연차실적서

과제번호	2018-NI006-00			
보안등급	☐ 보안과제 ☑ 일반과제		연구결과 공개	☑ 가 ☐ 부
연구개발단계	☑ 기초 ☐ 응용 ☐ 개발		※ 응용 및 개발단계 해당, 공지된 기술 및 지식재산권 존재여부 확인 ☐ 유 ☐ 무	
연구단명	※ 연구단의 경우 기재			
연구과제명	국 문: DNA aptamer를 이용한 colistin 내성균 신속진단법 개발			
	영 문: Development of rapid diagnosis method of colistin resistant bacteria using DNA aptamer			
연구책임자	성 명	김 정 욱	과학기술인 등록번호	11369316
	소 속	약제내성과	직급(직위)	보건연구사
연구기간	총 연구기간 (3년)	2018.1.1. ~ 2020.12.31.	당해연도 연구기간(1차)	2018.1.1. ~ 2020.12.31
연구비	해당년도	배정 연구비	사용 연구비	연구비 사용비율
	1차년도	200,000천원	116,274천원	58.1%
	2차년도	천원	천원	%
	계	200,000천원	116,274천원	58.1%
예산과목	감염병관리기술개발연구(4800-4845-300)			
심의대상	☐ 생명윤리	☑ 생물안전	☐ 동물실험윤리	

당해연도 연구성과 실적	세부사업 성과지표	측정산식(해당지표)	실적치
	학술대회발표	학술대회발표(국내) 건수	1 건

위와 같이 연차실적서를 제출합니다.

2018 년 11 월 21 일

연구책임자 김 정 욱 서명(인)

질병관리본부장 귀하

단독과제	과제명: DNA aptamer를 이용한 colistin 내성균 신속진단법 개발

제1장 연구수행내용

1. 연구 목표

가. 연구의 목적 및 필요성

1) 항생제 내성 전파의 위험성

○ 내성균의 출현은 기하급수적으로 증가되고 있음에도 불구하고 항생제 발견이나 개발을 위한 노력이 감소하여 의학적으로나 사회적으로 심각한 문제가 되고 있음

○ 또한 1950년부터 그람음성균에 사용된 카바페넴 항생제의 내성균주가 증가하면서 신장질환, 신경계 독성 등 부작용이 심해 흔히 처방되지 않았던 폴리믹신류의 colistin 사용도 점차 증가를 보임

○ 최근에 colistin 내성균이 증가하고있으나 국내에서는 항생제 내성 진단 연구가 활성화 되지 않아 증가하는 항생제 내성균에 비해 신속하고 정확한 진단에 어려움을 느끼고 있음

○ 내성균으로 인한 감염증의 경우 경험적으로 항생제를 처방하는 경우가 많고, 사용하는 항생제가 재기능을 못하게 되면 치료의 관점에서 감염에 의한 증상이 더 악화될 수 있음

○ 따라서 항생제 처방이 필요한 경우를 판단하고, 병원체에 따른 적합한 항생제 처방을 위해서는 빠르고 신속한 진단기술의 개발이 필요함.

2) Colistin 내성 진단의 문제점

○ 환자에서 분리된 병원체를 진단하기 위해 디스크확산법이나 VITEK2 같은 자동화 장비를 사용하고 있는데, 이 경우 오차 범위가 커서 내성일 경우 한천희석법 또는 액체미량 희석법으로 재확인이 필요함

○ 검체에서 병원체 분리 및 내성 진단 까지 시간이 많이 소요(3-5일)되어 임상에서는 경험에 기초하여 항생제를 처방한 후, 결과가 확인되면 처방을 바꾸는 형식을 이용함. 이는 더 복잡한 내성을 초래할 수도 있음

3) 내성균 진단에 유용한 핵산 aptamer

○ 핵산 aptamer 분자의 인식소자로서의 장점 : 핵산 aptamer는 단백질 이외의 당류와 같은 다양한 분자에 대한 인식체로서 발굴될 수 있으며 대상 인자에 대해 항체-항원 결합력과 유사한 또는 더강력한 친화

