

Acinetobacter baumannii 임상분리주의 다약제 내성에 대한 *adeIJK* 유출펌프 유전자의 역할

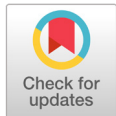
최지애¹, 김춘미², 장숙진³, 조성식⁴, 장철호⁵, 고영진³, 강성호³, 박건³

¹질병관리본부 국립보건연구원 감염병연구센터 약제내성과, ²조선대학교 의과대학 의예과, ³조선대학교 의과대학 진단검사의학과, ⁴조선대학교병원 진단검사의학과, ⁵전남대학교 의과대학 이비인후과학교실

Role of Efflux Pump Gene *adeIJK* to Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates

Ji Ae Choi¹, Choon-Mee Kim², Sook-Jin Jang³, Seong-Sik Cho⁴, Chul Ho Jang⁵, Young-Jin Ko³, Seong-Ho Kang³, Geon Park³

¹Division of Antimicrobial Resistance, Center for Infectious Diseases Research, Korea National Institute of Health, KCDC, Cheongju, ²Premedical Science, ³Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, ⁴Department of Laboratory Medicine, Chosun University Hospital, Gwangju, ⁵Department of Otolaryngology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Republic of Korea.



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(1): 45-54
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.1.45>

Corresponding author

Sook-Jin Jang

E-mail: sbjjang@chosun.ac.kr

Tel: +82-62-220-3272

Fax: +82-62-232-2063

Received: September 20, 2019

Revised: November 18, 2019

Accepted: December 1, 2019

© 2020 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Background: The emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen is one of the major public health problems. The aim of this study was to evaluate the role of an efflux pump gene *adeJ* for the multidrug resistance of *A. baumannii* clinical isolates.

Methods: Two groups (MDRAB and SAB) of *A. baumannii* clinical isolates were studied. The SAB group consisted of strains that did not meet the criteria of MDRAB and were susceptible to more categories of antibiotics than MDRAB. Antimicrobial susceptibility results obtained by VITEK II system were used in data analysis and bacterial group allocation. We performed real-time reverse transcription PCR to determine relative expression of *adeJ*. We compared relative expression of *adeJ* in comparison groups by considering two viewpoints: i) MDRAB and SAB groups and ii) susceptible and non-susceptible groups for each antibiotic used in this study.

Results: The mean value of relative expression of *adeJ* of MDRAB and SAB groups was 1.4 and 0.92, respectively, and showed significant difference ($P=0.002$). The mean values of relative expression of *adeJ* of susceptible and non-susceptible groups to the antibiotics cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, tigecycline, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, piperacillin, and gentamicin showed statistically significant differences.

Conclusion: The overexpression of *adeIJK* might contribute to the multi-drug resistance in *A. baumannii* clinical isolates. Further, the overexpression of *adeIJK* might be one of the factors contributing to the resistance to numerous antibiotics.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *adeJ* gene, Efflux, Multidrug resistance

INTRODUCTION

Acinetobacter spp.는 흔히 의료관련 감염을 일으키며 주로 흡인성 폐렴과 카테터관련 균혈증과 같은 원내감염을 흔히 일으키나 연조직 및 요로의 감염도 일으킬 수 있다. *Acinetobacter* spp.의 다양한 균종 중에서 *Acinetobacter baumannii*는 임상적 및 역학적으로 가장 흔히 감염증을 일으키는 주된 병원감염균이다[1]. 세계적으로 다약제 내성 *A. baumannii* (multidrug-resistant *A. baumannii*, MDRAB) 균주가 증가하는 추세를 보이고 있다[2,3].

MDRAB로 감염된 환자를 치료할 때 MDRAB가 다약제 내성을 나타내기 때문에 치료에 사용할 수 있는 약제 선택에 어려움이 많다. *Acinetobacter* spp. 중 다약제 내성을 보이는 균들의 빈도가 높아서, 조기에 비효과적인 항생제가 투여되었을 때 더 위중한 임상 결과가 나올 수 있다[4]. 그러므로 다양한 항생제 내성에 대해 이해하는 것이 필요하고 그에 바탕을 둔 효과적인 대처가 중요하다.

*A. baumannii*가 보유한 다양한 항생제 내성기전 중 유출펌프는 세포질 막에 위치해 있는 운반체에 의해 항생제를 세균 세포 밖으로 배출하는 기전이다. 유출펌프가 과다발현되면 항생제들의 배출이 촉진되어 세균 내 항생제 농도가 낮아지므로 약제내성이 발생하게 된다[5].

