i>	Denaturation for 5 min at 94°C; 35cycles of 94°C for 30s, 56°C for 30s, 72°C for 60s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>gyrB</i> Multiplex1	Denaturation for 5 min at 94°C; 30cycles of 94°C for 1min, 60°C for 1min, 72°C for 1min; and final extension of 72°C for 7min.
<i>gyrB</i> Multiplex2	Denaturation for 5 min at 94°C; 30cycles of 94°C for 1min, 60°C for 60s, 72°C for 60s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. baumannii</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 66°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. calcoaceticus</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 68°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. pittii</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 68°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. nosocomialis</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 66°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. ursingii</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 68°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. lwoffii</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 66°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.
<i>A. bereziniae</i> -specific	Denaturation for 5 min at 95°C; 30cycles of 95°C for 20s, 64°C for 30s, 72°C for 30s; and final extension of 72°C for 7min.

Table 3. Results of molecular identification of 83 clinical strains of *Acinetobacter* species in this study

Group	N	N	16S rDNA sequence	<i>rpoB</i> sequence	<i>gyrB</i> Multiplex 1	Final identification
A	62	56	<i>A. nosocomialis</i> / <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>
		4	<i>A. nosocomialis</i> / <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. nosocomialis</i> / <i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>
		2	<i>A. nosocomialis</i> / <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. nosocomialis</i>
B	3	2	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	Neg	<i>A. lwoffii</i>
		1	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i> / <i>genomic species 9</i>	Neg	<i>A. lwoffii</i>
C	4	4	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i>	Neg	<i>A. junii</i>
D	4	4	<i>A. pittii</i> / <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. pittii</i>	Neg	<i>A. pittii</i>
E	1	1	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	Neg	<i>A. calcoaceticus</i>
F	2	2	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	Neg	<i>A. johnsonii</i>
G	3	3	<i>A. bereziniae</i> / <i>A. guillouiae</i>	<i>A. bereziniae</i>	Neg	<i>A. bereziniae</i>
H	3	2	<i>A. guillouiae</i>	<i>A. guillouiae</i>	Neg	<i>A. guillouiae</i>
I	1	1	<i>A. radioresistens</i>	<i>A. radioresistens</i>	Neg	<i>A. radioresistens</i>

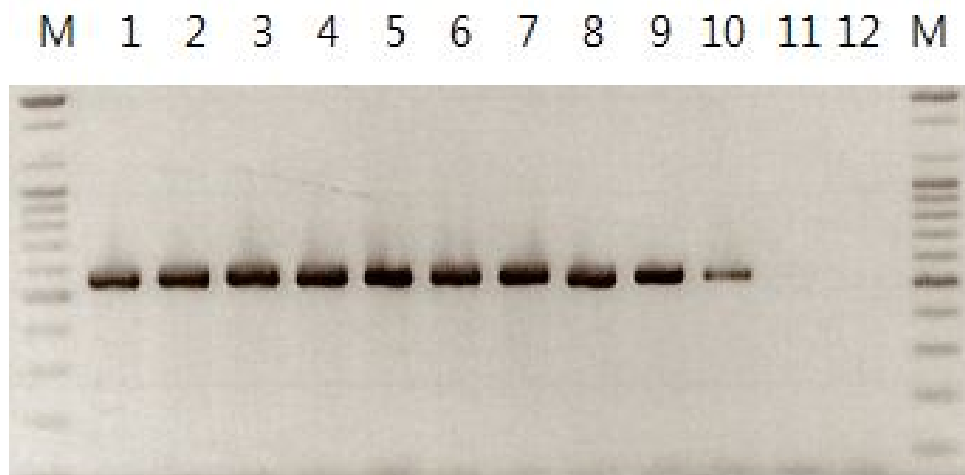
Neg: PCR negative

Table 4. Distribution of 382 strains of *Acinetobacter* used for evaluation of *Acinetobacter* species-specific PCR