력 및 특이성을 갖고 있음. 또한 핵산은 유전정보를 함유하고 있으므로 일단 유용 핵산 aptamer가 선택되었으면 그에 상응하는 cDNA vector로부터 빠른 시기에 실험관 내에서 저 비용으로 그리고 매우 순수한 정제 형태로 핵산 분자를 대량 생산할 수 있으며 화학적 합성도 저비용으로 가능함. 또한 핵산 aptamer는 가역적인 denaturation이 가능하여 온도에 덜 민감하므로 오래 보존 가능함. 이에 따른 slide, well 등으로의 방향성 있는 고정화가 용이하여 바이오칩, 센서의 진단용 리간드로서의 장점을 내포하고 있음

○ Colistin 내성의 기전이 공통적으로 세균 외막의 lipid A 변형으로 나타남. 따라서 감수성균과 내성균의 외막을 표적분자로 하여 내성균 외막에 특이적으로 결합하는 aptamer를 발굴함으로써 진단에 활용할 수 있는 기반을 마련하고자 함

나. 연구목표

1) 연구의 최종목표

○ Colistin 내성 세균의 신속진단법 개발을 위한 aptamer 후보 발굴 및 성능 평가, 분석

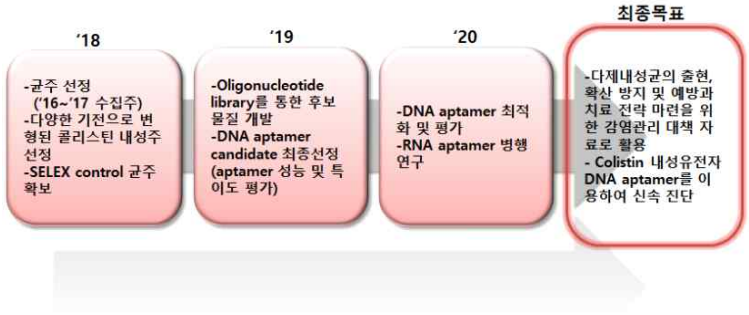
1) 연차별 연구목표

(단위 : 천원)

구 분	연 구 목 표	연 구 비
1차년도 (2018)	○ 균주 선정 - ~'17년 수집된 그람음성균 대상 - *mcr-1* 유전자 포함/미포함 내성균 각 10주 내외 선정 ○ 다양한 기전으로 변형된 colistin 내성주 확인 - Colistin 내성/감수성 균주의 외막(lipid A)추출 - 다양한 외막(lipid A)의 변이 형태 분석	200,000
2차년도 (2019)	○ SELEX 방법을 통한 aptamer 후보물질 발굴 ○ Aptamer candidate의 최종선정 - Colistin 내성주에 반응하는 aptamer 성능 및 유효성(민감도, 특이도) 평가	200,000
3차년도 (2020)	○ Aptamer 최적화 및 평가 - 검체 또는 배양조건의 세균에 직접 적용 가능한 전처리법 평가 - 검체 대상 aptamer의 유효성 평가(민감도, 특이도)	200,000

2. 연구범위 및 수행방법

가. 연구 추진 전략



나. 연구 수행 방법

1) 항생제감수성시험

○ CLSI 지침(2016)에 따라 실시하고 Broth microdilution, E-test 방법을 사용하였으며 균종에 따른 내성 참조균주를 사용하여 검사법을 평가하였음

○ Population assay

대상 균주를 TSA에 배양한 후 0.5 Mcfarland (10^8CFU/㎖)로 측정하여 균주를 10^8~10^1 CFU/㎖까지 단계 희석하였으며, colistin sulfate 0.125~256 ㎎/L가 첨가된 MHA배지에 균주를 100㎕씩 각각 spreading 하여 37℃에 24시간 배양한 후 colony 수를 측정하였음 Standard 균주는 *E. coli* ATCC25922를 사용하였으며, MIC < 2㎍/㎖ 이고, 2 ㎍/㎖이상의 콜리스틴이 포함된 배지에서 20 CFU이상 측정되는 균주를 colistin heteroresistance 균주로 확인하였음

2) Genomic DNA 분리

○ Maxwell 16 cell DNA purification kit (Promega)을 이용하여 그 방법에 따라 분리하였음

3) Multi-locus sequence typing (MLST) * 균종별 정해진 방법에 따라 실시

○ Genomic DNA를 분리하여 7개의 housekeeping gene에 대해서 PCR과 염기서열 분석을 수행하였음. 두가닥의 염기서열을 모두 읽어 MLST DB (http://www.mlst.net)에 있는 데이터와 비교하여 각 유전자의 allelic number를 결정하고 이에 따라 sequence type (ST)을