Acinetobacter spp.의 약제내성과 연관된 대표적인 유출펌프로 알려져 있는 RND 유출펌프계 (efflux systems)는 세 구조의 복합체(tripartite complexes)로 이루어져 있다. 세 구조 중에서 가장 중요한 전달체(transporter)는 외막 통로(channel)와 원형질주변의 보조단백질(periplasmic adaptor protein, PAP)과 협력하여 많은 항생제와 화학요법제를 활발하게 배출하도록 촉진하는 역할을 하는 펌프이다[5,6]. 그래서 다양한 유출펌프 유전자들의 유무나 발현량을 측정할 때에도 이 전달체를 측정하여 해당 유출펌프가 검체에 존재하는지 조사되고 있다[7,8]. 본 연구에서도 세 부분으로 구성된 AdeIJK 복합체중 전달체(transporter) 유전자인 *adeJ* 펌프 유전자의 발현량을 측정함으로써 AdeIJK 유출펌프계의 활성을 평가하였다.

A. baumannii 균주에 있는 *Acinetobacter* drug efflux (Ade) RND 유출펌프계 중 AdeABC와 AdeFGH 및 AdeIJK는 특성이 잘 규명되어 있는 유출펌프이다. 그중 AdeABC와 AdeFGH 펌프는 획득 항생제 내성에서 주요한 역할을 하고 AdeIJK 펌프는 내인성 내성에 기여한다[5]. *A. baumannii*의 대표적인 RND 유출펌프 유전자인 *adeABC*와 다약제 내성과의 연관성은 많이 밝혀져 있으나 *adeIJK*에 대해서는 *adeABC*에 비해 연구가 별로 없다. AdeIJK 유출펌프를 인코딩하고 있는 *adeJ* 유전자의 과발현에 의한 약제 내성에 대해 참조균주나 소수의 돌연변이주를 대상으로 연구한 보고[1,5,9]들은 있지만 다수의 임상분리주나 한국의 임상분리주로 유출펌프 유전자 발현량과 항생제 내성간 연관성을 연구한 문헌은 드물다.

본 연구의 목적은 다수의 임상 분리주를 대상으로 하여 첫째, 다수의 항생제에 대해 감수성인 susceptible *A. baumannii* (SAB) 군과 MDRAB 군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량에 차이가 있는지를 비교하고 둘째, 각 항생제별로 항생제 감수성군과 비감수성군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량에 얼마나 차이가 있는지 여부를 비교함으로써 *adeIJK* 유출펌프 유전자의 과발현이 임상분리주에서 항생제 내성에 어느 정도 기여하는지 파악하는데 있다.

MATERIALS AND METHODS

1. Bacterial strains

연구대상 균주는 *A. baumannii* 임상분리주 100주와 참조균주 2주를 포함한 총 102주를 대상으로 하였다. 참조균주로 NCBI에 연쇄정보가 등록되어 있는 다제내성 임상균주 *A. baumannii* AYE 주와 *A. baumannii* 표준균주(ATCC19606)를 사용하였다[10]. *A. baumannii* 임상분리주 100주는 조선대학교병원 진단검사의학과 미생물검사실에 의뢰된 배양 검체에서 분리되어 VITEK II 자동분석기(bioMérieux, Maray l'Etoile, France)를 이용하여 *A. baumannii*로 동정된 균주들을 분자생물학적 기법을 사용해 균종명이 맞는지 확인하여 선별하였다. 즉 *A. baumannii*에 특이적인 PCR 검사인 *bla*_{OXA-51-like} PCR과 *gyrB* Multiplex 1 PCR 검사를 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 장비로 수행하여 *bla*_{OXA-51-like} PCR 산물 크기가 353 bp이고, *gyrB* Multiplex 1 PCR에서 490 bp와 294 bp 길이의 증폭산물이 함께 나와서 균종명이 *A. baumannii*로 확인된 균주들을[11,12] 연구대상 균주로 사용하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

PCR	Gene	Primer	Sequences (5' → 3')	AT	References
Conventional PCR	<i>gyrB</i> Multiplex 1	Sp4F	CAC GCC GTA AGA GTG CAT TA	60°C	(11)
		Sp4R	AAC GGA GCT TGT CAG GGT TA		
		Sp2F	GTT CCT GAT CCG AAA TTC TCG		
	<i>bla</i> _{OXA51-like}	Oxa51-like F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	55°C	(12)
		Oxa51-like R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
Real-time RT-PCR	<i>rpoB</i>	rpoB F	CTC ACT ATG GTC GTG TTT GTC	57°C	this study
		rpoB R	CCA AGA AAC CGA AGT CAT TCG		
	<i>adeJ</i>	adeJ F	CAA GTT ATT GCA TTC TAT TCA CCA G	57°C	this study
		adeJ R	GAC CTG TAC CTC ACC AAC AC		

Abbreviation: AT, annealing temperature.