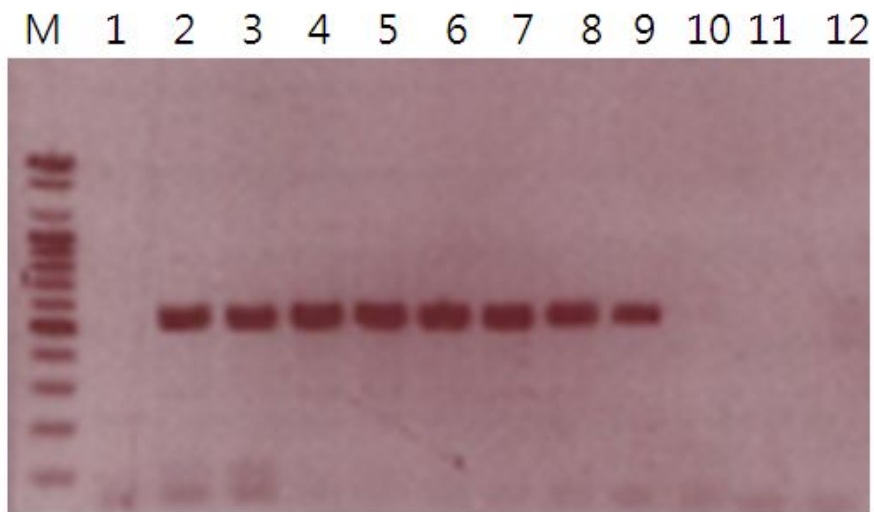
<b>Species</b>	<b>Previous study</b>	<b>Present study</b>	<b>N</b>
<i>A. baumannii</i>	54	210	264
<i>A. nosocomialis</i>	2	62	64
<i>A. pittii</i>	5	4	9
<i>A. calcoaceticus</i>	6	1	7
<i>A. junii</i>	3	4	7
<i>A. johnsonii</i>	0	2	2
<i>A. lwoffii</i>	0	3	3
<i>A. bereziniae</i>	14	3	17
<i>A. gyllenbergi</i>	4	0	4
<i>A. guillouiae</i>	0	3	3
<i>A. ursingii</i>	1	0	1
<i>A. radioresistens</i>	0	1	1
Total	89	293	382

Table 5. Result of evaluation study for *Acinetobacter* species-specific PCR

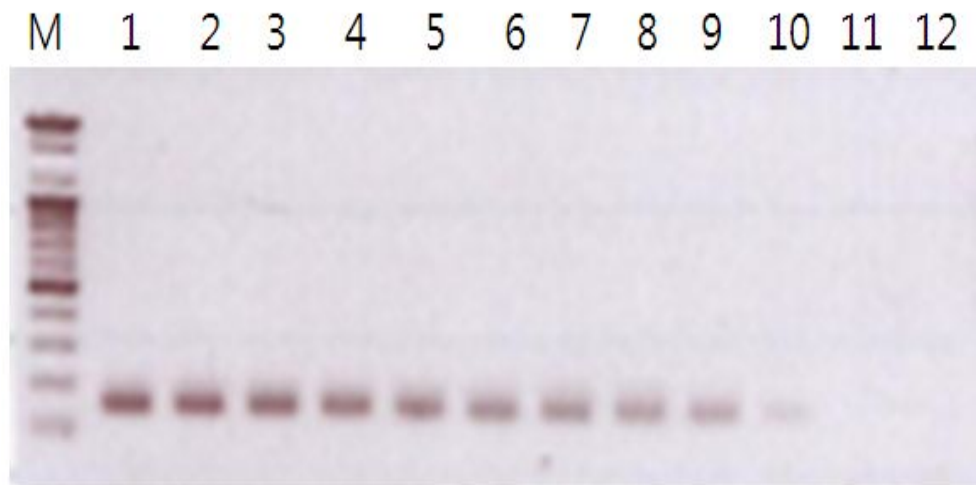
Specific-PCR	Total (N)	PCR positive			PCR negative		
		Expected (N)	Actual (N)	Sensitivity (%)	Expected (N)	Actual (N)	Specificity (%)
<i>A. baumannii</i>	416	265	262	98.9	154	154	100
<i>A. calcoaceticus</i>	416	8	8	100	408	408	100
<i>A. nosocomialis</i>	416	64	64	100	352	352	100
<i>A. pittii</i>	416	10	10	100	406	406	100
<i>A. lwoffii</i>	75	4	4	100	71	71	100
<i>A. ursingii</i>	75	2	2	100	73	73	100
<i>A. bereziniae</i>	75	17	17	100	58	58	100



