



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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  
석사학위논문

다제내성 *Acinetobacter*와  
유출펌프 유전자

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

심재광

다제내성 *Acinetobacter*와  
유출펌프 유전자

Multidrug-resistant  
*Acinetobacter* and efflux pump genes

2012年 8월 24일

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

심 재 광

Multidrug-resistant  
*Acinetobacter* and efflux pump  
genes

지도교수 장 속 진

이 논문을 이학석사학위 신청논문으로 제출함

2012년 4월

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

심 재 광

# 심재광의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수    문대수    인

위    원    조선대학교    교수    박    건    인

위    원    조선대학교    교수    장속진    인

2012년 5월

조선대학교 대학원

# 목 차

## ABSTRACT

I. 서론 .....	1
II. 연구방법 .....	3
1. 연구대상 .....	3
2. 연구방법 .....	3
1) 유출펌프 검출 .....	3
2) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 .....	4
3) 유출유전자 중합효소연쇄반응 .....	5
III. 결과 .....	6
1. 유출펌프 검출 결과 .....	6
2. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 결과 .....	6
3. 유출유전자 중합효소연쇄반응 결과 .....	7
IV 고찰 .....	8
V. 참고문헌 .....	15
VI. 감사의 말씀 .....	19

## 표 목 차

표 1. Table 1. Primers sequence used in this study .....	10
표 2. Results of synergy test between meropenem and CCCP .....	11
표 3. Frequencies of <i>adeB</i> overexpression among meropenem – Susceptible –Intermediate, and –Reference group of <i>A.baumannii</i> .....	12
표 4. Distribution of efflux pump genes assayed by Conventional PCR .....	13

## 그림 목차

그림.1 The distribution rate of the <i>adeB</i> , <i>adeJ</i> and <i>adeE</i> gene by conventional PCR .....	14
---	----



# I. ABSTRACT

## Multidrug-resistant *Acinetobacter* and efflux pump genes

Shim, Jae-Kwang

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

Dep. of Bio New drug Development

Graduate school of Chosun University

Background : Increased expression of chromosomal genes for efflux systems plays a major role in MDR. Among the five superfamilies of efflux pumps, resistance-nodulation-division (RND) systems are the most prevalent in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Overexpression of AdeABC constitutes a major mechanism of multi-resistance in *A. baumannii*. The assessment for the role of AdeABC in carbapenem resistance differ from studies to studies.

Studies for the role of efflux pump for carbapenem resistance for *A. baumannii* isolated from Korea are hard to find out. The prevalence of common efflux pumps in CRAB were not known well.

The aim of this study is 1) to investigate the role of the AdeABC multidrug efflux pump in the decreased susceptibility of clinical isolates of *A. baumannii* to meropenem, 2) to assess the frequency of common efflux pump genes in carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates

Methods: We determined MIC value by agar dilution test in the absence and presence of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), efflux pump inhibitor (EPI), in 119 clinical isolates of *A.*

*baumannii* and 17 reference strains of *Acinetobacter* species.

We performed RT-PCR to test the expression of the gene of *adeB* which encode the efflux pumps *adeB*. The isolates were also tested by PCR for *adeB*, *adeJ* and *adeE* genes.

Results: Real-time PCR identified 6-fold increases in *adeB* expression in the group of meropenem-resistant isolates compared to that in the group of meropenem-susceptible isolate.

The expression of *adeB* did not correlate with carbapenem resistance, and 20 isolates with absent or negligible expression of this system were still able to achieve high-level resistance. The addition of CCCP led to a fourfold reduction in the MIC of meropenem for 20 isolate, twofold reduction in the MIC of meropenem for 30 isolate and no reduction in the MIC of meropenem for 69 isolate.

The overexpression of *adeB* was found in 76 (88%) of 86 strains of meropenem resistant group and 15 (58%) of 26 strains of meropenem susceptible group.

The frequencies of the *adeB*, *adeJ* and *adeE* gene were 91%, 92%, and 10%, respectively.

Conclusion: The synergy between meropenem and CCCP was found in 20(17%) of 119 *A. baumannii*. No definite correlation was observed between the synergy of meropenem with CCCP and *adeB*

overexpression in most strains tested. The *adeB* overexpression may be induced by other compounds other than meropenem in most isolates in this study. It seems that the increased expression of AdeABC was not an important contributor to meropenem resistance in most strains of crab tested in this study.