균주의 항생제 감수성검사는 VITEK II 자동분석기(bioMérieux, Maray l'Etoile, France)로 측정하였으며 아래와 같은 항생제들에 대한 감수성검사 결과에 따라 연구대상 균주의 균을 분류하였다: 즉, aztreonam과 cefepime, cefotaxime, ceftazidime, tigecycline, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, colistin, meropenem, 및 minocycline이 각 균주들이 속한 균의 분류에 사용되었다.

MDRAB의 정의는 Magiorakos 등의 기준에 의거하여 3가지 이상의 항생제 종류(category)에 대해 각 종류에 속한 항생제 중 1개 이상의 항생제에 대해 비감수성인 균으로 정하였다[13]. 연구목적에 MDRAB 균과 SAB 균을 비교하는데 있었기 때문에 MDRAB와 XDRAB를 구분하지 않고 모두 MDRAB 균에 넣어 분석하였다. SAB 균은 MDRAB 균보다 더 많은 카테고리에 속한 항생제에 대해 감수성을 보여서 MDRAB의 기준을 맞추지 못하는 균주들로 구성되었다. *A. baumannii* 임상분리주 100주는 MDRAB 70균주와 SAB 30 균주로 구성되었다.

또한 각 항생제별로 VITEK II 결과에 따라 감수성균과 비감수성균을 분류하였다. 임상분리주 100주에서 각 항생제에 대해 감수성검사를 한 결과 중간내성이나 내성으로 나와 비감수성

(non-susceptible, NS) 군에 속한 균주들의 비율을 항생제별로 살펴보면 colistin은 1.0%, minocycline 7.0%, tigecycline 39.0%, cefotaxime 77.0%, aztreonam 99.0%이었다. gentamicin과 meropenem은 비감수성 비율이 둘다 71.0%이었다. 그리고 ampicillin/sulbactam과 cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole은 각각 72.0%의 비감수성 비율을 보였다.

대상균주가 분리된 환자들의 남녀 성비는 2.1:1로서 남자환자에서 더 많이 분리되었으며, 대상균주들이 주로 분리된 검체는 객담(56.0%)과 개방성 농(open pus) (26.0%)이었고, 그 외에 소변(5.0%)과 전혈(4.0%), 비개방성 농(closed pus) (1.0%), 흉수(pleural fluid) (1.0%), 뇌척수액(1.0%), 기타 검체(6.0%)로 구성되었다.

2. Extraction of RNA and synthesis of cDNA

Luria-Bertani (LB) 액체배지에서 위와 동일한 방법으로 하룻밤 진탕배양한 균액을 1%가 되도록 새로운 LB 액체배지에 접종하여 3시간 동안 추가로 진탕배양하였다. 3시간 후, OD₆₀₀값이 0.8-0.9가 되도록 탁도를 조정하였다. 탁도를 맞춘 균부유액을 4,000 rpm, 15분 동안 원심분리하였으며, 상층액을 제거 후, 균의 침전물을 인산완충 생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS) 200 µL에 다시 부유하여 High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 시약설명서에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 유전체 DNA의 제거는 DNase 처리과정이 포함된 RNA kit를 사용하여 진행되었고 전체 RNA를 추출한 직후 그 농도를 측정하였다. 순도가 확인된 RNA를 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA합성을 위해 1 µg의 RNA 검체를 RNA 합성용 SuperScript VILO master mix 4 µL에 넣은 후 증류수를 첨가하여 용액의 총량을 20 µL로 만든 후 반응시켰다. 이렇게 합성한 cDNA를 -80°C 냉동고에 보관한 후, 실험에 사용하였다.