**Fig. 1.** Result of the gradient PCR for *A. calcoaceticus*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.

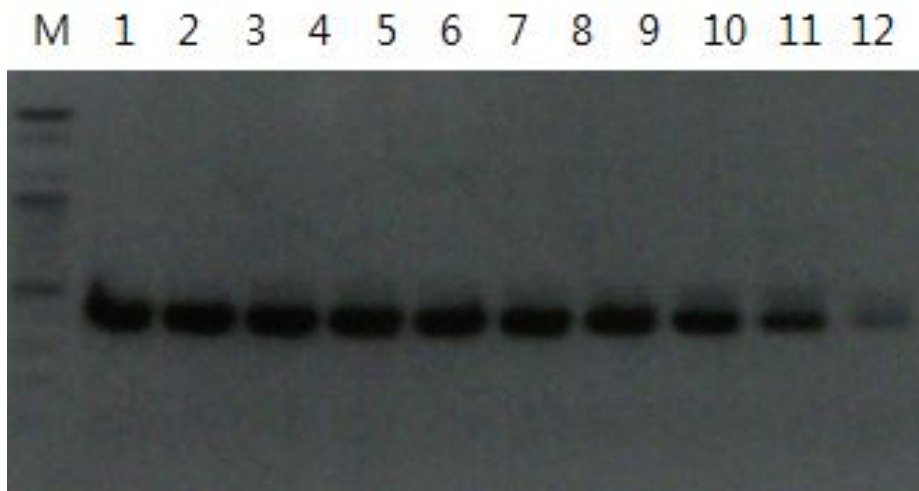


**Fig. 2.** Result of the gradient PCR for *A. baumannii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.

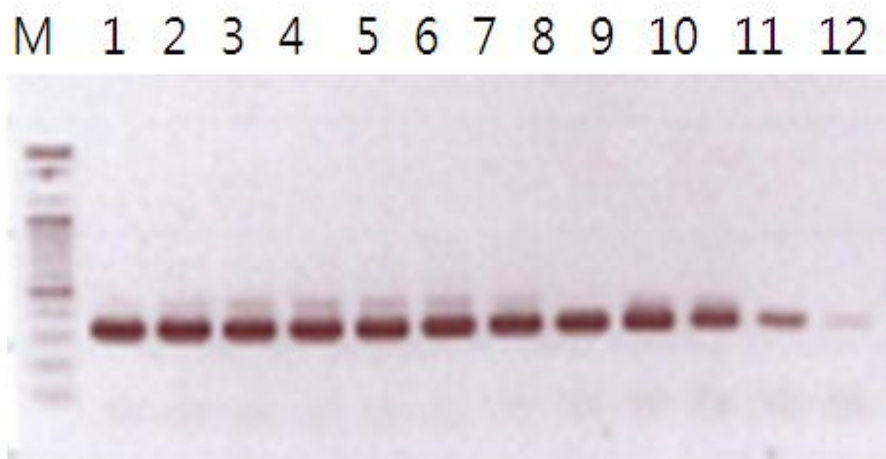


**Fig. 3.** Result of the gradient PCR for *A. pittii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.

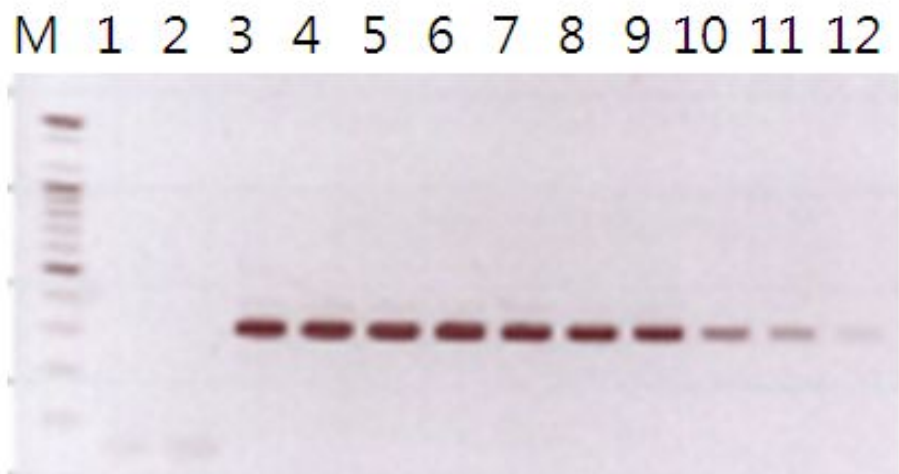




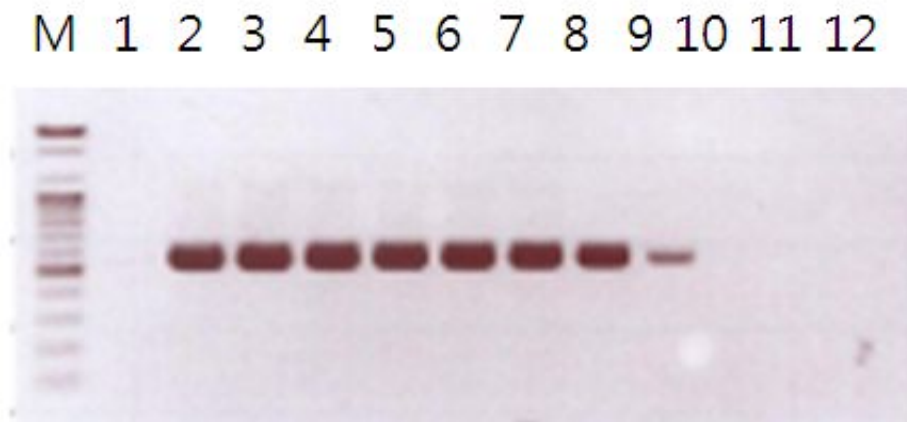
**Fig. 4.** Result of the gradient PCR for *A. nosocomialis*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.



