

Article

항생제 노출에 따른 *Klebsiella pneumoniae*의 내성 특성

정래승 · 조아라 · 김정진 · 안주희*

강원대학교 의생명과학대학 생물소재공학과

Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* exposed to serial antibiotic treatments

Lae-Seung Jung, Ara Jo, Jeongjin Kim, and Juhee Ahn*

Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received December 2, 2016; Revised December 26, 2016; Accepted December 26, 2016)

ABSTRACT: The emergence of antibiotic-resistant bacteria has been increased and become a public health concern worldwide. Many bacterial infections can be sequentially treated with different types of antibiotics. Thus, this study was designed to evaluate the changes in survival, antibiotic susceptibility, mutant frequency, β -lactamase activity, biofilm formation, and gene expression in *Klebsiella pneumoniae* after exposure to sequential antibiotic treatments of ciprofloxacin and meropenem. Treatments include control (CON; no addition), 1/2 MIC ciprofloxacin addition (1/2CIP), 2 MIC ciprofloxacin addition (2CIP), initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 1/2 MIC meropenem (8 h-incubation) and 2 MIC ciprofloxacin (16 h-incubation) (1/2CIP-1/2MER-2CIP), initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 1/2 MIC meropenem (8 h-incubation) and 2 MIC meropenem (16 h-incubation) (1/2CIP-1/2MER-2MER), and initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 2 MIC ciprofloxacin(8 h-incubation) and 2 MIC meropenem(16 h-incubation) (1/2CIP-2CIP-2MER). No growth of *K. pneumoniae* was observed for the 2CIP throughout the incubation period. The numbers of planktonic cells varied with the treatments (7~10 log CFU/ml), while those of biofilm cells were not significantly different among treatments after 24-h incubation, showing approximately 7 log CFU/ml. Among the sequential treatments, the least mutant frequency was observed at the 1/2CIP-1/2MER-2CIP (14%). Compared to the CON, 1/2CIP-2CIP-2MER decreased the sensitivity of *K. pneumoniae* to piperacillin, cefotaxime, and nalidixic acid. The highest β -lactamase activity was 22 nmol/min/ml for 1/2CIP-1/2MER-2CIP, while the least β -lactamase activity was 6 nmol/min/ml for 1/2CIP-2CIP-2MER. The relative expression levels of multidrug efflux pump-related genes (*acrA*, *acrB*, and *ramA*) were increased more than 2-fold in *K. pneumoniae* exposed to 1/2CIP-1/2MER-2MER and 1/2CIP-2CIP-2MER. The results suggest that the sequential antibiotic treatments could change the antibiotic resistance profiles in *K. pneumoniae*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, β -lactamase, biofilm

*Klebsiella pneumoniae*는 Enterobacteriaceae 과에 속하는 그람음성 간균으로, 구강이나 피부 및 장관에 존재하는 상재 세균이다. *K. pneumoniae*는 기회감염균으로 급성폐렴의 주요 원인균이 되며, 특히 병원 내 감염의 문제가 심각하게 대두되고 있다(Zhong *et al.*, 2013; Latifpour *et al.*, 2016). 최근에는 *K. pneumoniae*를 포함한 다양한 항생제에 내성을 갖는 다제내성균의 출현으로 기존의 항생제로 치료가 어려운 감염성 질환이 빠르게 확산되고 있고(Du *et al.*, 2014), 세균 감염 치료를

위해 임상에서 가장 많이 사용되는 항생제인 β -lactam 계열 항생제과 강력한 항균작용을 갖는 quinolone 계열 항생제에 대한 내성이 빠르게 증가하고 있다(Pages *et al.*, 2009; Drago *et al.*, 2010; Latifpour *et al.*, 2016). 이러한 항생제 다제내성균의 출현에 따라 항생제 내성 기작의 연구와 새로운 항생제 개발의 필요성이 커지고 있으나, 새로운 항생제의 개발에도 불구하고 세균의 내성률의 급속한 증가로 항생제의 상용 주기는 더욱 짧아지고 있다.

β -Lactamase 생성과 multidrug efflux pump system 활성화는 다제내성 획득에 중요한 요소로 작용한다(Pages *et al.*, 2009). *K. pneumoniae*는 β -lactam계 항생제를 불활성화 하기 위해

*For correspondence. E-mail: juheahn@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-6564; Fax: +82-33-259-5645

extended-spectrum β -lactamases, metallo- β -lactamases, oxacillinases, carbapenemases을 생성하고, resistance-nodulation-division (RND) family에 의해 기질인 β -lactam, fluoroquinolone, aminoglycoside를 세포 밖으로 배출한다(Rice *et al.*, 1991; Zhong *et al.*, 2013). *K. pneumoniae*를 포함한 많은 다제내성균의 출현과 확산을 감소시키기 위해서는 적절한 항생제의 처방이 요구된다(Warren *et al.*, 2004). 일반적으로 세균성 감염을 치료하기 위해 sequential chemotherapy (순차적 항생제 치료)를 사용하고 있다(Perron *et al.*, 2012; Nichol *et al.*, 2015). 그러나 순차적 항생제 노출에 따른 *K. pneumoniae*의 내성 특성 변화에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 carbapenem과 fluoroquinolone계 항생제의 순차적 노출에 따른 *K. pneumoniae*의 생육, 항생제 민감성과 내성, β -lactamase 생성, 생물막 형성 및 efflux pump 관련 유전자 발현의 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에서 사용된 균주인 *K. pneumoniae* ATCC 23357은 미국 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. 균주는 -70°C에서 보관하였고, 실험 시 trypticase soy broth (TSB; Becton, Dickinson and Company [BD])에 37°C, 180 rpm 조건에서 20시간 진탕배양 후 계대배양하여 사용하였다.