# 1. 서 론

최근에 염색체성 유출계 유전자 (1)의 발현증가는 다제내성에 주요한 역할을 하고 있는 것으로 나타났다 (2). 유출을 매개로한 내성은 다양한 박테리아 종에서 찾을 수 있다 (3,4). 특히 유출펌프가 과도하게 발현되면 항균제 축적이 감소한다. 이에 따라 유출 펌프의 과도발현을 억제 내성에 있어 효율적인 기전으로 볼 수 있다 (3). 억제 내성에 연관이 있는 유출 시스템은 ABC (ATP-binding cassette) transporter (5), SMR (small multidrug resistance) (6), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) (7), MFS (major facilitator superfamily) (8), RND (resistance-nodulation-cell division) (9) family 5가지로 구성되어 있다.

염색체성 유출계 발현 증가에 의한 다제내성은 그람음성균에서 일반적으로 나타나는데, 가장 보편적으로 연관되어 있는 것은 여러 유출펌프 중에서도 resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily이다 (10). 이러한 펌프는 유출 수송막 (efflux membrane transporter)으로 구성되어 있고, MFP (major fusion protein)와 OMF (outer membrane factor)가 상호작용하여 세포외막과 내막사이에서 억제제 (drug)를 외부로 유출시킨다. RND system은 세포의 항상성·병독성 결정인자의 추출과 독성 물질의 유출을 포함하는 다양한 기능을 가지고 있다 (11).

RND family 구성 중, AdeABC 유출펌프시스템은 다제내성 *A. baumannii* 균주에서 2001년에 발견되었다. 이 운반자 (transporter)는 *A. baumannii* 내의 주요한 유출 시스템으로 볼 수 있다. 이러한 계통으로부터 많은 펌프들이 그람음성균 사이에 광범위하게 퍼지고 중요한 병원균 내 항균제에 대한 다제내성과 연계된다 (12). *A. baumannii* 는 다제내성에 관련된 다양한 유출펌프를 지니고 있다 (13). 이 가운데 RND family의 AdeABC 펌프는 *A. baumannii* 의 carbapenem 내성에 관련이 높은 것으로 보고 되었다 (14). 또한 RND system인 AdeABC와 AclJK는 *A. baumannii*에서 특성화 되어 있다 (15,2). AdeABC operon은 *A. baumannii* 균주에서 거의 80%를 가지고 있으며 (2), 과발현 되었을 경우 aminoglycosides, cefepime, fluoroquinolones, chloramphenicol 그리고 tetracycline -tigecycline에서 감수성 감소를 일으킨다. 유출펌프는 일반적으로 연관이 없는 몇몇 억제제에 대해 내성을 유발시킬 수 있는 기질적 특징들을 보유 (16)하고 있는데 *A.baumannii*

에서는 그런 유출펌프로 *adeB*의 사례를 기술하고 있다 (2). carbapenem의 유출을 매개할 수 있는 AdeABC에 대한 증거는 오히려 *adeB* 유전자의 과도발현과 임상균주 내 내성 수준 사이에 나타난 상관관계를 바탕으로 제안되었다 (17,18).

Carbapenem은 세포막 투과성이 높고 그람음성균이 생성시키는  $\beta$ -lactamase에 매우 안정적이다. 그래서 carbapenem은 cephalosporin 내성 *A.baumannii*에 의한 감염증 치료제로 채택되고 있다. 그런데 최근 carbapenem에 내성을 지닌 *A.baumannii*가 전세계적으로 광범위하게 확산되면서 우리에게 매우 심각한 위협이 되고 있다. 무엇보다 *A.baumannii*는 carbapenem에 대한 내성을 지니고 있을 뿐만 아니라 다른 계열의 항균제에 대한 내성, 즉 다제내성적 속성이 문제가 되고 있다. 아울러 Carbapenem 내성 *A. baumannii*에 의한 감염증은 감수성 균주에 의한 감염증에 비하여 사망률과 병원 입원기간을 현저하게 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (19). 이로 인해, 감염증의 치료제로 선택할 수 있는 항균제의 범위가 상당히 제한받고 있는 실정이다. 최근 수십년 사이 다제내성을 가진 *A.baumannii*가 점진적으로 확산되기 시작하면서, 폐렴, 패혈증, 요로감염, 그리고 창상감염 등의 원내 감염도 함께 증가하고 있다. 특히 이 균은 기회 감염균으로 분류되면서 전세계적인 우려를 낳고 있다 (20).