3. Real-time Reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)

A. baumannii 균주내 *adeIJK* 유출펌프의 발현량과 항생제 내성간의 상관관계를 알아보기 위해 real-time RT PCR을 수행하였다. *A. baumannii* 균주들에 들어 있는 *adeIJK* 연쇄들을 바탕으로 하여 Table 1에 제시된 *adeJ* 시동물질을 제작하였다. 디자인된 *adeJ* 시동물질의 적합성을 확인하기 위해 NCBI에 수록된 모든 *A. baumannii* 임상균주들의 *adeJ* 연쇄(sequence)와 정렬(aligned)하여 100% 일치하는지 여부를 확인하여 시동물질의 적합성을 확인하였다(Table 1). Real-time RT PCR을 위해 합성된 cDNA 4 µL (200ng), 10 µM 농도의 앞쪽 및 뒤쪽 시동물질을 각각 1 µL씩 넣고, iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)를 10 µL, 증류수 4 µL를 혼합하여 총량 20 µL가 되도록 준비한 후, CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)을 사용하여 real time RT-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 30분 동안 전변성 단계를 거쳐 95°C에서 5초간 변성, 57°C에서 30초간 결합, 72°C에서 30초간 연장하는 3단계를 35회 동안 반복하였다. 추가적으로 실험 조건을 최적화하고 표적(target) 검증을 하기 위해 65°C부터 95°C까지 0.5°C씩 5초 간격으로 용해온도곡선(melting-curve) 확인을 하였다. *adeJ* 목표 유전자의 상대발현량을 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, USA) 장비에서 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 산정하였다. 약술하면 *adeJ* 목표 유전자의 발현을 *rpoB* 살림 유전자

(housekeeping gene)를 사용하여 표준화시켰다. 표준화시킨 *adeJ* 유전자 발현량을 *A. baumannii* ATCC 19606균주의 발현량(발현수준을 1로 할당)을 기준으로 눈금조정(calibration)하여 상대발현량을 산정하였다. 이러한 결과자료 분석은 Bio-Rad CFX manager 3.0 소프트웨어(Bio-Rad)를 이용하여 시행하였다[14].

4. Statistical analysis

VITEK II 자동분석기로 측정한 항생제 감수성 결과에 따라 균군을 각 항생제에 대한 감수성군과 내성군으로 각각 나누어 각 군별 *adeJ* 유전자 발현량을 비교하여 유의한 차이가 있는지 Student T-test로 평가하였다. MDRAB 군과 SAB 군에 대해서도 같은 방식으로 평가하였다. SPSS 프로그램 (version 22.0; IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)으로 분석하여 $P < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

RESULTS

1. Comparison of relative expression of *adeJ* between MDRAB and SAB group

연구대상 균주들의 *adeJ* 발현량을 real-time RT-PCR로 측정하고 *A. baumannii* 표준균주(ATCC19606)를 calibrator로 삼아 상대 정량한 결과, *A. baumannii* AYE의 발현량은 1.06, SAB 군의 *adeJ* 유전자 평균발현량은 0.92, MDR 군의 *adeJ* 유전자 평균발현량은 1.4이었다. SAB 군과 MDRAB군의 *adeJ* 평균 유전자 발현량은 통계적으로 유의한 차이($P=0.002$)를 나타내었다(Fig. 1).

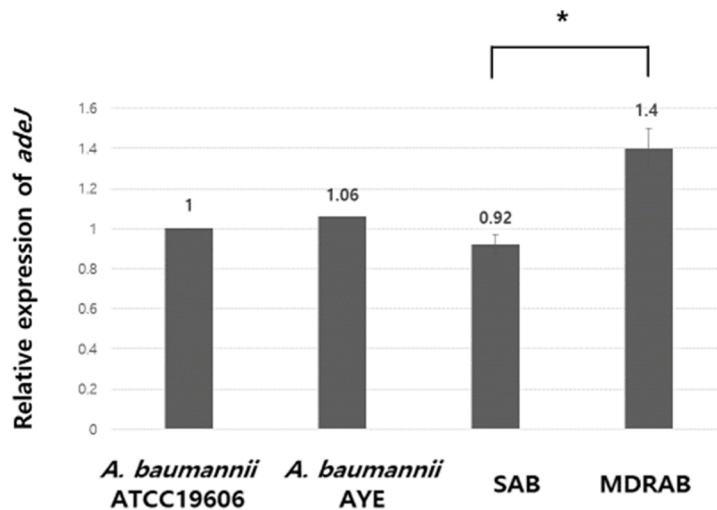


Fig. 1. Relative expression of the *adeJ* efflux pump gene determined by real-time reverse transcriptase PCR in *A. baumannii* type strain (ATCC19606), multidrug resistant *A. baumannii* AYE strain, 70 strains of multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) and 30 strains of non-MDRAB clinical isolates. The normalized expression of *adeJ* was calibrated with the expression of *A. baumannii* ATCC 19606. The error bars represent the standard error of the mean. * $P < 0.05$.