결정하였음

4) Colistin 내성 유전자 확인

○ *mcr-1* 유전자 확인: 균주의 DNA를 추출하여 PCR 및 sequencing을 통해 확인 (표1)

○ LPS 변형 관련 유전자 변이 확인: 균주의 DNA를 추출하여 PCR 및 sequencing 후 아미노산 변이를 분석하고 감수성 균주와 내성균주의 차이 비교 분석 (표2)

○ PCR조건: 94℃에서 5분간 전 처리 후, 94℃에서 30초간 변성, 56℃에서 1분간 결합, 72℃에서 45초간 중합반응을 30회 반복하고 마지막으로 72℃에서 10분간 연장반응 후 증폭산물을 1.2% agarose gel (SeaKemR LE agarose; FMC Bioproducts)에서 전기영동 확인

표 1. Colistin 내성 유전자 PCR primer sequence

Target genes	Primer name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
mcr-1	mcr-1I For	CAGTGCGCCAAAAGATACCA	784
	mcr-1I Rev	ACCGTTCTCACCCAGACTTT	

표 2. LPS 변형 관련 유전자 PCR primer (*K. pneumoniae*)

Target genes	Primer name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
pmrA	pmrA For	CATTTCCGCGCACTGTCTGC	851
	pmrA Rev	CAGGTTTCAGTTGCAAACAG	
pmrB	pmrB For	ACCTACGCGAAAAGATTGGC	1,274
	pmrB Rev	GATGAGGATAGCGCCCATGC	
phoP	phoP For	GAGCTTCAGACTACTATCGA	739
	phoP Rev	GGGAAGATATGCCGCAACAG	
phoQ	phoQ For	ATACCCACAGGACGTCATCA	1,596
	phoQ Rev	CAGGTGTCTGACAGGGATTA	
mgrB	mgrB For	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	252
	mgrB Rev	AAGGCGTTCATTCTACCACC	

4) Lipoplysaccharide (LPS) 추출

○ 대상 균주를 TSB 10 ㎖에 배양한후, 13,000rpm 10 min 원심분리함. LPS는 LPS extraction kit (Intron)를 이용하여 그 방법에 따라 분리하였음

4) Lipid A 추출

○ LPS를 동결건조한 후, phenol/water extraction 방법을 적용하여 추출하였음. SDS-PAGE (100V, 1h) 후 silver staining을 통해 확인

4) LPS의 biotinylation

○ 1㎎ LPS를 0.9 ㎖의 0.1M sodium acetate (pH 5.0)녹인 후 0.1 ㎖ 100mM sodium metaperiodate (ice-cold)를 추가하고 0℃에서 30분 동안 어두운곳에서 Oxidazation과정을 거침. 2 ㎕ glycerol을 추가하여 반응 멈춘 후 PBS를 사용하여 dialysis하였음. 0.1 ㎖ 50mM biotin-LC-hydrazide를 반응액에 추가한 후 실온에서 2시간 반응하고 PBS를 사용하여 dialysis하였음

○ SDS-PAGE 및 western blot

- 15 ㎕의 Biotinylated LPS를 10% polyacrylamide gel를 사용하여 전기영동 (100ㅍ, 1시간)후 PVDF (0.2㎛, Inveitrogen) membrane에 transfer 하였음. Blocking solution(5% Skim milk, TBST buffer)으로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 1:1000 streptavidin/HRP conjugate (Sigma) 처리하고 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 확인하였음

4) MALDI-TOF(Matrix assisted laser desoption/ionization time-of-flight mass spectrometry) 분석

○ 추출한 lipid A를 3:1 chloroform:methanol에 녹이고 trihydroxyacetophenone (THAP)/70% acetonitrile(ACN) matrix와 1:1로 섞은 후 negative reflector mode로 MALDI-TOF (Ultraflex III, Bruker) 분석 하였음. 샘플 당 1000 shot, 800-6000 m/z의 스펙트럼을 얻고 3회 반복하였음. Mass calibration은 Angitensin II (m/z= 1046.5423), P14R (synthetic protein, m/z= 1533.8582), ACTH fragment 18-39 (m/z- 2465.1989)를 standard로 사용하여 수행하였음.