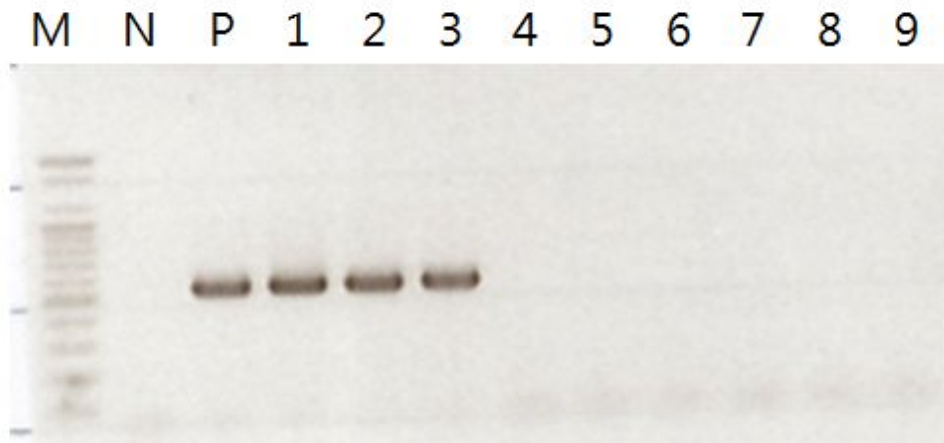
**Fig. 5.** Result of the gradient PCR for *A. ursingii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.



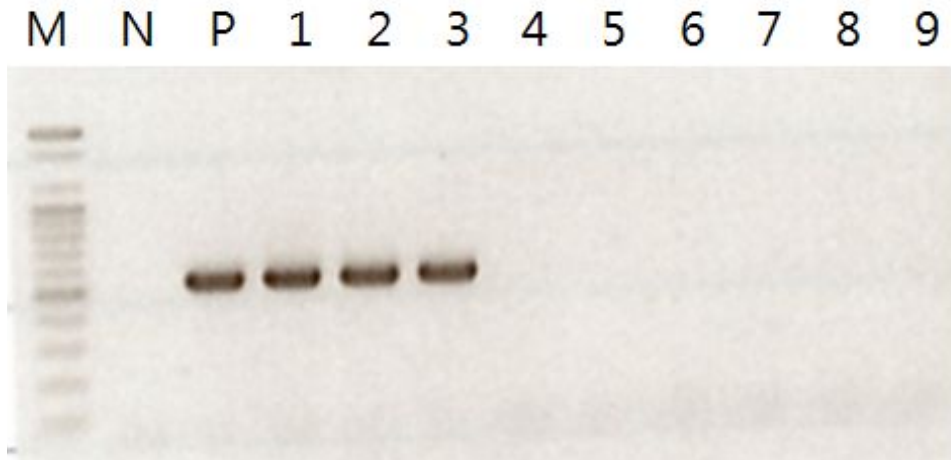
**Fig. 6.** Result of the gradient PCR for *A. lwoffii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.



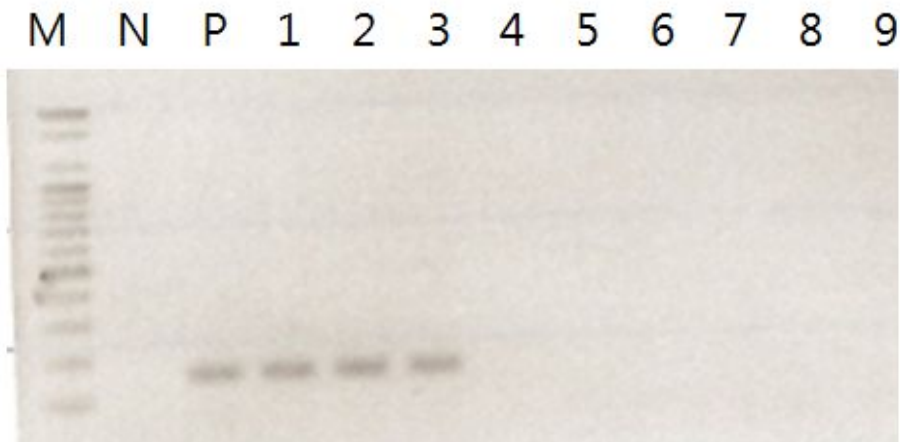
**Fig. 7.** Result of the gradient PCR for *A. bereziniae*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; The annealing temperatures of each PCR are as follows: Lane 1, 52°C; Lane 2, 54°C; Lane 3, 56°C; Lane 4, 58°C; Lane 5, 60°C; Lane 6, 62°C; Lane 7, 64°C; Lane 8, 66°C; Lane 9, 68°C; Lane 10, 70°C; Lane 11, 71°C; Lane 12, 72°C.