2. Comparison of relative expression of *adeJ* of clinical isolates between non-susceptible (NS) group and susceptible (S) group to each antibiotics

연구대상 균주들을 각 항생제에 대한 감수성검사결과에 따라 감수성균과 비감수성균으로 나누고 각 균의 *adeJ* 유전자 발현량을 비교한 결과 minocycline 을 제외한 대부분의 항생제에 대해 비감수성균의 유전자 발현량이 감수성균에 비해 유의하게 높게 나왔다. 특히 cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid 항생제에 대한 감수성균과 비감수성균간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 유전자 발현량 차이가 뚜렷하였다($P < 0.001$). 또한 piperacillin과 trimethoprim/sulfamethoxazole ($P = 0.001$), tigecycline ($P = 0.005$), cefotaxime ($P = 0.006$), gentamicin ($P = 0.019$) 항생제에 대해서도 감수성균과 비감수성균간 *adeJ* 유전자 발현량에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 그러나 aztreonam의 비감수성균과 colistin의 감수성균에 속한 균주 수가 너무 작아 aztreonam과 colistin은 통계적으로 유의한 차이가 있는지 분석할 수 없었다(Fig. 2).

DISCUSSION

*AdeIJK*가 *A. baumannii* 안에서 다양한 부류(classes)의 약제에 대한 내인성 내성에 기여한다는 것은 *AdeIJK*를 결손 또는 과다발현시킨 소수의 돌연변이주 실험을 통해 밝혀져 있다[5,9]. 이런 현상이 다수의 임상분리주에서도 나타나는지 여부와 그 정도를 알아보기 위해 한국의 한 대학병원에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 본 연구를 시행하였다. 그 결과 MDRAB 균이 SAB 균에 비해 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량이 유의하게 높았기 때문에 임상분리주에서도 *adeJ* 유출펌프 유전자가 *A. baumannii*의 다약제내성에 기여한다고 생각되었다. *adeIJK* 유전자의 발현량은 별로 높지 않았는데 이는 이전 연구 결과들과 유사한 결과였다 [5,9,15]. Transcriptomic microarray 및 실시간 역전사 PCR 정량법(quantitative realtime reverse transcription-PCR, qRT-PCR)으로 실험했을 때 *adeIJK* 과다발현의 수준이 *adeABC*에 비해 낮았던 결과에 대해 Rosenfeld 등은 *AdeIJK*의 숙주에 미치는 독성에 대한 역치가 낮고 *AdeIJK* 발현량이 엄격하게 조절되고 있다는 것을 제시하는 소견으로 해석하였다[15].

adeJ 유출펌프 유전자는 ticarcillin, cephalosporins, aztreonam 같은 β -lactams 항생제와 fluoroquinolones, tetracyclines, tigecycline에 내인성 내성을 나타내는데 기여하는 것으로 알려져 있다[5]. 각 항생제별로 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량을 비교해보았을 때 대부분의 항생제에 대해 감수성균에 비해 비감수성균에서 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량이 유의하게 높았기 때문에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 이러한 다양한 항생제들의 내성에 일조하는 것으로 여겨졌다. 본 연구에서 ticarcillin, ceftazidime, cefepime, meropenem, ciprofloxacin, tigecycline, trimethoprim 등에 대한 감수성균보다 비감수성균의 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높아 이들 항생제에 대한 내성에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 기여한다고 한 Yoon 등의 결과와 일치하였다[9]. 반면 Yoon 등의 결과와 불일치한 소견을 보인 항생제는 imipenem과 minocycline이었다. 본 연구에서 imipenem에 대한 비감수성균이 감수성균에 비해 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높았으나 Yoon 등의 결과에서는 큰 차이가 없었다[9]. Minocycline 항생제에 대한 내성에 *adeJ* 유출펌프 유전자가 기여한다고 한 Yoon 등의 결과[9]와 달리 본 연구에서는 minocycline에 대한 감수성균과 비감수성균 간