Carbapenem 내성기전에 대해서는 그동안 국내에서도 많은 연구가 이루어져 왔으나, 국내의 유출펌프유전자들의 보유율에 대한 연구는 매우 드물다. 따라서 본 연구는 *A. baumannii* 균의 meropenem 내성에 대한 유출펌프의 역할과 국내의 *A. baumannii* 균이 보유한 유출펌프 유전자 보유율을 조사하여 평가하고자 한다.

## II. 연구 방법

### 1. 연구 대상

2008년 1월부터 2011년 6월까지 조선대학교병원 환자 검체로부터 Vitek 2 system에 의하여 *Acinetobacter baumannii*로 동정된 임상분리균주 119주와 *Acinetobacter* 각 균종별 표준균주 17주, 도합 136주를 본 연구의 실험대상으로 선정하였다. 대조 균주로는 *A.baumannii* 표준균주 (KCTC 2508)를 사용하였다. 실험에 사용된 임상분리균주 119주는 meropenem에 내성인 균주 86주, 감수성인 균주 26주, 중간내성인 균주 7주로 구성되었다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 유출펌프 검출

Meropenem (Carbapenem 계열 항생제) 내성에 대한 *adeB*의 역할을 조사하기 위해 유출펌프 저해제인 carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 각각 meropenem에 대한 minimum inhibition concentration (MIC)을 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)에서 제시한 한천희석법으로 검사하였다 (23). 실험에 이용된 균의 농도는 0.5 Mcfarland Standard 탁도의 균액을 1:10으로 희석한 후 meropenem을 단계희석한 Muller Hinton agar에  $1\mu\text{L}$ 씩 접종 하여 최종 농도가  $5 \times 10^4$  cfu/mL이 되도록 하였다. 실험한 균주 중 CCCP를 첨가하였을 때 MIC가 4배 이상 감소되면 유출펌프가 양성인 것으로 판단하였다.

## 2) 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응 (Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

*adeB* 유전자 발현은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 측정하였다. Bacterial cell은 mid-log phase까지 LB broth에서 호기성으로 배양하였다. RNA는 EasyRed( iNtRON Biotechnology, Korea)와 phenol-chloroform-isopropanol을 이용하여 추출하였고, 추출된 RNA는 DNase I (TAKARA ,Otsu, Japan) 처리를 하여 genomic DNA에 의한 오염을 방지하였다. RNA의 농도는 spectrophotometer로 10ng/uL가 되도록 정량을 하였다. *adeB* 유전자의 primer는 table 1과 같이 사용하였고, 16S RNA는 *adeB* transcripts 의 level을 표준화하기 위하여 housekeeping 유전자로 사용되었다. cDNA의 합성은 SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit (invitrogen™ Grand Island, NY ) 를 사용하여 5X VLIO™ Reaction Mix 4  $\mu\text{l}$ , 10X SuperScript® Enzyme Mix 2  $\mu\text{l}$ , RNA 6  $\mu\text{l}$ , DEPC 처리된 증류수 8  $\mu\text{l}$ 를 넣어서 반응액 총량 20  $\mu\text{l}$ 가 되게 준비하였다. cDNA 합성을 위한 온도 조건으로 25°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 85°C에서 5분동안 반응시켰다. RT-PCR 반응액은 2x phusion flash ( FINNZYMES, Finland) 10  $\mu\text{l}$ , Primer (10pmoles/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 20X Evagreen dye (Biotium, Hayward, USA) 1  $\mu\text{l}$ , 3차증류수 7  $\mu\text{l}$ 를 넣어서 총량 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 반응 온도 조건으로 95°C에서 5분 동안 초기 변성단계를 거쳐 95°C에서 15초간 변성, 60°C에서 1분간 결합하는 2단계를 40회 동안 반복하였고 CFX96™-Realtime PCR ( BioRad Laboratories, Hercules, CA )에 의해 실행되었다. critical threshold cycle ( Ct ) number는 CFX96™-Realtime PCR에 의해 결정되었다. *adeB* 유전자 발현  $\Delta\text{Ct}$  값은 16S RNA housekeeping 유전자에 대한 상대 정량으로 계산하였다. 그리고 감수성균주, 중간내성균주, 내성 균주의 *adeB* 유전자 발현  $\Delta\Delta\text{Ct}$ 값은 표준균주 (KCTC 2508 )에 대한 상대 정량으로 계산하였다. 추가적으로 내성균주군의 *adeB* 유전자 발현  $\Delta\Delta\text{Ct}$ 값은 감수성균주군에 대한 상대정량으로 계산하였다. 절대정량을 하기 위하여 *adeB* 유전자와 16S RNA를 cloning 한 균주에서 standard sample을 ( $10^6\sim 10^3$ ) 제조한 후 CFX-96 system (BioRad)에 의해 수행하였다.