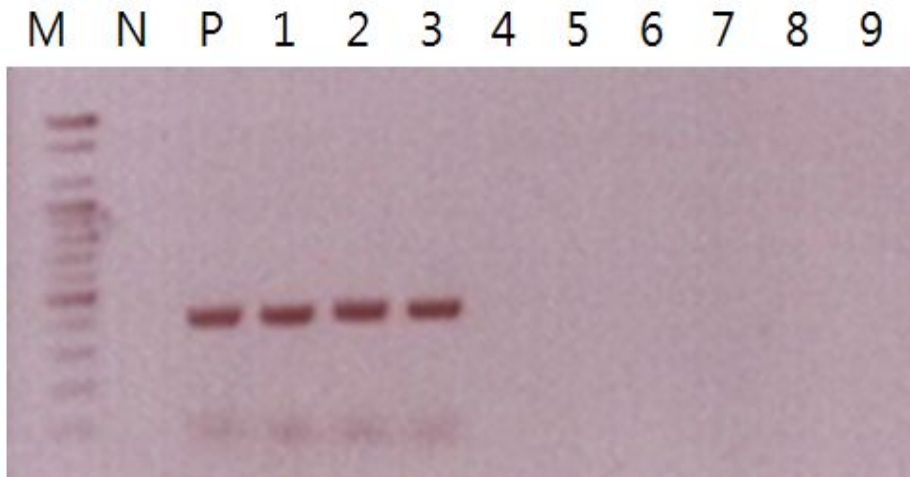
**Fig. 8.** Result of *A. calcoaceticus*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 1–3, *A. calcoaceticus* clinical strains; Lane 4, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 5, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 6, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 7, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 8, *A. lwoffii* KCCM 40172; Lane 9, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>.



**Fig. 9.** Result of *A. baumannii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 1-3, *A. baumannii* clinical strains; Lane 4, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 5, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 6, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 7, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 8, *A. lwoffii* KCCM 40172; Lane 9, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>.

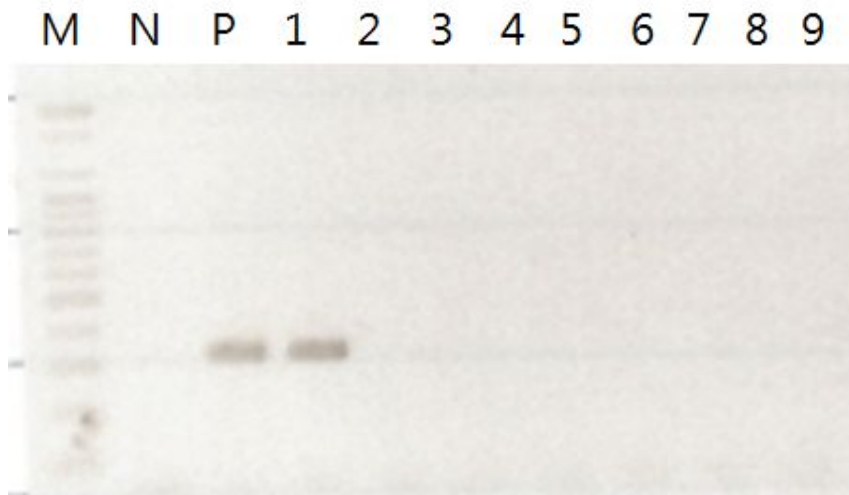


**Fig. 10.** Result of *A. pittii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 1–3, *A. pittii* clinical strains; Lane 4, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 5, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 6, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 7, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 8, *A. Iwoffii* KCCM 40172; Lane 9, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>.

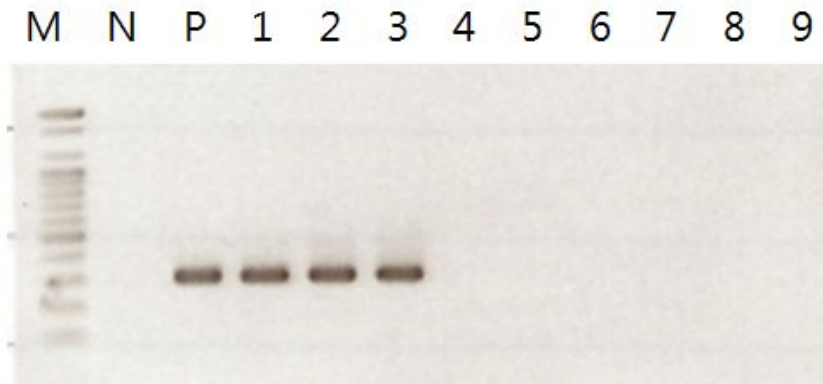


**Fig. 11.** Result of *A. nosocomialis*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 1-3, *A. nosocomialis* clinical strains; Lane 4, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 5, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 6, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 7, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 8, *A. Iwoffii* KCCM 40172; Lane 9, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>.