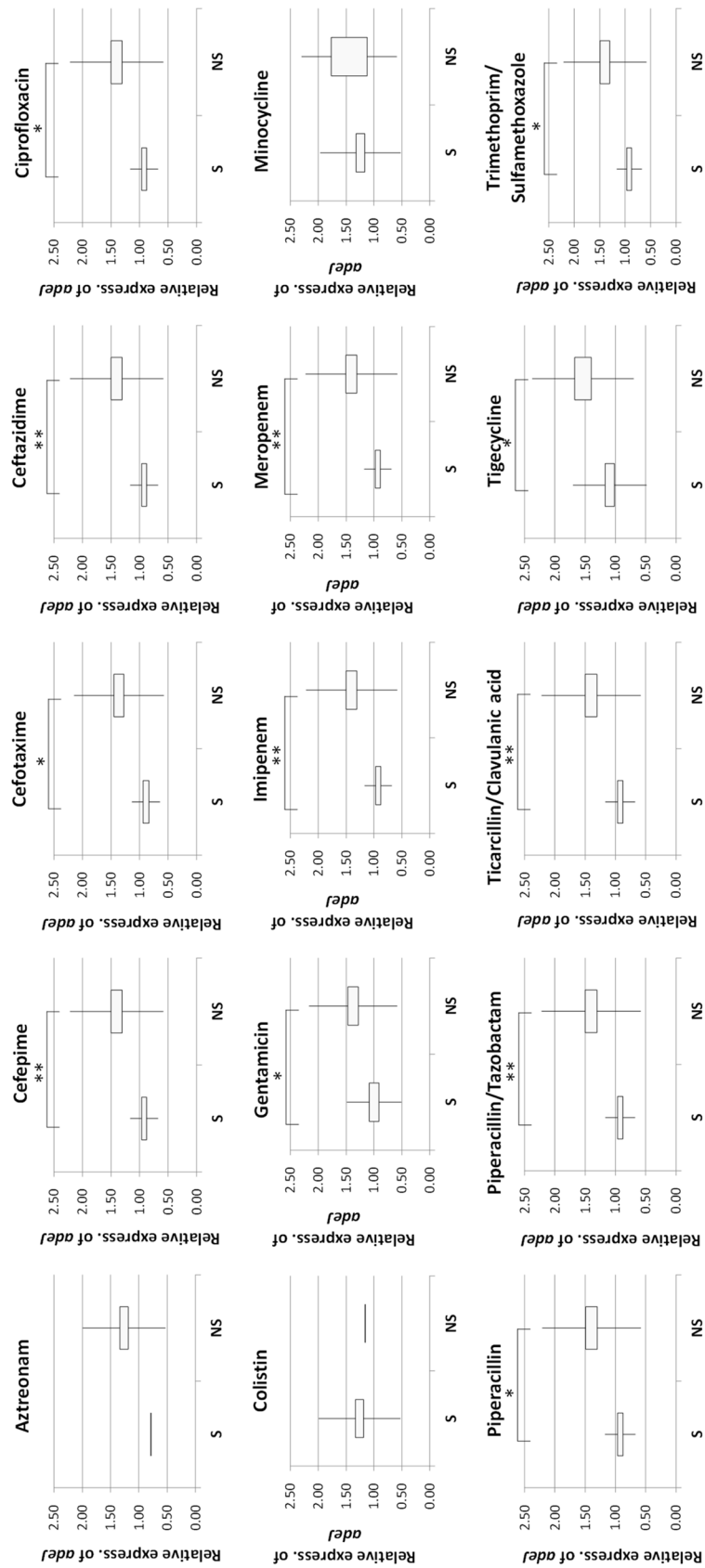


Fig. 2. Relationship between *adeJ* pump gene expression and resistance to each antibiotics. Relative expression of *adeJ* efflux pump gene in non-susceptible (NS) group was higher than that of susceptible (S) group to each antibiotics in general. The statistically significant difference was found between S and NS groups to cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, tigecycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. The error bars represent the standard error of the mean.