3. 연구 수행내용 및 결과

가. 대상균주 선정

1) Colistin 내성균주의 표현형 및 유전형 확인

○ '16-'17년 종합병원 환자의 혈액과 뇨 검체에서 분리된 그람음성 *E. coli* 15,232주, *K. pneumoniae* 2,642주, *Acinetobacter* spp. 358주, *P. aeruginosa* 231주 중 colistin 내성 균주는 *E. coli*에서 15주, *K. pneumoniae*에서 15주, *Acinetobacter* spp.에서 1주로 확인되었음

○ Colitin MIC ≥4 ㎍/㎖인 *E. coli* (15주) 및 *K. pneumoniae* (15주)를 대상으로 액체미량희석법을 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory

concentration, MIC) 재확인 결과 *E. coli* 2주, *K. pneumoniae* 7주에서 계대배양 2일째부터 MIC가 감수성 수준으로 떨어지는 것을 확인하였음 (표 3). 계대배양 후에도 colistin MIC 변화가 없는 *E. coli* 13주 및 *K. pneumoniae* 8주를 대상으로 colistin 내성 관련 유전적 특성 및 외막의 lipid A 변형 분석을 진행하였음

○ Colitin내성 균주의 MIC 범위는 4 ㎍/㎖에서 64 ㎍/㎖로 확인되었고, 대부분 세파계 항생제 내성을 보였으며 ESBL 유전자는 *K. pneumoniae* 1주 (CTX-M-15), *E. coli* 2주(CTX-M-27, CTX-M-55)에서 확인되었고, colistin 내성 *K. pneumoniae* 중 2주는 carbapenem에도 내성을 보였으며 1주는 KPC-2를 보유하고 있었음

○ 8주의 Colistin 내성 *K. pneumoniae*에서 5종류의 sequence type (ST)이 확인되었음; ST307(2주), ST48(3주)을 포함하여 ST517(1주), ST11 (1주), ST20 (1주). 특히 ST307유형은 carbapenem과 colistin에 동시에 내성을 보였음

○ MIC가 내성이었다가 감수성 수준으로 떨어지는 것으로 확인되었던 *K. pneumoniae* 7주를 대상으로 population analysis 수행 결과 모두 colistin heteroresistance로 확인되었음 (그림 1)

표 3. 콜리스틴 내성 균주

균종	균주번호	검체	Colistin	Colistin MIC (RIS)					
			MIC (RIS)	Passage0	Passage1	Passage2	Passage3	Passage4	Passage5
K. pneumoniae	E16KPN0011	Urine	16> (R)	16 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	E16KPN0016	Urine	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)
	E16KPN0027	Urine	16> (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	D16KPN0042	Blood	16> (R)	64 (R)	64 (R)	64 (R)	64 (R)	64 (R)	64 (R)
	F16KPN0061	Urine	16> (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	F16KPN0079	Urine	8 (R)	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	D16KPN0124	Blood	8 (R)	0.5 (S)	1 (S)	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	A16KPN0145	Urine	16> (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	B16KPN0226	Blood	8 (R)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
	A0017KP0003	Blood	4 (R)	4 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	A0017KP0029	Urine	16> (R)	64 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)
	B0017KP0072	Urine	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	C0017KP0061	Urine	16> (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	8 (R)
	B0017KP0080	Blood	8 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	B0017KP0081	Urine	8 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	8 (R)	4 (R)
E. coli	A16ECO0007	Urine	4 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	A16ECO0136	Urine	4 (R)	4 (R)	2 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)
	B16ECO0087	Urine	4 (R)	4 (R)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
	E16ECO0226	Urine	4 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	A16ECO0386	Urine	16> (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)
	C16ECO0252	Urine	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	C16ECO0593	Blood	4 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)
	C16ECO0597	Urine	8 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)	16 (R)
	A16ECO0811	Urine	4 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	B0017EC0122	Blood	4 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	F0017EC0063	Urine	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	B0017EC0271	Blood	4 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	B0017EC0275	Urine	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	F0017EC0104	Urine	4 (R)	8 (R)	4 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)
	A0017EC0247	Urine	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
	A0017EC0374	Urine	16> (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)