최소억제농도의 측정

본 실험에서 사용한 항생제는 강력한 항생제로 알려진

fluoroquinolone계와 carbapenem계를 대표하는 ciprofloxacin과 meropenem로 선정하였다. 실험 균주의 ciprofloxacin, meropenem (Sigma Chemical Co.)에 대한 감수성 정도를 확인하기 위하여 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하였다. MIC는 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인을 약간 수정하여 실행하였고, 결과를 판독하였다. 각 항생제의 stock solution은 최종 농도 10.24 mg/ml가 되도록 제작하였고, MIC의 측정을 위하여 증류수에 적절하게 희석 후 96-well microtiter plates (BD Falcon)의 첫 번째 well에 200 μ l 분주 후 단계희석법을 이용하여 1/2씩 희석하였다. 희석된 항균제가 분주된 96-well microtiter plates에 2배 농도의 TSB (2XTSB)에 접종된 *K. pneumoniae*를 최종 농도가 약 1×10^5 CFU/ml가 되도록 접종하였고, 37°C에서 18시간 배양하였다. 각 항균제의 MIC는 최고 농도 1,024 μ g/ml에서 최저 농도 0.015625 μ g/ml까지의 다양한 범위에서 확인하였고, 실험 균주의 증식이 확인되지 않은 항균제의 농도를 MIC로 결정하였다.

실험 설계

Ciprofloxacin과 meropenem의 순차적 노출에 대한 실험 조건은 Table 1과 같다. 대조군(treatment 1; TSB)과 실험군(treatment 2, 3, 4, 5, 6; 항생제가 포함된 TSB)에 최종 농도가 1×10^5 CFU/ml가 되도록 *K. pneumoniae*를 접종한 후 24-well microtiter plate (BD Falcon)의 각 well에 대조군과 실험군을 1 ml씩 분주하였다. 37°C 조건에서 8시간 진탕배양 후 항생제 순차적 처리 실험군(treatment 4, 5, 그리고 6)의 항생제 교체를 위하여 각 well의 상층액을 피펫을 이용하여 멸균된 1.5 ml micro tube에 옮긴 후 기존 항균제의 제거를 위해 원심분리하여 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 여분의 PBS를 제거하고 각

Table 1. Sequential antibiotic treatments used in this study

Treatment ^a	Antibiotic addition (h)			Abbreviation
	0	8	16	
1	No	No	No	CON
2	1/2 MIC ciprofloxacin	No	No	1/2CIP
3	2 MIC ciprofloxacin	No	No	2CIP
4	1/2 MIC ciprofloxacin	1/2 MIC meropenem	2 MIC ciprofloxacin	1/2CIP-1/2MER-2CIP
5	1/2 MIC ciprofloxacin	1/2 MIC meropenem	2 MIC meropenem	1/2CIP-1/2MER-2MER
6	1/2 MIC ciprofloxacin	2 MIC ciprofloxacin	2 MIC meropenem	1/2CIP-2CIP-2MER

^a Treatments include control (CON; no addition), 1/2 MIC ciprofloxacin addition (1/2CIP), 2 MIC ciprofloxacin addition (2CIP), initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 1/2 MIC meropenem (8 h-incubation) and 2 MIC ciprofloxacin (16 h-incubation) (1/2CIP-1/2MER-2CIP), initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 1/2 MIC meropenem (8 h-incubation) and 2 MIC meropenem (16 h-incubation) (1/2CIP-1/2MER-2MER), and initial 1/2 MIC ciprofloxacin addition followed by 2 MIC ciprofloxacin (8 h-incubation) and 2 MIC meropenem (16 h-incubation) (1/2CIP-2CIP-2MER).

실험군별 항생제(treatment 4, 1/2 MIC meropenem; treatment 5, 1/2 MIC meropenem; treatment 6, 2 MIC ciprofloxacin)를 1 ml씩 분주하여 현탁시킨 후 기존의 24-well microtiter plate에 다시 분주하였다. 다시 8시간 배양 후 위의 방법과 마찬가지로 세척하고, 순차적 처리 실험군별 항생제(treatment 4, 2 MIC ciprofloxacin; treatment 5, 2 MIC meropenem; treatment 6, 2 MIC meropenem)를 1 ml 분주하여 현탁하고, 기존의 24-well microtiter plate에 다시 분주하였다. 이 후 8시간 배양하여 최종적으로 24시간 배양하였다. 실험이 진행된 24-well microtiter plate의 모든 well은 동일한 실험 조건 형성 및 교체 항생제의 영향(항생제 순차적 처리 실험군)을 최소화 하기 위하여 항생제 교체 시점(8, 16시간)에 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 위와 같은 조건으로 실험을 진행하여 *K. pneumoniae*의 생육, 생물막 형성, 항생제 감수성, β -lactamase 활성, 유전자 발현 변화를 관찰하였다.

항생제 노출에 따른 *K. pneumoniae*의 생육 변화

실험 군주의 생육 변화는 광학밀도(Optical Density, OD)와 집락형성능을 측정하여 나타냈다. 시간별 생육 변화를 관찰하기 위하여 0시간부터 24시간까지 4시간 간격으로 microplate reader (ELx800, BioTek)를 이용하여 600 nm (OD_{600})에서의 광학밀도를 측정, 부유 세균의 생육을 확인하였다. 최종 배양 후의 생육 변화를 관찰하기 위하여 24시간 배양된 대조군 및 실험군의 상층액을 취한 후 PBS를 이용하여 단계적으로 희석하고(1:10), Autoplate Spiral Plating System (Spiral Biotech Inc.)을 이용하여 trypticase soy agar (TSA; Becton, Dickinson and Company [BD])에 도말하였다. 도말된 각 TSA들은 37°C에서 24시간 배양 후 QCount Colony Counter (Spiral Biotech Inc.)를 이용하여 집락의 개수를 측정하였다. 측정된 집락의 개수를 생물막 형성 세균과 비교하였다.