### 3) 유출 유전자 PCR 검출

*adeB*, *adeE*와 *adeJ* 유출펌프 내성 유전자의 보유율을 조사하기 위해서 전통적인 PCR 방법을 수행하였다. BAP에 계대 배양하여 한 개의 집락을 백금으로 취한 후 LB broth (Difco™ LB broth, Miller (USA), BD) 에 집락을 풀고 shaking incubator에서 18-24시간 배양시켰다. 배양된 균액 200 $\mu$ l로 DNA를 추출 (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer, Daejeon, Korea) 하였다. 유출펌프 유전자의 종류를 검출하기 위하여 2x phusion flash (FINNZYMES, Finland ) 10 $\mu$ l, primer (Table 1) 1 $\mu$ l, DNA 1 $\mu$ l, 3차 증류수 8 $\mu$ l를 넣어 총량 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 반응 조건으로 98 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 초기변성단계를 거친 후 98 $^{\circ}$ C에서 30초, 57-59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 반응시키는 3단계 주기 35회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 연장시켰다. PCR 산물은 0.5ng/mL Ethidium Bromide (EtBr, Bioneer, Daejeon, Korea)에 ELITE 300 (WEALTEC, SolGent, Daejeon, Korea )로 100V (1X TAE buffer, 자가제조 )에 25분간 전기영동을 하였으며, Image analysis system (GEL LOGIC 100 Imaging system)으로 증폭된 DNA를 촬영하였다.



### III. 결과

#### 1. 유출펌프 검출 결과

*A.baumannii* 총 119주에서 MIC가 2배 감소한 균주는 30주(25%)였고, 4배 이상 감소한 균주는 20주(17%), 변화가 없는 균주는 66주(55%)가 나타났다. meropenem에 내성인 86균주 중 CCCP 함유배지에서 MIC가 4배 이상 감소한 균주는 17주(20%)이고, 2배 감소한 균주는 18주(21%)였다. 나머지 49주(57%)에서는 MIC의 변화를 관찰할 수 없었다. meropenem에 감수성인 26균주에서는 CCCP 함유배지에서 MIC가 4배 이상 감소한 균주가 2주(8%), 2배 변화한 균주가 9주(35%), 나머지 14균주(54%)에서는 MIC 변화가 없었다. 또한 중간내성 균주 7주 중 3주(43%)에서 MIC가 2배 감소하고, 1주(14%)에서는 4배 이상 감소함을 보였다(Table 2).

#### 2. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 결과

*A.baumannii* 표준균주 (KCTC 2508)를 대조균으로 하여 *adeB* expression을 비교한 결과, 감수성인 균주에서 *adeB* 발현이 과발현된 균주는 26균주 중 15균주(58%)로 나타났으며, 중간내성인 7균주에서는 4주(57%)에서 *adeB* 과발현이 관찰되었다. 내성인 균주에서는 86균주 중 78주(91%)에서 과발현을 관찰할 수 있었다. meropenem에 모두 감수성인 표준균주 17주에서는 *adeB* 과발현 수가 10주(58%)로 나타났다 (Table 3). 또한 meropenem에 내성인 균주군과 감수성인 균주군의 *adeB* 발현을 비교하였을 때는 내성인 균주군 (86주)에서 감수성인 균주군 (26주) 보다 *adeB* 발현이 6배이상 과도발현 됨을 알 수 있었다. 또한 *adeB* 발현을 절대정량하여 통계적인 분석을 한 결과 감수성 균주군과 중간내성 균주군 그리고 감수성균주군과 내성 균주간의 유의 확률 수치가 1(P=1) 로써 통계적 유의성을 보이지 않았다.