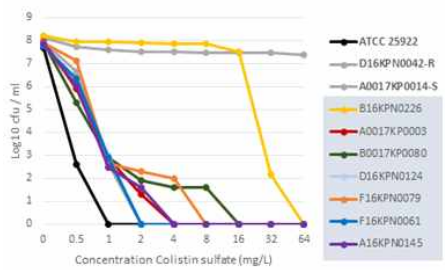


그림 1. Colistin내성 *K. pneumoniae*균주 중 heteroresistance로 확인된 균주

2) 유전적 특성 분석

○ *mcr-1* 유전자 확인

- PCR 및 sequencing 방법을 통해 *mcr-1* (mobile colistin resistance-1) 유전자 확인 결과 colistin 내성 21주 (*E. coli* 13주 및 *K. pneumoniae* 8주)중 *E. coli* 2주에서 *mcr-1* 유전자 확인되었음 (그림 2). *mcr-1* 유전자 확인되지 않은 colistin 내성균주의 경우 다른 유형의 *mcr* 유전자 (*mcr2* ~ *mcr8*) 가 있는지 확인중. *mcr-1* 양성 균주도 압타머 발굴시 대상 균주에 포함 예정

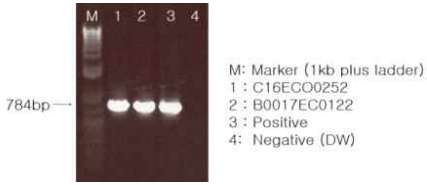


그림 2. *mcr-1* 유전자 확인

○ LPS 변형 관련 유전자 변이 확인

- LPS 변형 관련 유전자 *pmrA, pmrB, phoP, phoQ, mgrB* 변이를 확인한 결과 *mgrB*를 제외한 two component regulatory systems *pmrAB, phoPQ*에서 한 개 또는 여러 변이가 확인되었음. Colistin 내성 *K. pneumoniae* 8주 중 6주에서 *pmrB*의 변이가 확되었음; L213M (n=3), A21D and V208L (n=2), and R256G (n=1). Carbapenem내성 ST307 2균주에서는 *pmrA*(A41T), *pmrB*(L213M), *phoQ*(L30Q)변이가 확인되었으며, Colistin 내성 ST11 균주

에서는 기존의 보고와 동일한 *pmrB*(R256G) 변이가 확인되었음 (표 4).

- 2차년도에는 colistin내성 *E. coli* 균주를 대상으로 유전자 변이 분석 예정

표 4. LPS 변형 관련 유전자 변이

	Strain	HA/CA	Specimen	MIC of Colistin (ug/ml)	ST type	*pmrA*	*pmrB*	*phoP*	*phoQ*	*mgrB*
1	C0017KP0061	HA	Urine	4	517	WT	WT	WT	WT	WT
2	B0017KP0072	HA	Urine	4	307	A41T [1)]	L213M	WT	L30Q	WT
3	B0017KP0081	HA	Urine	8	307	A41T [1)]	L213M	WT	L30Q	WT
4	E16KPN0027	CA	Urine	8	48	E57G	WT	WT	WT	WT
5	E16KPN0011	HA	Urine	8	48	WT	A21D [2)], V280L	S72L	WT	WT
6	E16KPN0016	HA	Urine	16	48	WT	A21D [2)], V280L	S72L	WT	WT
7	A0017KP0029	HA	Urine	32	11	WT	R256G [1), 3)]	WT	WT	WT
8	D16KPN0042	CA	Blood	64	20	WT	A21D [2)], V280L	S72L	WT	WT

3) MALDI-TOF를 통한 lipid A 변형 분석

○ Lipid A 추출

- Colistin 감수성 및 내성인 *K. pneumoniae* 25주 와 *E. coli* 25주를 대상으로 lipid A 추출 중이며 동시에 MALDI-TOF 분석 진행중이며 peak 비교 분석하여 lipid A 변형 패턴 확인 예정

나. 압타머 발굴을 위한 외막의 LPS 추출

1) LPS 추출 방법 확립

○ LPS 추출 방법 확립

- Hot phenol/water extraction 방법을 통해 *K. pneumoniae* 2주 를 대상으로 LPS 추출한 후 commassie brilliant blue 염색을 통해서 단백질 오염이 없음을 확인하였고, silver staing을 통해서 LPS purity 확인하였음 (그림 3)