생물막 형성능 측정

대조군 및 실험군의 생물막 형성능을 확인하기 위하여 생물막 형성균(biofilm cell)을 관찰하였다. 24시간 배양된 대조군 및 각 실험군의 planktonic cell (부유균) 및 약하게 부착된 세균들의 제거를 위하여 각 well을 PBS로 3회 세척 후, 1 ml의 PBS를 각 well에 넣고 cell scraper (SPL Life Science)를 이용하여 생물막 및 생물막 형성균들을 well의 표면에서 제거하여 생물막 형성균 용액을 얻었다. 여기서 얻어진 생물막 형성균 용액을 PBS를 이용하여 단계적으로 희석하고(1:10), Autoplate Spiral Plating System을 이용하여 TSA에 도말하였다. 도말된

각 TSA들은 37°C에서 24시간 배양 후 QCount Colony Counter를 이용하여 집락의 개수를 측정하였다. 여기서 측정된 집락의 개수를 생물막 형성 능력으로 제시하였다.

Disk diffusion assay

본 실험에서 사용한 항균제와 같은 계열의 항균제에 대한 항균제 내성 변화를 알아보기 위하여 disk diffusion assay를 실시하였다. 24시간 배양된 대조군 및 각 실험군들의 상층액(planktonic cell, 부유균)을 취하고, 남아있는 항균제의 제거를 위하여 PBS로 3회 세척하였다. 세척된 부유균을 PBS에 현탁하고, 멸균된 면봉을 이용하여 TSA에 도말 후 piperacillin (100 μ g), cefotaxime (30 μ g), imipenem (10 μ g), nalidixic acid (30 μ g), norfloxacin (10 μ g), levofloxacin (5 μ g)이 각각 함유된 항균제 disk를 표면에 부착시켜 37°C에서 18시간 배양 후 투명한 직경을 측정하였다. 본 실험은 CLSI 가이드라인을 약간 수정하여 진행하였고, 결과를 판정하였다.

β -Lactamase 활성 측정

각 처리군의 β -lactamase 활성은 Biovision사의 β -Lactamase Activity Colorimetric Assay Kit을 이용하여 측정하였다. 24시간 배양된 각 처리군을 10,000 \times g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 분리하여 β L assay buffer를 이용해 1/4 희석하였다. 각 희석액에 nitrocefin 2 μ l을 처리한 후 microplate reader를 이용하여 515 nm에서 30분 동안 5분 간격으로 흡광도(Absorbance, A_{515})를 측정하였다.

유전자 발현 측정

각 처리군의 RNA는 QIAGEN사의 RNeasy Mini Kit를 이용하여 분리하였다. 항생제 내성 관련 유전자로 beta lactamase gene (*blaSHV-11*, *blaSPM*), efflux pump gene (*acrA*, *acrB*, *marA*, *ramA*, *ompK35*), quinolone resistance gene (*qnrS1*), RNA polymerase subunit beta gene (*rpoB*)을 목적 유전자로 사용하였다. Reference gene으로는 16S rRNA 유전자를 사용하였으며, 각 유전자를 증폭시키기 위한 primer 염기서열은 Table 2에 나타내었다. 추출된 RNA는 정량 후 nuclease free water를 이용하여 모두 같은 농도로 희석하고 QIAGEN사의 QuantiTect Reverse Transcription Kit를 사용하여 cDNA로 합성하였다. qRT-PCR 반응은 2XQuantiTect SYBR Green PCR Master mix (Qiagen) 10 μ l, cDNA 2 μ l, primer 각 2 μ l 및 RNase free water를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만든 후 각 반응액을 iCycler iQTM system (Bio-Rad Laboratories)를 이용해

Table 2. Primer sequences used in qPCR analysis for *K. pneumoniae*

Gene	Molecular function	Primer sequence ^a
16S rRNA	Reference gene	F: GGACGGGTGAGTAATGTC R: TCTCAGACCAGCTAGGGATCG
<i>marA</i>	Transcriptional activator (acrAB expression)	F: GAATGGCCGGTCTCTTTCTT R: CCTGTCGCTGGAAAAAGTGT
<i>soxS</i>	Transcriptional activator (acrAB expression)	F: GCAGGCGGCGCTGGCGAATA R: AGTCGCCAGAAAAGTCAGGAT
<i>ramA</i>	Inducing expression of acrAB and tolC	F: GCATCAACCGCTGCGTATT R: CGTTGCAGATGCCATTTCG
<i>acrA</i>	Multidrug efflux pump	F: ATGTGACGATAAACCGGCTC R: CTGGCAGTTCGGTGGTTATT
<i>acrB</i>	Multidrug efflux pump	F: CGATAACCTGATGTACATGTCC R: CCGACAACCATCAGGAAGCT
<i>ompK35</i>	Outer membrane protein (porin)	F: TGATCCCTGCCCTGCTGGT R: TCCATGTTGTATTCCCCTGG
<i>blaSHV-11</i>	Expanded-spectrum beta lactamase	F: ATTTGCTGATTTTCGCTCGGC R: CCTGCTTGCCCGAATAACA
<i>blaSPM</i>	Metallo beta lactamase	F: CTGCTTGATTTCATGGGCGC R: CCTTTCCGCGACCTTGATC
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Aminoglycoside/quinolone resistance	F: CGGTGGGAAGAAGAAACCGA R: CTTGGTCCCAAGCCTTTGC
<i>qnrS1</i>	Quinolone-resistance protein	F: CGAAGGCTGCCACTTTGATG R: GTTCGGGAAAAGTTGGCACC

^a F, forward; R, reverse.