### 3. 유출 유전자 검출 결과

*adeB*, *adeJ*, *adeE*의 유전자의 분포율을 알아보기 위해 전통적인 PCR 로 수행한 결과 총 119균주 중 *adeB*, *adeJ*, *adeE*의 유전자 분포율은 각각 91%, 92%, 10%였다 (Table4). 표준균주 17주에서는 *adeB*, *adeJ*와 *adeE*의 보유율은 53%, 59%, 12%를 보였으며, meropenem에 감수성인 균주군과 내성인 균주군과의 유출 유전자 보유율을 비교하였을 때, 내성인 균주군의 *adeB*와 *adeJ* 보유율은 98%, 99%로 감수성 균주군의 73%, 65%보다 높았다. 하지만 *adeE* 유전자 보유율은 내성인 균주군 5% 보다 감수성인 균주군에서 31%로 높은 분포를 보였다.

## IV. 고 찰

본 연구의 목적 중 하나는 meropenem 항균제에 대해 내성을 지닌 임상 분리균주와 유출 유전자인 *adeB* 가 과도발현 된 상태에서 유출펌프와 어떠한 연관성이 있는지를 밝히는데 있었다.

먼저 유출펌프의 역할을 살펴보기 위해, 유출펌프 저해제인 CCCP (10 ug/mL)를 첨가하여 한천희석법으로 MIC의 변화를 관찰 하였다. 그 결과 유출펌프 양성 기준인 (21), 4배이상 MIC가 감소한 내성 균주는 17주(20%)를 차지하였고 18주(21%)는 MIC 가 2배 감소한 것으로 관찰 되었다.

또한 *adeB* 발현을 파악하기 위해 *A.baumannii* 표준균주 (KCTC2508)를 대조균주로 설정 한 후 내성균주, 중간내성균주, 감수성 균주 각각에 대해 *adeB* 발현율을 상대적인 정량법으로 분석하였다. 분석결과, 내성균주 86균주 중 76주(88%)에서 과도발현이 나타났으며, 중간내성인 균주 7주는 4주(57%)에서 과도발현을 보였고, 감수성 26균주 중 15주(58%) 에서도 과도발현이 관찰 되었다. 이번 실험결과에서 확인한 사실은 *adeB* 발현이 과도발현 되었다고 해서 대부분의 균주가 meropenem 항균제에 대한 내성을 보이지 않는다는 것이다. 연구자는 그 근거를 내성 균주의 대조균으로 비교하고자 했던 감수성 균주 58%에서도 *adeB* 발현이 과도발현을 보였다는 데서 찾고자 한다. 한편, *adeB* 발현율의 대조균을 표준균주가 아닌 감수성 균주군으로 설정한 후 내성균주군과의 상대정량을 수행한 결과 감수성균주군보다 내성균주군에서 6배 이상의 과도발현이 나타났다.

게다가 CCCP 유출펌프 저해제 첨가로 인한 meropenem MIC 감소와 *adeB* 유전자 과도발현간의 상관관계를 평가해 본 결과 유의미한 연관성을 보이지 않았다. 이는 유출펌프가 양성인 균주가 17주(20%)의 분포를 보였지만 그 양성인 균주에서 *adeB*의 과도발현이 특징적으로 나타나지 않았고 감수성인 균주내에서도 유출펌프가 양성인 균주와 *adeB* 과도발현을 발견할 수 있었기 때문이다. 하지만 carbapenem 내성에서 AdeABC의 역할은 여전히 논란의 여지를 남겨두고 있다. 이전에 문헌에 의하면 Imipenem에 내성인 임상균주와 돌연변이 균주에서 CCCP가 존재할 때 imipenem MIC가 감소하였지만, 이러한 균주에서 *adeB*의 과도발현이 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 다른 시스템이 carbapenem을 유출시켰거나 AdeABC 내에서 특정 돌연변이가 기질 프로파일을 확장시켰음을 보여주지만, 그렇

다고 이러한 시스템이 발현 수준을 확장 시켰다고는 단정할 수 없다. 따라서 AdeABC 과도발현은 carbapenem 내성에 기여를 하지만, 다른 유출 기전 또한 포함되어 있을 가능성이 존재한다고 보는 것이 바람직할 것이다. 또, 유출은 그 자체로 높은 수준의 내성을 부여하는 것이 아니라 약하게 MIC를 증가시키는 것이다. 이때 유출은 다른 기전이 연계되어 박테리아가 높은 수준의 내성에 도달하게 된다고 알려져 있는 보고(22)와 본 연구 역시 유사한 결과를 얻었다.