에 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량에 유의한 차이가 없었다. 또한 gentamicin에 대한 감수성군보다 비감수성군에서 *adeJ* 유출펌프 유전자 발현량이 유의하게 높았는데 이는 aminoglycosides는 *adeJ* 유출펌프 유전자의 기질이 아니라고 한 Coyne 등의 연구와는 대조적인 결과였다[5]. Fernando 등의 연구에서 *adeIJK* 과다발현이 *A. baumannii* 균주의 다제내성과 연관되는 점은 우리 결과와 유사하였으나 ceftazidime, imipenem 약제에서 *adeIJK* 발현량에 차이를 보이지 않은 점은 우리와 다른 결과였다[16]. Rumbo 등이 PFGE-ROC-10XA-58 클론의 *A. baumannii* 균주에서 tigecycline 내성에 *adeJ*의 과다발현이 관련되었다고 한 점은 본 연구 결과와 유사했으나 gentamicin과 minocycline에 대해서는 본 연구와 상이한 결과를 나타냈다[17]. 우리는 항생제 내성에 대해 VITEK II 자동분석기의 기준으로 균주 군을 나누었으나 그들은 임의로 정한 기준에 따라 균주 군을 나누었기 때문에 결과에 차이가 있었을 가능성이 있다. 그러나 그들이 동일한 방법으로 연구한 다른 클론의 균주에서도 다른 결과가 나왔기 때문에[17] 균주의 특성에 따라 결과가 다를 수 있다는 것을 Rumbo 등의 연구가 보여주었다고 생각되었다.

본 연구를 종합해 볼 때 한국에서 분리된 다수의 임상균주를 대상으로 한 우리의 결과 또한 참조균주나 돌연변이주들을 대상으로 한 여러 연구들과 유사하게 *adeIJK* 유출펌프 유전자 발현량이 MDRAB 균주에서 유의하게 높았기 때문에, *A. baumannii* 임상분리주의 다제 내성에 *adeJ* 유출펌프 유전자 과다 발현이 기여한다는 것을 시사해주는 소견이라고 생각할 수 있었다. 비록 MDRAB 군과 SAB 군간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현량에 유의한 차이를 보이기는 했지만, MDRAB 균주에서 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현이 낮은 균주들도 있었고 SAB 균주 중에서도 *adeJ* 유출펌프 유전자의 발현이 높은 균주들도 관찰되었다. 이와 같이 균주별로 발현량에 차이가 있는 점은 다른 연구에서도 관찰된 현상으로 균주별 차이가 작용하는 것으로 생각된다[7,17]. 또한 균주의 유전형이 각 항생제에 대한 내성의 크기에 영향을 미칠 수도 있고, 균주들의 유전체에 들어있는 다른 항생제 내성 유전자의 종류에 따라 서로 다른 연구들간에 항생제 내성 양상에 차이가 나타나는 것이 알려져 있다[18].

본 연구에서 내성 균주의 정량 값과 감수성 균주의 정량 값의 평균치들 간에 유의한 차이는 있었으나 비교적 근소한 차이였고, 균주별로 다양하게 나온 것을 볼 때 이들의 내성기전에 다른 유출펌프의 과다발현이나 다른 내성기전이 함께 영향을 미쳤을 가능성이 있을 것으로 추정된다. *A. baumannii*는 다양한 항생제 내성 기전을 가지고 있으며 내성을 쉽게 획득하고 전파할 수 있는 유연성이 있고 각 기전간의 상호작용도 내성을 증가시킬 수 있다. 항생제에 대한 낮은 투과성과 기본적으로 보유하고 있는 유출펌프 사이의 상호작용이 다양한 종류의 항생제에 내인성 내성을 부여하여 선택가능한 치료제를 제한시킨다고 알려져 있다[4]. *Acinetobacter* 균종 감염의 치료제로 흔히 사용되고 있는 carbapenem에 대한 내성 획득에 가장 중요한 기전은 이 항균제에 대한 가수분해능이 있는 효소(carbapenemase)의 생성이며, 세포외막 단백질(outer membrane protein, OMP)의 변화, penicillin 결합 단백질(penicillin-binding protein, PBP)의 친화도 혹은 발현량의 변이, 유출펌프 유전자의 과다발현 등 비효소적 기전도 carbapenem 내성 획득에 기여하는 것으로 알려져 있다[19]. 본 연구에서는 *AdeIJK* 유출펌프에 대해서만 연구하였고 다른 내성 인자들에 대해서는 실험하지 못하였기 때문에 여러 내성 기전간의 상호작용이나 주된 내성기전 여부에 대해서 밝힐 수 없는 한계가 있다. 따라서 다수의 임상분리주를 대상으로 다양한 내성기전을 함께 조사하여 이들간의 상호작용에 대해서 향후 더 연구할 필요가 있다.