95°C에서 15분간 반응시키고 94°C에서 15초, 59°C에서 20초로 45회 반복 반응시킨 후, 55°C에서 10초로 81회 반복반응시켰다. 최종적인 결과분석은 항생제가 처리되지 않은 균의 유전자 Ct값을 기준으로 각 처리균의 목적 유전자들의 상대적 발현량을 분석하였다. 합성된 cDNA를 단계적으로 희석하여 검량선을 작성하여 PCR 증폭효율을 평가하고 증폭산물은 0.2°C 간격으로 95°C까지 상승에 따른 용해 곡선 분석을 수행하였다.

통계분석

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며, 유전자 발현 분석은 well 간의 variation을 최소화하기 위해 각 유전자를 4개의 well에 처리하였다. 결과들은 통계적 분석을 위해 SAS program의 General Linear Model (GLM) procedure를 이용하여 처리군들의 비교를 95% 유의수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

항생제에 노출된 *K. pneumoniae*의 생육 변화

항생제의 순차적 노출에 의한 *K. pneumoniae*의 생육 변화

는 Fig. 1과 같다. 2CIP 처리균을 제외한 모든 처리균에서 배양 4시간 이후에 생장이 관찰되었으며, 항생제 처리 없이 배양한 대조군(CON)의 생장은 8시간 이후 OD₆₀₀값이 약 1.2로 최대치에 가까운 결과를 보여 배양 24시간까지 일정하게 유지됐다. 1/2CIP 처리균은 가장 낮은 성장 정도를 보였고, 8시간 이후 성장률이 감소하기 시작하여 12시간 이후 크게 감소하였다. 1/2CIP-1/2MER-2CIP 처리균의 경우 배양 16시간 때에 최소억제농도(MIC) 2배의 농도로 ciprofloxacin을 처리하여도 생장이 저해되지 않고 24시간까지 계속하여 증가한 반면, 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리균의 경우 두 번째 항생제 처리에도 생장의 변화를 보이지 않았다. 1/2CIP-2CIP-2MER 처리균에서만 두 번째 항생제를 처리한 배양 16시간 이후 생장이 완만하게 감소하였다. 1/2CIP 처리균을 제외한 나머지 처리균들은 12시간 이후 대조군과 같은 정도의 성장을 보이기 시작했으며, 배양 24시간 때에는 대조군보다 높은 성장을 보였다. 2CIP 처리균의 경우 배양 24시간 동안 생장이 관찰되지 않았다. 순차적으로 항생제에 노출시킨(1/2CIP-1/2MER-2CIP 1/2CIP-1/2MER-2MER, 1/2CIP-2CIP-2MER) *K. pneumoniae*의 생육은 16시간 이후 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 *K. pneumoniae*가 이미 1차 1/2CIP 노출 항생제 적응을 나타내고, 이에 따라 교차내성을 획득한 것으로 추정된다(Shannon

and Phillips, 1986; Chen et al., 2009). 1차 항생제 노출 이후 치사농도의 ciprofloxacin 혹은 meropenem의 처리가 *K. pneumoniae*의 생육을 억제하지 못하였는데, 이는 치사 농도 이하인 1/2MIC 항생제의 1차 노출로 인하여 항생제에 대한 내성을 쉽게 획득하기 때문인 것으로 사료된다(Gutierrez et al., 2013).

생물막 형성능 변화

*K. pneumoniae*의 생물막 형성 양상은 균의 생육 변화와 같은 방법으로 배양하여 부유균(planktonic cell)과 생물막 형성균(biofilm cell)으로 구분하여 관찰하였다(Fig. 2). 대조군(CON)의 생물막 형성은 6.96 log CFU/ml로 다른 처리군들과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군은 6.92 log CFU/ml로 생물막을 형성하였다. 1/2CIP, 1/2CIP1/2MER-2CIP, 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리군은 각각 7.43, 7.23, 7.50 log CFU/ml의 생물막을 형성하였다. 부유균은 대조군(CON)이 10.09 log CFU/ml로 가장 높았고, 이어서 1/2CIP와 1/2CIP-1/2MER-2MER가 각각 9.55, 9.59 log CFU/ml로 비슷한 수준의 부유균이 측정되었고, 1/2CIP-1/2MER-2CIP, 1/2CIP2CIP-2MER는 각각 8.42 log CFU/ml과 7.84 log CFU/ml의 부유균이 측정되었다. 2CIP 처리군은 부유균과 생물막 형성균 모두 관찰되지 않았다. 생물막 형성은 세균이 외부의 자극에 대해 스스로를 보호할 수 있는 일종의 방어 체계

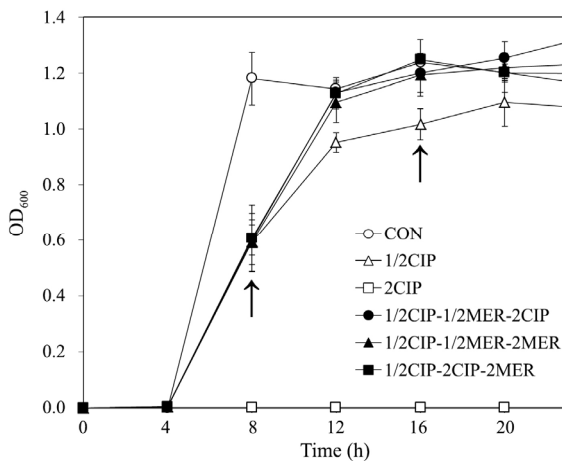


Fig. 1. Survival of *Klebsiella pneumoniae* exposed to sequential antibiotics (no antibiotic addition, CON; 1/2XMIC ciprofloxacin, 1/2CIP; 2XMIC ciprofloxacin addition, 2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC ciprofloxacin at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2MER; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 2XMIC ciprofloxacin at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP2CIP-2MER). Arrow indicates the time points for the addition of antibiotics at 8 and 16 h.