한편 내성 유출 유전자와 관련이 있는 *adeB*, *adeJ*, *adeE* 유전자의 임상검체 보유율을 알아보려고 통상적인 PCR 방법으로 시행하였다. 총 119균주의 *A. baumannii* 로 조사한 *adeB*, *adeJ*, *adeE* 유전자의 임상검체 보유율은 각각 91%, 92%, 10%로 나타났다. *adeB*와 *adeJ* 유전자는 내성인 균주에서 보유율이 높았고, *adeE* 유전자는 감수성인 균주에서 보유율이 더 높게 나타났다 (Table 4).

*adeB* 유전자 보유와 *adeB* 발현율의 상관관계를 조사한 결과 *adeB*가 과도발현 균주에서 *adeB* 유전자를 대부분 가지고 있었다. 그리고 감수성인 균주에서도 *adeB* 유전자를 19주(73%)정도 보유하고 있었다. 한편, *adeB* 양성유전자를 보유하고 있는 균주임에도 불구하고, *adeB* 과도발현이 나타나지 않은 경우는 유전자는 있으나 단백질 합성이 요구되지 않기 때문에 mRNA의 과도발현이 발생하지 않은 것으로 여겨진다.

결론적으로 meropenem에 대한 유출펌프의 역할을 평가하고자 실시했던 CCCP 실험의 결과를 바탕으로 판단해 볼 때, meropenem 항균제는 유출펌프 기전을 통한 역할이 일부 균을 제외한 다수의 임상균주에서 그 역할이 미비한 것으로 추정된다.

항균제 내성의 기전을 이해하는 것은 새로운 치료적 전략 개발을 위해 중요하다. *Pseudomonas aeruginosa* (24,25,26)와 같이, *A.baumannii*의 carbapenem 내성을 설명할 수 있는 것은 다양한 기전이 작용했을 확률이 크다는 것이다. 비록 우리의 결론이 상대적으로 작은 수의 임상 검체를 상대로 평가를 하였던 한계가 있고, *A.baumannii*의 균이 가지고 있는 국제적·지역적 특성과 clone의 분포 및 변화 양상이 다르다는 사실 (27)에 주목할 필요가 있다.

**Table 1.** Primers sequence used in this study

Gene	Primer sequence	Size
<i>adeB</i> (quantitative)	Foward,5'-AACGGACGACCATCTTTGAGTATT-3'	84bp
	Reverse,5'-CAGTTGTTCCATTTACGCATT-3'	
16S RNA	Foward,5'-CAGCTCGTCTCGTGAGATGT-3'	150bp
	Reverse,5'-CGTAAGGGCCATGATGACTT-3'	
<i>adeB</i> (qualitative)	Foward,5'-GTATGAATTGATGCTGC-3'	979bp
	Reverse,5'-CACTCGTAGCCATACC-3'	
<i>adeJ</i>	Foward,5'-ATTGCACCACCAACCGTAAC-3'	453bp
	Reverse,5'-TAGCTGGATCAAGCCAGATA-3'	
<i>adeE</i>	Foward,5'-GAGCTGAGGATTCTCTATGT-3'	504p
	Reverse,5'-AGTGTGCTCACCATATAGTC-3'	

**Table 2.** Results of synergy test between meropenem and CCCP

	The extent of reduction in the MIC of meropenem by the addition of CCCP			
	2fold ↓	4fold ↓	8fold ≤ ↓	No change
Susceptible group	9(35%)	2(8%)	1(4%)	14(54%)
Intermediate group	3(43%)	1(14%)	0(0%)	3(43%)
Resistant group	18(21%)	17(20%)	2(2%)	49(57%)
Total	30(25%)	20(17%)	3(3%)	66(55%)