본 연구 내용을 요약하면 다수의 *A. baumannii* 임상분리주를 대상으로 연구한 결과, *A. baumannii* 임상분리주에서도 *AdeIJK* 유출펌프의 과다발현이 다약제 내성에 기여하는 인자일 수도 있으며, *AdeIJK* 유출펌프가 임상에서 주로 사용되는 다양한 항생제의 내성에 기여하는 기여 인자 중 하나일 수 있다는 것이다.

요약

배경: 병원감염의 병원균으로서 다제내성 *A. baumannii*의 부상은 주된 공중보건문제 중 하나이다. 본 연구의 목적은 *A. baumannii* 임상분리주의 다약제 내성에 대한 *adeJ* 유출펌프 유전자의 역할을 평가하는데 있다.

방법: MDRAB와 SAB 두 군의 *A. baumannii* 임상분리주가 연구에 사용되었다. SAB 군의 균주 구성은 MDRAB보다 더 많은 범주의 항생제에 감수성을 보여서 MDRAB의 기준을 맞추지 못하는 균주들로 이루어졌다. 세균 군 할당과 자료 분석에 VITEK II 장비에 의해 얻어진 항생제 감수성 결과를 사용하였다. *adeJ* 유출펌프 유전자의 상대발현량을 측정하기 위해 실시간 역전사 PCR 분석을 시행하였다. 비교 대상군내 *adeJ* 유출펌프 유전자의 상대발현량을 다음과 같은 두가지 관점에 따라 비교하였다: i) MDRAB과 SAB 군, ii) 본 연구에 사용된 각 항생제에 대한 감수성군과 비감수성군의 관점이다.

결과: MDRAB과 SAB 군의 *adeJ* 유출펌프 유전자의 상대발현량의 평균치는 각각 1.4와 0.92로서 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P=0.002$). 다음의 항생제들 즉 cefepime과 ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, tigecycline, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, piperacillin 및 gentamicin의 각 항생제에 대한 감수성군과 비감수성군 간에 *adeJ* 유출펌프 유전자의 상대발현량의 평균치는 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

결론: 본 연구는 *adeIJK* 유출펌프 유전자의 과발현이 *A. baumannii* 임상분리주의 다약제 내성에 기여할 수도 있다는 것을 제시한다. *adeIJK* 유출펌프 유전자의 과다발현이 다수의 항생제 내성에 기여하는 인자 중 하나일 수도 있다고 여겨진다.

FUNDING

이 논문은 2018년도 조선대학교병원 선택진료학술연구비(의료질향상학술연구비)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Yoon EJ, Balloy V, Fiette L, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Contribution of the ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. MBio 2016;7:e00697-16.
2. 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.
3. Hong SK, Seong MW, Lee DH, Kim EC. Correlation between carbapenem prescription trends and imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* at an intensive care unit between 2006

- and 2010. Lab Med Online 2012;2:232-4.
4. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin Microbiol Rev 2017;30:409-47.
5. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:947-53.
6. Nikaido H and Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. Biochim Biophys Acta 2009;1794:769-81.
7. Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. J Microbiol Immunol Infect 2017;50:224-31.
8. Choi IS, Choi JA, Jang SJ, Park G, Jeong SH, Kim CM, et al. Distribution of *adeG*, *adeB*, *adeE*, *adeY*, *abeM*, and *adeJ* efflux pump genes in clinical isolates of *Acinetobacter* species from Korea. Lab Med Online 2019;9:201-9.
9. Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, De E, et al. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. MBio 2015;6:e00309-15.
10. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet 2006;2:e7.
11. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. Clin Microbiol Infect 2007;13:1199-201.
12. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006;27:351-3.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18:268-81.
14. Fernando D and Kumar A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. J Antimicrob Chemother 2012;67:569-72.
15. Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Perichon B. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:2504-10.
16. Fernando DM, Xu W, Loewen PC, Zhanel GG, Kumar A. Triclosan can select for an AdeIJK-overexpressing mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 that displays reduced susceptibility to multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:6424-31.
17. Rumbo C, Gato E, Lopez M, Ruiz de Alegria C, Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:5247-57.
18. Amin IM, Richmond GE, Sen P, Koh TH, Piddock LJ, Chua KL. A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol 2013;13:158.
19. Jeong SH. Mechanisms of acquiring carbapenem-resistance in *Acinetobacter* species. Korean J Clin Microbiol 2009;12:1-5.