이다(Penesyan et al., 2015). 따라서 본 실험에서 노출된 항생제는 부유균에 상대적으로 민감하였고 생물막 형성은 처리군에 따라 큰 유의성을 보이지 않았다. 생물막 형성은 세균이 항생제에 대해 생존할 수 있게 하기 때문에 부유균만 항생제에 영향을 받은 것으로 보이며(Mulcahy et al., 2008), 생육 변화(Fig. 1)에서도 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군 곡선이 배양 16 시간 이후 미세하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 2CIP 처리군은 배양 시작부터 ciprofloxacin을 치사(>MIC) 농도로 처리하여 효과가 강력했기 때문에 부유균과 생물막 형성균 자체가 성장할 수 없었던 것으로 사료된다.

돌연변이 발현 빈도

돌연변이 발현 빈도는 최소억제농도(MIC)와 MIC 2배 농도의 ciprofloxacin을 함유하는 TSA 배지를 이용하여 관찰하였다(Table 3). 최소억제농도의 ciprofloxacin TSA 배지에서 대조군(CON)의 돌연변이 발현 빈도는 37.69%로 다른 처리군에 비해 높았다. 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군에서 36.91%의 발현 빈도를 보였고, 1/2CIP, 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리군 순으로 각각 35.35%, 26.96%의 발현 빈도를 보였다. 1/2CIP-1/2MER-2CIP 처리군은 최소억제농도의 ciprofloxacin 배지에서 가장 낮은 14.39%의 발현 빈도를 보였다. 2CIP 처리군은 돌연변이 발현 빈도를 관찰할 수 없었다. 최소억제농도 2배의 ciprofloxacin TSA 배지에서 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군이

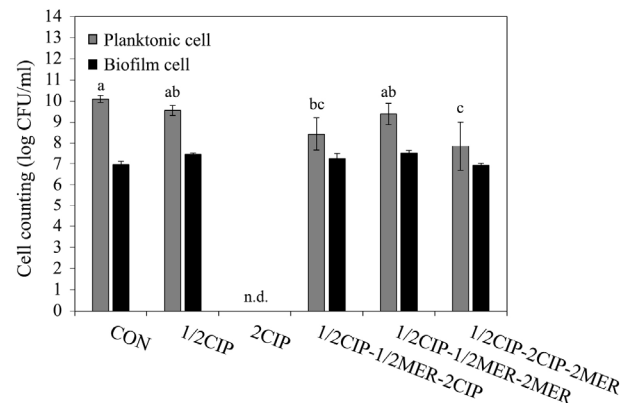


Fig. 2. The number of *Klebsiella pneumoniae* planktonic and biofilm cells after exposure to sequential antibiotics (no antibiotic addition, CON; 1/2XMIC ciprofloxacin, 1/2CIP; 2XMIC ciprofloxacin addition, 2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC ciprofloxacin at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2MER; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 2XMIC ciprofloxacin at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP2CIP-2MER). Different lowercases (a-c) on the bars within treatments are significantly different at $P < 0.05$.

5.49%의 돌연변이 발현 빈도를 보였고, 나머지 처리군들의 돌연변이 발현 빈도는 관찰할 수 없었다. 반치사(sub-lethal) 농도의 항생제에 노출된 균들은 SOS 반응 유도과 관련된 돌연변이 유발이 증가될 수 있다고 보고되었고(López and Blázquez, 2009), 반치사 농도와 돌연변이 유발간의 관계에 대한 연구에서 반치사 농도의 살균 항생제(bactericidal antibiotic)에 노출된 *E. coli*가 스트레스-반응 시그마 팩터 RpoS의 발현이 유도되어 돌연변이 유발 증가가 보고되었다(Gutierrez *et al.*, 2013). 위의 연구결과들에 비추어 볼 때 대조군과 1/2CIP 처리군이 반치사 농도의 항생제에 노출 되었을 때 SOS 반응 등이 유도되어 돌연변이 유발이 증가되었기 때문으로 사료된다. 돌연변이 유발은 두 가지 형태로 나타날 수 있는데, 하나는 항생제에 노출이 되어도 생존할 수 있는 저항성균(tolerance)과 다양한 분자적 기작에 의해 항생제의 효과를 감소시키고 높은 농도의 항생제를 필요로 하는 내성균(resistance)이다(Tuomanen *et al.*, 1986). 1/2CIP-1/2MER- 2CIP, 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리군의 경우 순차적으로 항생제에 노출되는 과정에서 많은 수의 저항성 균주(tolerance)가 살아남지 못한 것으로 보이며, 특히 2 MIC ciprofloxacin과 2 MIC meropenem의 처리에도 균들이 살아 남아 돌연변이 발현 빈도를 관찰했으므로, 이 경우 저항성균 보다는 내성 균으로 보여진다. 1/2CIP-2CIP2MER 처리군은 같은 항생제의 농도가 1/2 MIC에서 2 MIC로 단계적으로

증가하여 유도된 내성균으로 사료된다. 본 결과는 순차적 항생제 처방 시 농도와 순서가 다양한 계열의 항생제에 대한 2차적 내성을 유도하는데 중요한 요소로 작용됨을 제시한다.