**Table 3.** Frequencies of *adeB* overexpression among meropenem  
 –Susceptible, – Intermediate, and – Reference group of *A. baumannii*

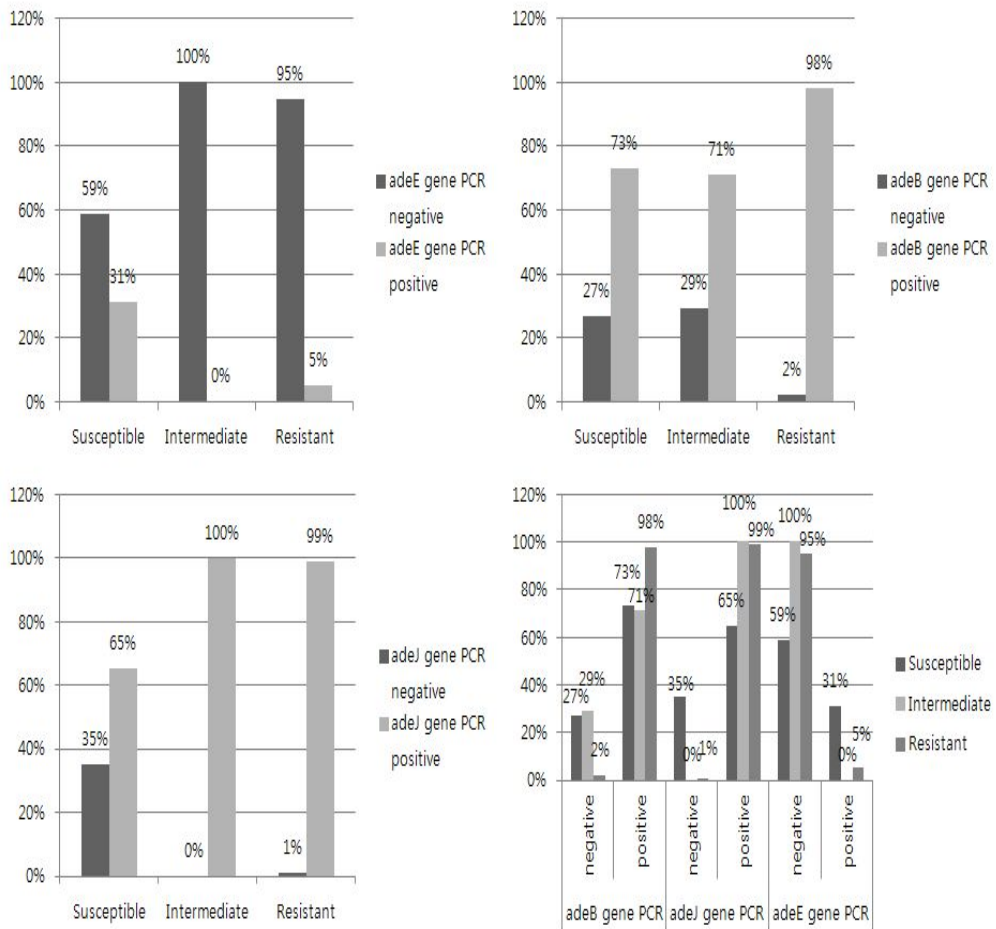
	Real-time RT PCR for <i>adeB</i>		
	Susceptible group	Intermediate group	Resistant group
overexpression of <i>adeB</i>	15(58%)	4(57%)	76(88%)
Total strains	26	7	86

**Table 4.** Frequencies of *adeB*, *adeJ*, and *adeE* efflux genes in *A. baumannii*

	<i>adeB</i> gene PCR		<i>adeJ</i> gene PCR		<i>adeE</i> gene PCR	
	negative	positive	negative	positive	negative	positive
Susceptible group	7(27%)	19(73%)	9(35%)	17(65%)	18(69%)	8(31%)
Intermediate group	2(29%)	5(71%)	0(0%)	7(100%)	7(100%)	0(0%)
Resistant group	2(2%)	84(98%)	1(1%)	85(99%)	82(95%)	4(5%)
Total	11(9%)	108(91%)	10(8%)	109(92%)	107(90%)	12(10%)



**Figure 1.** Distribution of efflux pump genes assayed by Conventional PCR



## V. 참고문헌

- (1) Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3298-304.
- (2) Magnet, S., P. Courvalin, and T. Lambert. 2001. Resistance -nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3375-3380.
- (3) Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78:119-146.
- (4) Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516-523.
- (5) Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 1999;31:394-5.
- (6) Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zorawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia*

Histochem Cytobiol 2008;46:257–67.