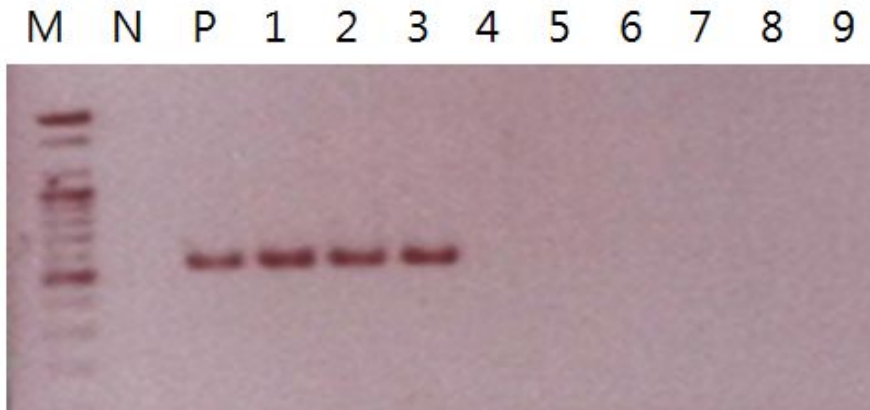




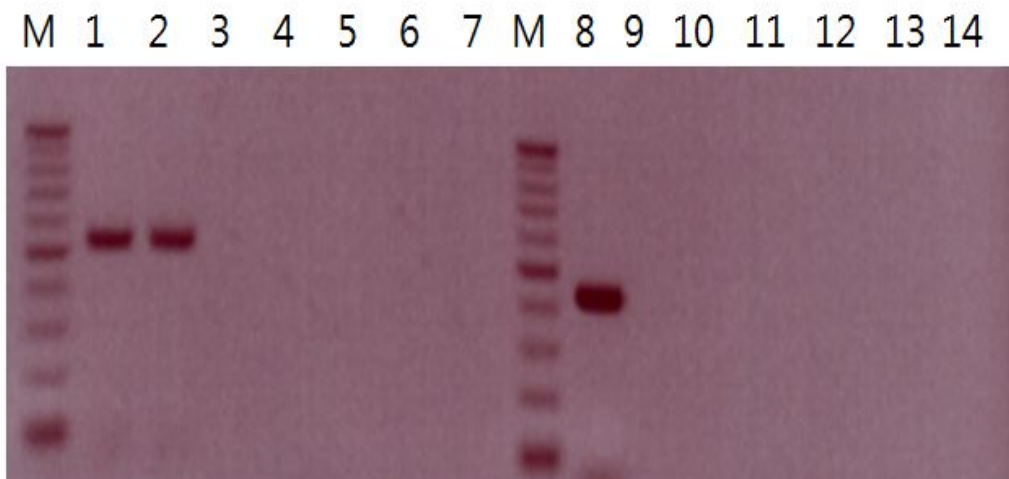
**Fig. 12.** Result of *A. ursingii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 1, *A. ursingii* clinical strains; Lane 2, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 3, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 4, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 5, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 6, *A. Iwoffii* KCCM 40172; Lane 7, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>; Lane 8, *A. junii* KCTC 12406<sup>T</sup>; Lane 9, *A. guillouiae* KCTC 12684,



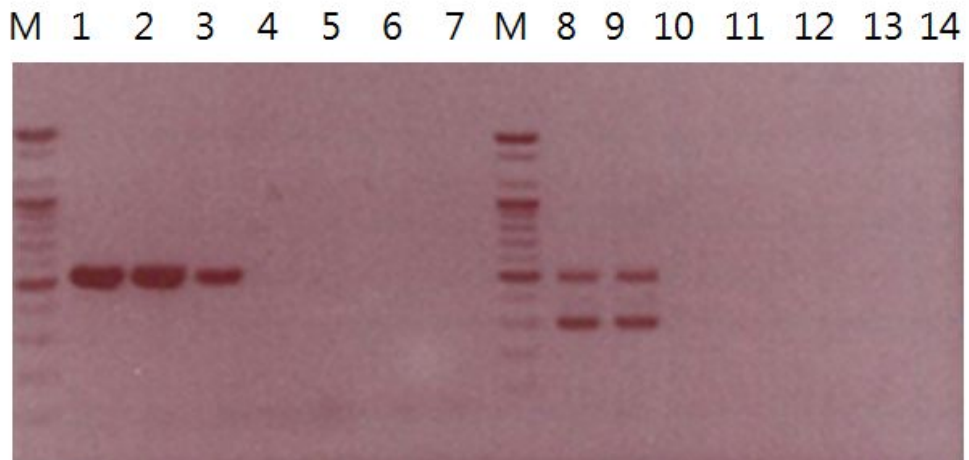
**Fig. 13.** Result of *A. Iwoffii*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. Iwoffii* KCCM 40172; Lane 1-3, *A. Iwoffii* clinical strains; Lane 4, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 5, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 6, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 7, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 8, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 9, *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>.