Disk diffusion assay

Nalidixic acid, norfloxacin, levofloxacin, piperacillin, cefotaxime, imipenem에 대한 ciprofloxacin과 meropenem에 노출된 *K. pneumoniae*의 항생제 감수성 결과는 Table 4와 같다. 사용된 항생제에 대한 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인의 내성 판단기준을 참고하여 Susceptible (S), Intermediate (I), Resistant (R)으로 내성수준을 분류하였다. 모든 처리군에서 piperacillin과 nalidixic acid의 감수성이 감소한 것을 관찰하였으며, 특히 1/2CIP-2CIP-2MER에서 piperacillin과 nalidixic acid의 투명환은 각각 18 mm (I)과 13 mm (R)으로 대조군[21 mm (S), 20 mm (S)]과 비교하였을 때 가장 크게 감소하였다. 또한 cefotaxime의 투명환이 1/2CIP-1/2CIP-2MER과 1/2CIP-2CIP2MER에서 5 mm 이상 감소하여 intermediate (I)으로 내성수준이 높아진 것을 확인하였다. 단일 항생제 처리군(1/2CIP)보다는, 높은 농도의 항생제를 순차적으로 처리하였을 때(1/2CIP2CIP-2MER) β-lactam계 항생제(piperacillin, cefotaxime, imipenem)뿐만 아니라 quinolone계 항생제(nalidixic acid, norfloxacin, levofloxacin)

Table 3. Resistance frequency (%) of *K. pneumoniae* exposed to sequential antibiotic treatments

Treatment	Agar plate containing ciprofloxacin	
	1 × MIC	2 × MIC
CON	37.69 ^a	n.d.
1/2CIP	35.35 ^a	n.d.
2CIP	n.d.	n.d.
1/2CIP-1/2MER-2CIP	14.39 ^c	n.d.
1/2CIP-1/2MER-2MER	26.96 ^b	n.d.
1/2CIP-2CIP-2MER	36.91 ^a	5.49

^{a-c} Different letters are significantly different at *p*<0.05.
n.d. indicates not detected.

Table 4. Antibiotic disk diffusion (mm) of *K. pneumoniae* exposed to sequential antibiotic treatments

Treatment	Antibiotic disk					
	Piperacillin	Cefotaxime	Imipenem	Nalidixic acid	Norfloxacin	Levofloxacin
CON	21 (S)	30 (S)	28 (S)	19 (S)	21 (S)	22 (S)
1/2CIP	19 (I)	27 (S)	24 (S)	16 (I)	20 (S)	22 (S)
1/2CIP-1/2MER-2CIP	21 (S)	30 (S)	27 (S)	13 (R)	20 (S)	23 (S)
1/2CIP-1/2MER-2MER	20 (S)	25 (I)	25 (S)	17 (I)	20 (S)	21 (S)
1/2CIP-2CIP-2MER	18 (I)	25 (I)	24 (S)	13 (R)	17 (S)	19 (S)

S, I, and R indicate susceptible, intermediate, and resistant strain, respectively.

에 대한 감수성을 감소시켰다. 이는 단일 항생제보다 복합적인 항생제 처리가 더 높은 수준의 내성을 발생시킨다는 것을 확인한 연구와 유사한 결과를 보여준다(Vestergaard *et al.*, 2016). 또한 ciprofloxacin은 노출되는 시간에 따라 활성이 나타나는 β -lactam이나 carbapenem과 달리 높은 농도에서 활성을 보이는 농도 의존적 항생제로서, 본 연구에서 ciprofloxacin의 순차적인 처리(1/2CIP-2CIP-2MER)는 항생제 내성을 발생시키는 데 충분할 것이라고 뒷받침할 수 있다(Williamson and Tomasz, 1985; Jacobs, 2001).

Beta-lactamase assay

Nitrocefin의 가수분해를 통한 비색법으로 대조군 및 처리군의 β -lactamase 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 본 실험에서 사용한 *K. pneumoniae* ATCC 23357은 항생제가 처리되지 않은 대조군에서 11.93 nmol/min/ml의 β -lactamase 활성이 나타났으며, quinolone계 항생제인 ciprofloxacin 처리군의 lactamase 활성은 대조군과 비슷한 수준을 나타낸 반면 β -lactam계 항생제인 meropenem 처리군의 활성은 대조군에 비해 매우 감소한 것을 확인하였다. 반대로 1/2CIP-1/2MER-2CIP의 β -lactamase 활성은 20.49 nmol/min/ml로 다른 처리군들에 비해 가장 높게 측정되었다. Ciprofloxacin 단일 항생제 처리군(1/2CIP)의 β -lactamase 활성이 증가하는 현상은 β -

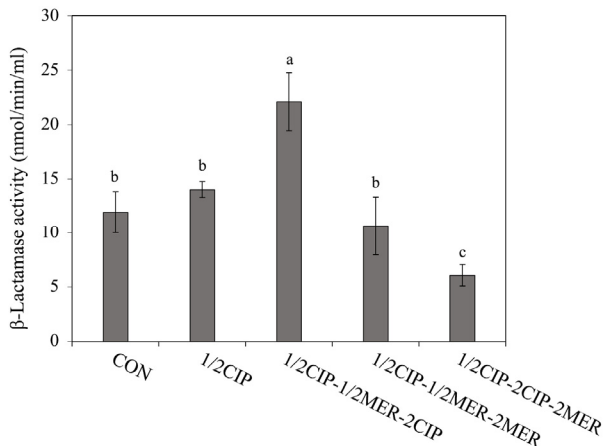


Fig. 3. Hydrolyzing activity of β -lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* exposed to sequential antibiotics (no antibiotic addition, CON; 1/2XMIC ciprofloxacin, 1/2CIP; 2XMIC ciprofloxacin addition, 2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC ciprofloxacin at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2CIP, 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2MER; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 2XMIC ciprofloxacin at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-2CIP-2MER). Different lowercases (a-c) on the bars within treatments are significantly different at $P < 0.05$.

lactamase의 활성이 연관되지 않은 계열의 항생제 내성에 영향을 줄 수 있음을 시사하며(Tolun *et al.*, 2004), 1/2CIP-1/2MER-2CIP 처리군은 가장 높은 β -actamase 활성(20.49 nmol/min/ml)을 보이고, 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군에서 가장 낮은 활성(6.08 nmol/min/ml)을 보인 것과 달리 β -lactam계 항생제의 감수성의 결과가 반대로 나타나는 것(Table 4)은 β -lactam계 항생제에 대한 내성이 β -lactamase의 생성 이외에도 porin channel을 통한 항생제 투과 감소, efflux pump의 활성 등 다양한 기작으로 나타날 수 있기 때문으로 사료된다(Poole, 2004; Pages *et al.*, 2009).