(7) van Veen HW, Konings WN. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochim Biophys Acta* 1998;1365:31–6.

(8) Marger MD, Saier Jr MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993;18:13–20.

(9) Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier Jr MH, Turner RJ, Weiner JH, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol* 1996;19:1167–75.

(10) Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:12–26.

(11) Piddock, L .J. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:629–636.

(12) Poole K. Outer membrane and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3:77–78

(13) Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Trynieszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46:257–67.

(14) Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3198–202.

- (15) Damier-Piolle, L., S. Magnet, S. Bremont, T. Lambert, and P. Courvalin. 2008. AdeJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 557–562.
- (16) Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78:119–146.
- (17) Huang, L., L.Y. Sun, G.B. Xu, and T.A. Xia. 2008. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* at a Chinese hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62:326–332.
- (18) Lee, Y., et al. 2010. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the bla(OXA-66) gene. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 40:43–48.
- (19) Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. *Acinetobacter baumannii* 2002–2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microb Drug Resist* 2010;16: 209–15.
- (20) Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:939–951.
- (21) Shi W.F., Jiang J.P., Xu N, Huang Z.M and Wang Y.Y, Inhibitory effects of reserpine and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone on fluoroquinolone resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Chin Med* 2005 ; 118(4):340–343

(22) Hu, W. S., et al. 2007. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3844–3852.

(23) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement M100-S16. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

(24) Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 36:2046–8.

(25) Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 45:1964–71.

(26) Pai H, Kim J-W, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 45:480–4.

(27) Higgins PG, Poirel L, Nass T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the bla<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010;16:35–40

## VI. 감사의 말씀

우여곡절 끝에 논문을 마치고 이렇게 감사의 글을 올릴 수 있는 지금 이순간이 저에게 가장 행복한 시간인 것 같습니다. 언제나 현실에 안주하며 살아 왔던 습관들이 마지막 까지 저의 발목을 잡았지만 끝까지 완주 할 수 있었던 건 저에게 많은 도움을 주신 분들의 덕분이라고 생각합니다.

먼저 수많은 지식의 보물 창고를 쉽게 열수 있도록 마지막까지 도와주신 장숙진 지도교수님께 감사드립니다. 교수님의 학문에 대한 끝없는 열정과 노력은 저에게 많은 귀감이 되었습니다. 존경합니다. 그리고 최종심사에서 많은 조언을 주신 문대수 교수님과 실험을 진행할 때 마다 많은 가르침과 노하우를 가르쳐 주신 박건 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 병원업무와 학업을 병행하는 저의 모습에도 언제나 웃음과 격려를 아끼지 않으셨던 이병설 선생님, 대학원에 같이 진학하여 실험실에서나 강의실에서나 항상 옆에서 든든한 동료가 되어준 친동생같은 우관이, 실험실에서 “성실”의 표본이 되어주고 마지막 남은 3주 동안 제일 고생이 많았던 지애에게 깊은 감사를 드립니다. 끝으로 조선대학교병원 진단검사의학과 모든 선생님들께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

내 삶의 멘토인 우리 형 사랑하고 많은 도움 고마웠어. 공부를 한다는 것과 논문을 쓴다는게 쉽지 않다는 걸 새삼 깨달은 것 같아. 물론 보람도 컸어. 그리고 시골에 계신 우리 엄마와 주은이 키우느라 고생이 많은 누나 사랑해. 주말마다 귀찮게 하는 저희를 따뜻하게 맞아 주시는 장인, 장모님 감사합니다. 우리 휘서 돌봐주시는 고모부, 고모님께도 정말 감사드립니다.

마지막으로 저의 짜증을 다 받아 주던 나의 사랑스런 아내, 혜영이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

‘꿈이 바로 앞에 있는데 당신은 왜 팔을 뻗지 않는가?’라는 말처럼 앞으로도 현실

에 안주하지 않고 꿈을 향해 매진하고 노력하겠습니다.

2012년 6월 심재광