**Fig. 14.** Result of *A. bereziniae*-specific PCR. Lane M, molecular weight 100 bp marker; Lane N, negative control with no DNA template; Lane P, positive control with *A. bereziniae* KCTC 12683<sup>T</sup>; Lane 1-3, *A. bereziniae* clinical strains; Lane 4, *A. calcoaceticus* KCTC 2357<sup>T</sup>; Lane 5, *A. baumannii* KCTC 2508<sup>T</sup>; Lane 6, *A. pittii* CCUG 61664<sup>T</sup>; Lane 7, *A. nosocomialis* CCUG 61663<sup>T</sup>; Lane 8, *A. ursingii* KCTC 12410<sup>T</sup>; Lane 9, *A. lwoffii* KCCM 40172.

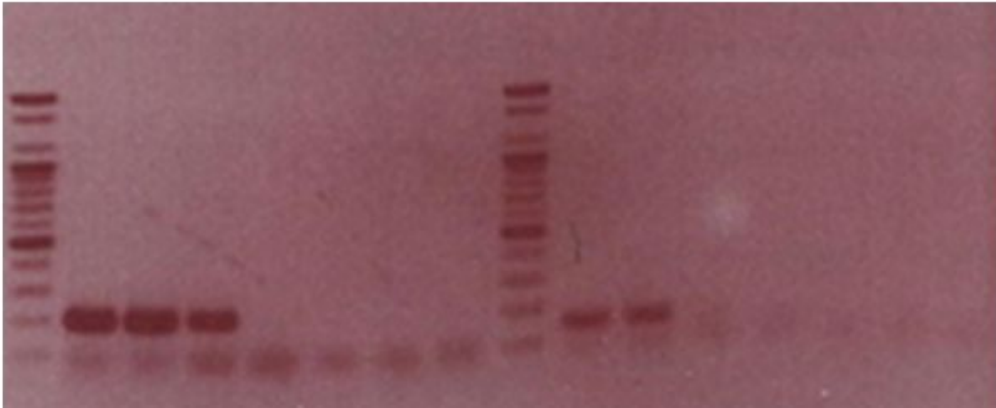


**Fig. 15.** Result of the detection limit of *A. calcoaceticus*-specific PCR (Lane 1 through 7) and *gyrB* Multiplex 2 PCR (Lane 8 through 14). Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. calcoaceticus*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, and lanes 8 through 14 respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. calcoaceticus*-specific PCR and *gyrB* Multiplex 2 PCR were 200 pg and 2ng, respectively.

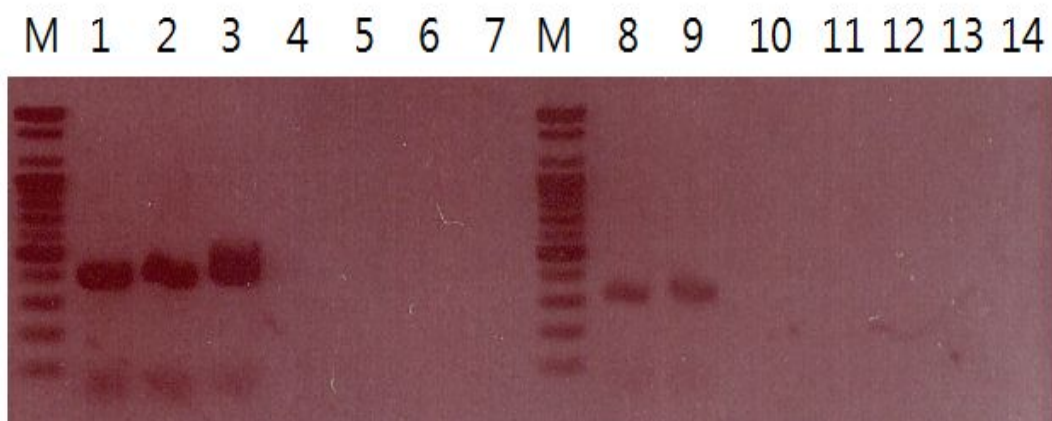


**Fig. 16.** Result of the detection limit of *A. baumannii*-specific PCR (Lane 1 through 7) and *gyrB* 1 PCR (Lane 8 through 14). Lane M, molecular weight marker (100 bp Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. baumannii*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, and lanes 8 through 14 respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. baumannii*-PCR and *gyrB* Multiplex 1 PCR were 20 pg and 200 pg, respectively.