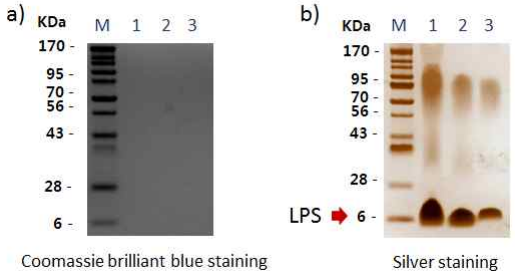


그림 3. SDS-PAGE 확인. a) Coomassie brillant blue, b) Silver staining, M, protein size marker; 1, *K. pneumoniae* E16KPN0011; 2, *K. pneumoniae* E16KPN0016; 3, positive control LPS (Sigma #L4268)

- 압타머 발굴을 위해서는 1mg 이상의 LPS 필요함. 배양한 균의 양에 따라 추출되는 LPS 양을 확인하는 등 조건 확립 진행중

2) LPS의 biotinylation

○ 압타머 발굴시 타겟의 정확한 input을 알 수 있고, selection rounds, pool assay 등이 가능하기 위해서는 타겟의 고정화가 필요함

○ Biotinylation방법의 경우 magnetic SA bead로 손쉽게 pull down이 가능함

○ Biotin-hydrazide coupling 방법을 통해 biotin-LC-hydrizide를 LPS의 inner core 부위에 결합시킴으로써 추출한 LPS의 biotinylation 수행

○ Colistin 내성 *K. pneumoniae* 균주를 대상으로 LPS 추출하여 biotinylation 시행 후 western blot을 통해 확인하였음 (그림 4). 압타머 합성을 위해 *K. pneumoniae* 및 *E. coli* 의 colistin 감수성과 내성 균주 각각 1주씩을 대상으로 biotinylation 진행 예정 (*colistin 내성 *E. coli*는 *mcr-1*유전자 보유)

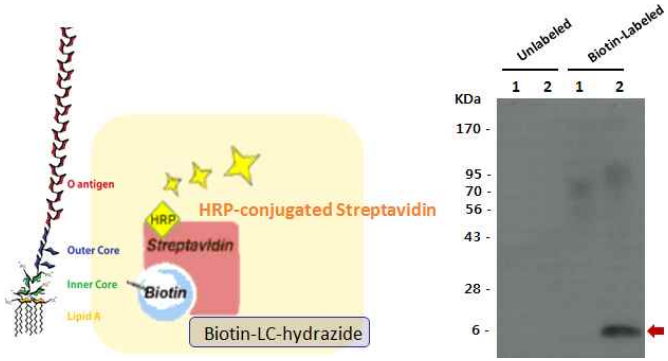


그림 4. LPS의 biotinylation. 1, *K. pneumoniae* LPS (Sigma #L4268); 2, *K. pneumoniae* E16KPN0042 LPS

다. 결과 요약

○ '16-'17년 종합병원 환자의 혈액과 뇨 검체에서 분리된 그람음성 *E. coli* 15,232주, *K. pneumoniae* 2,642주, *Acinetobacter* spp. 358주, *P. aeruginosa* 231주 중 액체미량희석법을 이용하여 최종확인된 colistin 내성 균주는 *E. coli*에서 13주, *K. pneumoniae*에서 8주, *Acinetobacter* spp.에서 1주로 확인되었음

○ Colitin내성 균주의 MIC 범위는 4 ㎍/㎖에서 64 ㎍/㎖로 확인되었고, colistin 내성 *E. coli* 2주에서 *mcr-1* 유전자가 확인되었음

○ MIC가 내성이었다가 감수성 수준으로 떨어지는 것으로 확인되었던 *K. pneumoniae* 7주를 대상으로 population analysis 수행 결과 모두 colistin heteroresistance로 확인되었음

○ Colistin 내성 *K. pneumoniae* 8주를 대상으로 LPS 변형 관련 유전자 *pmrA, pmrB, phoP, phoQ, mgrB* 변이를 확인한 결과 *mgrB*를 제외한 two component regulatory systems *pmrAB, phoPQ*에서 한 개 또는 여러 변이가 확인되었음. Colistin 내성 *K. pneumoniae* 8주 중 6주에서 *pmrB*의 변이가 확되었음; L213M (n=3), A21D and V208L (n=2), and R256G (n=1). Carbapenem내성 ST307 2균주에서는 *pmrA*(A41T), *pmrB*(L213M), *phoQ*(L30Q)변이가 확인되었으며, Colistin 내성 ST11 균주에서는 기존의 보고와 동일한 *pmrB*(R256G) 변이가 확인되었음