유전자 발현 변화

Fig. 4는 순차적 항생제 노출에 따른 β -lactamase genes (*blaSHV11*, *blaSPM*), efflux pump genes (*acrA*, *acrB*, *marA*, *ramA*, *ompK35*), quinolone resistance genes (*qnrS1*), RNA polymerase subunit beta gene (*rpoB*)의 상대적 발현량 변화를 qRT-PCR을 통해 확인한 결과이다. 유전자 *blaSPM*, *qnrS1*, *marA*의 발현이 모든 처리군에서 각각 2, 3, 5-fold 이상 감소하였으며, *soxS* 또한 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리군에서 소폭으로 감소하는 경향을 보였다. 1/2CIP 처리군의 경우에는 *ramA*가 2.39-fold 증가하였으며, 1/2CIP-1/2MER-2MER 처리군의 경우 *blaSHV*, *acrA*, *ramA*, *rpoB*의 발현이 각각 2.81, 3.27, 3.61, 2.35-fold로 증가하여 처리군 중에서 가장 많은 중

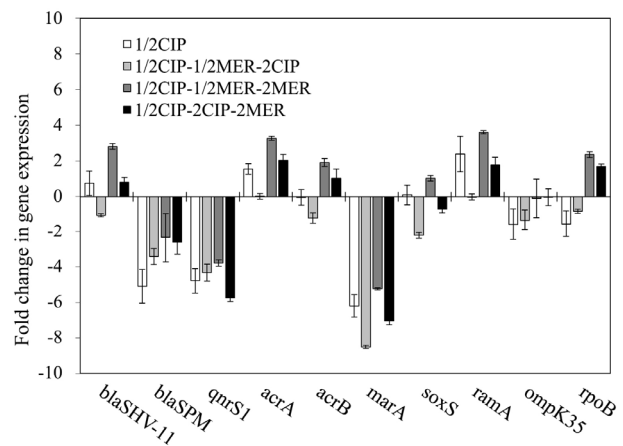


Fig. 4. Relative gene expression of *Klebsiella pneumoniae* exposed to sequential antibiotics (no antibiotic addition, CON; 1/2XMIC ciprofloxacin, 1/2CIP; 2XMIC ciprofloxacin addition, 2CIP; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC ciprofloxacin at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2CIP, 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 1/2XMIC meropenem at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-1/2MER-2MER; 1/2XMIC ciprofloxacin addition at 0 h, 2XMIC ciprofloxacin at 8 h, and 2XMIC meropenem at 16 h, 1/2CIP-2CIP-2MER).

류의 유전자 발현 변화를 보였다. 반면 1/2CIP-1/2MER-2CIP 처리군의 경우에는 *blaSPM*, *qnrS1*, *marA*를 제외한 나머지 유전자의 발현량 변화가 거의 나타나지 않은 것을 확인하였다. 모든 처리군에서 β -lactamase 유전자(*blaSHV11*, *blaSPM*)와 quinolone 내성 유전자(*qnrS1*)의 발현 감소는 앞서 확인한 β -lactamase 활성과 quinolone 항생제 감수성의 결과와 상반되는 결과를 보여준다. 이는 항생제에 대한 내성은 표현형과 유전형에 차이가 있을 수 있으며(Baran and Aksu, 2016), 본 연구에서 확인한 SHV/SPM type β -lactamase 외에 Class A (TEM-1, CTX-M, KPC), Class B (metallo- β -lactamase), Class C (AmpC- β -lactamase), and Class D (OXA- β -lactamase) 등의 다른 type의 β -lactamase가 β -lactamase 활성에 영향을 미칠 수 있다고 설명할 수 있다(Shaikh *et al.*, 2015). 1/2CIP-1/2MER2MER 처리군과 1/2CIP-2CIP-2MER 처리군에서 가장 많은 유전자 발현 변화가 관찰되었고, 그 중 efflux pump 유전자인 *acrA*과 *ramA*의 발현이 다른 처리군에 비해 가장 많이 증가하였다. AcrAB는 RND family efflux pump로서 ciprofloxacin을 포함한 넓은 범위의 기질특이성을 가지고 있으며(Pakzad *et al.*, 2013), *ramA*, *marA*, *soxS* 등에 의해 발현이 조절된다(George *et al.*, 1995). 이로써 유전적 내성 평가를 통해 단일 항생제 처리(1/2CIP, 1/2MER)보다 복합적인 항생제의 순차적인 노출이 항생제 내성 유전자 발현에 영향이 큰 것을 확인하였다.

적 요

항균제에 대한 내성 증가는 국내뿐만 아니라 세계적으로도 인류 건강에 큰 논란이 되고 있다. 박테리아에 의한 감염을 치료하기 위해 같은 혹은 다른 계열의 항생제에 순차적으로 노출된다. 따라서, 본 연구는 ciprofloxacin과 meropenem의 순차적 처리에 따른 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)의 생육, 항생제 민감성, 돌연변이 빈도, β -lactamase activity, 생물막 형성 및 내성 관련 유전자 발현을 평가하기 위해 설계되었다. 처리군은 대조군(control; CON), 1/2 MIC ciprofloxacin (1/2CIP), 2 MIC ciprofloxacin (2CIP), 1/2 MIC ciprofloxacin+1/2 MIC meropenem+2 MIC ciprofloxacin (1/2CIP-1/2MEM-2CIP), 1/2 MIC ciprofloxacin+1/2 MIC meropenem+2 MIC meropenem (1/2CIP-1/2MEM-2MEM), 1/2 MIC ciprofloxacin+2 MIC ciprofloxacin+2 MIC meropenem (1/2CIP-2CIP-2MEM)을 포함한다. 24시간의 배양 동안 2CIP 처리군에서 *K. pneumoniae*의 생육이 관찰되지 않았다. 모든 처리군에서 planktonic cell의 수는 7에서 10 log CFU/ml의 유의적인 차이를 보였으나