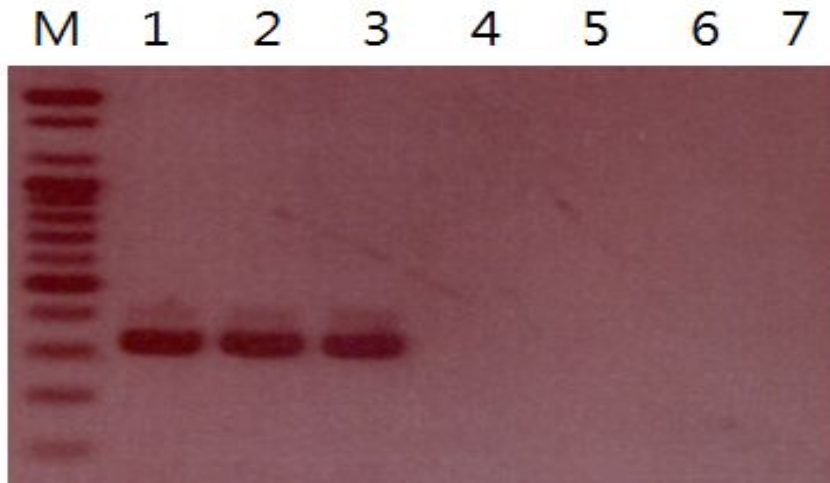
M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14



**Fig. 17.** Result of the detection limit of *A. pittii*-specific PCR (Lane 1 through 7) and *gyrB* Multiplex 2 PCR (Lane 8 through 14). Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. pittii*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, and lanes 8 through 14 respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. pittii*-specific PCR and *gyrB* Multiplex 2 PCR were 20 pg and 200 pg, respectively.

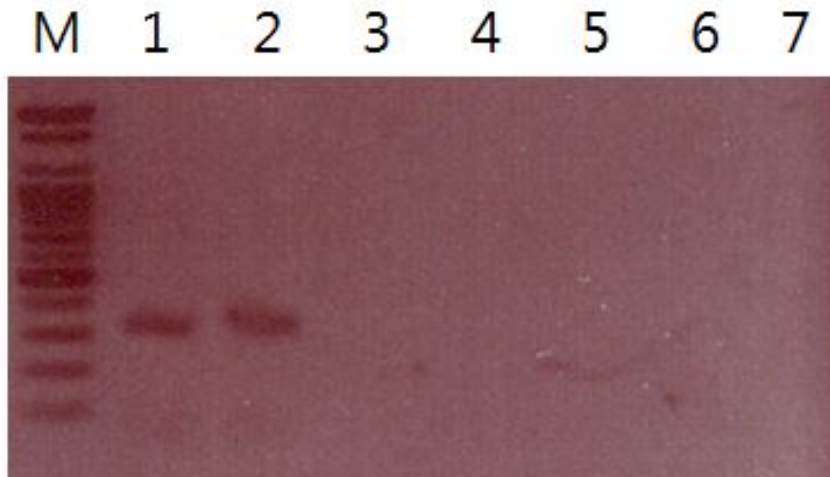


**Fig. 18.** Result of the detection limit of *A. nosicimialis*-specific PCR (Lane 1 through 7) and *gyrB* Multiplex 1 PCR (Lane 8 through 14). Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. pitii*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, and lanes 8 through 14 respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. pitii*-specific PCR and *gyrB* Multiplex 1 PCR were 20 pg and 200 pg, respectively.

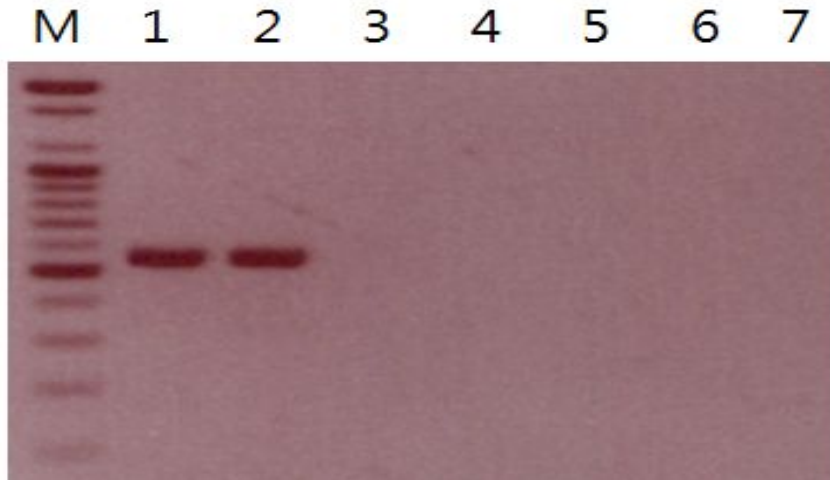


**Fig. 19.** Result of the detection limit of *A. ursingii*-specific PCR. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. ursingii*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. ursingii*-specific PCR were 20 pg, respectively.





**Fig. 20.** Result of the detection limit of *A. Iwoffii*-specific PCR. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. Iwoffii*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. Iwoffii*-specific PCR were 200 pg, respectively.



**Fig. 21.** Result of the detection limit of *A. bereziniae*-specific PCR. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); Serial 10-fold dilutions of genomic DNA of *A. bereziniae*, ranging from 2 ng to 2 fg (lanes 1 through 7, respectively), were amplified by each PCR. The lower detection limits of *A. bereziniae*-specific PCR were 200 pg, respectively.