○ Lipid A 변형 분석을 위하여 colistin 감수성 및 내성인 *K. pneumoniae* 25주와 *E. coli* 25주를 대상으로 lipid A 추출 및 MALDI-TOF 분석 진행중

○ 압타머 합성을 위해 *K. pneumoniae* 및 *E. coli* 의 colistin 감수성과 내성 균주 각각 1주씩을 대상으로 biotinylation 진행중

제2장 연구개발 목표의 달성도

구분	연구 세부목표	연구수행결과	달성도(%)
단독	○ Colistin 균주 선정 및 항생제 감수성 확인	• 2016~2017년 *K. pneumoniae* 균주 2,642주를 대상으로 항생제 감수성/내성 profile 확인 • Colistin 내성주 15주의 broth microdilution MIC 확인 • Population analysis 통한 heteroresistance 균주 확인	100
	○ Colistin 내성유전자확인	• Colistin 내성유전자 *mcr-1* 확인 • LPS 변형 관련 유전자 변이 확인	100
	○ Aptamer 발굴을 위한 LPS 추출	• Colistin 내성주와 감수성주를 선정하여 LPS 및 LipidA 추출 • LPS의 biotinylation	100

제3장 연구개발결과 평가 시 착안점

○ Colistin 내성균주 및 패턴을 조기 검출하여 내성 유행을 예측 가능

○ 국내 colistin 내성균주의 빠른 진단법 확립 및 적용

제4장 문제점 및 개선 방향

○ 물품 구매 관련 계약 지연으로 시약 확보가 늦어져 일부 연구 수행이 지연되고 있음. 차기년에는 정부구매카드 등을 활용하여 연구가 차질없이 진행되도록 하고자 함

○ 공무직 전환 등의 문제로 신규채용을 하지 못해 인건비 집행 부진(인건비 제외한 연구비는 97% 집행)하였으나 차기년에는 기간제근로자 채용 예정임

제5장 주요 연구 변경사항

○ 참여 연구원 변경 (2018. 5. 30.)

- 박찬, 이광준 참여 종료

○ 연구비 내역 변경 (2018. 8. 2.)

- 연구활동비 25,000천원 감액, 연구장비·재료비 25,000천원 증액

○ 연구비 내역 변경 (2018. 10. 25.)

- 연구과제추진비 1,000천원 감액, 연구장비·재료비 1,000천원 증액

제6장 주요 연구 성과

성과지표명			당초계획		실적		목표 달성률(%)
			건수	가중치(%)	건수	가중치(%)	
논문	SCI						
	비SCI						
	학술발표	국제					
		국내	1	100	1	100	100
기타							
계			1	100	1	100	100

제7장 연구비 집행 실적 내역

(단위: 천원)

(1)차년도 연구비 집행내역(2018년도)					
비목	세 목	사용용도	예산액	집행액	잔액
총 계			200,000	116,274	83,728
인건비	인건비	기타직보수(110-02): 보수, 시간외 수당 등	51,735	0	51,735
		연금지급금(320-03): 사회보험 및 퇴직금	26,174	0	26,174
	소계		77,909	0	77,909
직접비	연구장비·재료비	연구기자재 및 시설비			
		재료비 및 전산처리비	92,591	92,023	569
		시제품 제작비	-	-	-
	연구활동비	국외여비	-	-	-
		수용비 및 수수료	-	-	-
		기술정보활동비	1,000	200	800
		연구개발서비스 활용비 등	26,000	22,229	3,771
	연구과제추진비	국내여비	1,500	1,080	420
		연구환경유지비	1,000	742	258
	소계		122,091	116,274	5,818
간접비	연구관리비		-	-	-
	소계		-	-	-

제8장 참여연구원

구분	성명	과학기술인 등록번호	소속	직급	전공 및 학위		역할	참여율	인건비 지급 여부
					전공	학위			
책임자	김정욱	11369316	약제내성과	보건연구사	미생물학	이학박사	연구총괄	35%	X
연구원	배송미	10102208	약제내성과	보건연구관	미생물학	이학박사	연구관리 및 분석	15%	X
연구원	최지애	11554777	약제내성과	선임연구원	분자생물학	이학석사	실험수행 및 분석	50%	X
연구원	신규채용								○
계								100%	

제9장 참고문헌

Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in Salmonella and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31):pii-30589.