biofilm cell의 수는 7 log CFU/ml로 비슷하였다. 돌연변이 빈도는 1/2CIP-1/2MEM-2CIP에서 가장 낮은 14%을 보였다. 대조군과 비교하여 1/2CIP-2CIP-2MEM 처리 *K. pneumoniae*는 piperacillin, cefotaxime, nalidixic에 대한 민감도가 감소되었다. 1/2CIP-1/2MEM-2CIPrK 가장 높은 β -lactamase activity (22 nmol/min/ml)을 보인 반면 1/2CIP-2CIP-2MEM은 가장 낮은 β -lactamase activity (6 nmol/min/ml)을 보였다. Multidrug efflux pump 관련 유전자(*acrA*, *acrB*, and *ramA*)의 발현은 1/2CIP-1/2MER-2MER and 1/2CIP2CIP-2MER 처리된 *K. pneumoniae*에서 2배 이상 증가하였다. 따라서 순차적 항생제의 처리는 *K. pneumoniae*의 항생제 내성 양상을 변화시킬 수 있다.

감사의 말

본 연구는 한국연구재단 지역대학우수과학자지원사업(NRF2016R1D1A3B01008304)의 연구비로 수행되었음.

References

- Baran, I. and Aksu, N. 2016. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **15**, 20.
- Chen, L.X., He, S., Li, C., and Ryu, J. 2009. Sublethal kanamycin induced cross resistance to functionally and structurally unrelated antibiotics. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* **13**, 53-57.
- Drago, L., Nicola, L., Mattina, R., and De Vecchi, E. 2010. *In vitro* selection of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. at *in vivo* fluoroquinolone concentrations. *BMC Microbiol.* **10**, 119.
- Du, J., Li, P., Liu, H., Lü, D., Liang, H., and Dou, Y. 2014. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a University teaching hospital, China. *PLoS ONE* **9**, e95181.
- George, A.M., Hall, R.M., and Stokes, H.W. 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**, 1909-1920.
- Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., *et al.* 2013. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat. Commun.* **4**, 1610.
- Jacobs, M.R. 2001. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin. Microbiol.*

- Infect.* **7**, 589–596.
- Latifpour, M., Gholipour, A., and Damavandi, M.S.** 2016. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. *Jundishapur J. Microbiol.* **9**, e31179.
- López, E. and Blázquez, J.** 2009. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **53**, 3411–3415.
- Mulcahy, H., Charon-Mazenod, L., and Lewenza, S.** 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* **4**, e1000213.
- Nichol, D., Jeavons, P., Fletcher, A.G., Bonomo, R.A., Maini, P.K., Paul, J.L., Gatenby, R.A., Anderson, A.R.A., and Scott, J.G.** 2015. Steering evolution with sequential therapy to prevent the emergence of bacterial antibiotic resistance. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004493.
- Pages, J.M., Lavigne, J.P., Leflon-Guibout, V., Marcon, E., Bert, F., Noussair, L., and Nicolas-Chanoine, M.H.** 2009. Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE* **4**, e4817.
- Pakzad, L., Karin, M.Z., Taherikalani, M., Boustanshenas, M., and Lari, A.R.** 2013. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS Hyg. Infect. Control* **8**, 1–6.
- Penesyan, A., Gillings, M., and Paulsen, I.** 2015. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules* **20**, 5286–5298.
- Perron, G.G., Kryazhimskiy, S., Rice, D.P., and Buckling, A.** 2012. Multidrug therapy and evolution of antibiotic resistance: When order matters. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6137–6142.
- Poole, K.** 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2200–2223.
- Rice, L.B., Yao, J.D.C., Klimm, K., Eliopoulos, G.M., and Moellering, R.C.** 1991. Efficacy of different β -lactams against an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **35**, 1243–1244.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M.D., and Kamal, M.A.** 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum β -lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* **22**, 90–101.
- Shannon, K. and Phillips, I.** 1986. The effects on β -lactam susceptibility of phenotypic induction and genotypic derepression of β -lactamase synthesis. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**, 15–22.
- Tolun, V., Küçükbasmaci, Ö., Törümküney-Akbulut, D., Çatal, Ç., Anđ-Küçüker, M., and Auđ, Ö.** 2004. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 72–75.
- Tuomanen, E., Durack, D.T., and Tomasz, A.** 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **30**, 521–527.
- Vestergaard, M., Paulander, W., Marvig, R.L., Clasen, J., Jochumsen, N., Molin, S., Jelsbak, L., Ingmer, H., and Folkesson, A.** 2016. Antibiotic combination therapy can select for broad-spectrum multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agent* **47**, 48–55.
- Warren, D.K., Hill, H.A., Merz, L.R., Kollef, M.H., Hayden, M.K., Fraser, V.J., and Fridkin, S.K.** 2004. Cycling empirical antimicrobial agents to prevent emergence of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria among intensive care unit patients. *Crit. Care Med.* **32**, 2450–2456.
- Williamson, R. and Tomasz, A.** 1985. Inhibition of cell wall synthesis and acylation of the penicillin binding proteins during prolonged exposure of growing *Streptococcus pneumoniae* to benzylpenicillin. *Eur. J. Biochem.* **151**, 475–483.
- Zhong, H.Q., Zhang, S., Pan, H., and Cai, T.** 2013. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **14**, 837.