Lim SK, Kang HY, Lee K, Moon DC, Lee HS, Jung SC. First Detection of the *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Livestock between 2013 and 2015 in South Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2016(60);6991-6993.

Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. mBio. 2017;8(3):e00543-17.

Cao X, Li S, Chen L, Ding H, Xu H, Huang Y, Li J, Liu N, Cao W, Zhu Y, Shen B, Shao N. Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Research. 2009;37(14) 4621-4628.

Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP, Kumar TS, Jaykus LA, Schefers J, Sreevatsan S. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars. Molecular and Cellular Probes. 2009;23:20-28.

Turek D, Van Simaeys P, Johnson J, Ocsoyl, Tan W. Molecular recognition of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cells using DNA aptamers. World J Transl Med. 2013;2(3):67-74.

Martis N, Leroy S, Blanc V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. J Infect. 2014;69(1):1-12.

Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Polymyxin-Resistant *Enterobacteriaceae* from Blood Cultures. Journal of Clinical Microbiology. 2016;54(9):2273-2277.

Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, Sun L, Ruan Z, Feng Y, Akova M, Yu Y. Prevalence of mcr-1 in Eshcerichia coli and klebsiella pneumoniae recovered from bloodstream infections in china: a multicentre longitudinal study. Lancet Infect Dis. 2017;17(4):400-410.

Halaby T, Kucukkose E, Janssen AB, Rogers MC, Doorduijn DJ, van der Zanden AM, al Naiemi N, Vandenbroucke-Grauls CJE, van Schaik W. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(11): 6837-6843.

Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Selman D, Tan KE, Liolios L. Heteroresistance to colistin in Mulidrug-Resistance *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):2946-2950.

Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. Journal of Global Antimicrobial resistance. 2018;12:124-136.

Liu Y, Chandler CE, Leung LM, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RM, Lia JH, Goodlett DR, Ernst RK, and Doi Y. Structural Modification of Lipopolysaccharide conferred by *mcr-1* in Gram-negative ESKAPE pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(6):1-9.

제10장 첨부문서

○ 대한감염학회 대한항균요법학회 추계학술대회 (2018.11.1.~2018.11.2.)

Mutations of *pmr*AB and *pho*PQ related with colistin resistance in *Klebsiella pneumonia* clinical isolates

Jiae Choi and Jungwook Kim

Division of Antimicrobial Resistance, Center for Infectious Diseases Research, National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, Cheongju, Republic of Korea

배경: Colistin is one of the antibiotics of last resort for the treatment of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Colistin resistance is by the alteration of bacterial outer membrane LPS with the addition of L-Ara4-N and PEtN molecules. These alterations are mediated by arnBCADTEF operon and pmrHFIJKLM operon. In this study, we analyzed the mutations of the genes involved in regulation of both operons.

방법: Colistin-resistnat K. pneumoniae strains were collected from Kor-GLASS from 2016 to 2017. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth-micro dilution method according to the CLSI. The mutations in the regulator genes related to colistin resistance (mgrB, pmrA, pmrB, phoP, phoQ) were analyzed using PCR and sequencing and compared with sequences of 15 colistin-susceptible strains.

결과: Of 2,642 K. pneumoniae strains, 8 strains were resistant to colistin, which had a MIC range of 4-64 μg/ml. These strains represented five sequence types: ST11 (n=1), ST20 (n=1), ST48 (n=3), ST307 (n=2), and ST517 (n=1). Both strains of ST307 strains were resistant to carbapenem. Colistin resistance mcr-1 gene was not found in any of the isolates. Of 8 strains, 6 strains had amino acid substitutions at pmrB: L213M (n=3), A21D and V208L (n=2), and R256G (n=1). Several substitutions were also identified in phoP (S72L) and phoQ (L30Q) genes. Also, Both strains of ST307 were identified same mutations at pmrA(A41T), pmrB(L213M) and phoQ(L30Q). All strains did not shows any substitution in mgrB.

결론: The combination of the various mutations might have led to colistin resistance, which suggests that continuous monitoring of the molecular mechanisms is required. And also, further studies are needed to evaluate the contribution of these mutations to the colistin resistance.

색인단어: pmrAB, phoPQ, LPS, colistin, K.pneumoniae