

# 선택가능한 치료제 후보를 확대하기 위한 다제내성 *Acinetobacter baumannii*에 대한 linalool 및 colistin 병합요법의 상승효과 평가

김웅전<sup>1</sup>, 김춘미<sup>2</sup>, 장숙진<sup>1</sup>, 이슬비<sup>1</sup>, 조성식<sup>1</sup>, 정석훈<sup>3</sup>, 고영진<sup>1</sup>, 강성호<sup>1</sup>, 박건<sup>1</sup>, 김동민<sup>4</sup>, 윤나라<sup>4</sup>, 안영준<sup>5</sup>, 임동훈<sup>6</sup>, 국중기<sup>7</sup>

조선대학교 의과대학 <sup>1</sup>진단검사의학교실, <sup>2</sup>의예과, <sup>3</sup>연세대학교 의과대학 진단검사의학교실 및 세균내성연구소, 조선대학교 <sup>4</sup>의과대학 감염내과학교실, <sup>5</sup>의학교육학교실, <sup>6</sup>비뇨의학교실, <sup>7</sup>치과대학 구강생화학학교실 및 한국구강미생물자원은행

## Evaluation of Synergistic Effect of Combined Treatment with Linalool and Colistin on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* to Expand Candidate for Therapeutic Option

Ung-Jun Kim<sup>1</sup>, Choon-Mee Kim<sup>2</sup>, Sook-Jin Jang<sup>1</sup>, Seul-Bi Lee<sup>1</sup>, Seong-Sik Cho<sup>1</sup>, Seok-Hoon Jeong<sup>3</sup>, Young-Jin Ko<sup>1</sup>, Seong-Ho Kang<sup>1</sup>, Geon Park<sup>1</sup>, Dong-Min Kim<sup>4</sup>, Na-Ra Yoon<sup>4</sup>, Young-Joon Ahn<sup>5</sup>, Dong-hoon Lim<sup>6</sup>, Joong-Ki Kook<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Premedical Science, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Antimicrobial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Department of <sup>4</sup>Internal Medicine, <sup>5</sup>Medical Education, <sup>6</sup>Urology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, <sup>7</sup>Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, Gwang-Ju, Republic of Korea



### OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585  
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(1): 11-20  
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.1.11>

### Corresponding author

Sook-Jin Jang

E-mail: [sbjjang@chosun.ac.kr](mailto:sbjjang@chosun.ac.kr)

Tel: +82-62-220-3259

Fax: +82-62-232-2063

Received: May 29, 2019

Revised: September 11, 2019

Accepted: September 11, 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:** *Acinetobacter baumannii* infection is a significant health problem worldwide due to increased drug resistance. The limited antimicrobial alternatives for the treatment of severe infections by multidrug-resistant *A. baumannii* (MDRAB) make the search for other therapeutic options more urgent. Linalool, the major oil compound in *Coriandrum sativum*, was recently found to have high antibacterial activity against *A. baumannii*. The purpose of this study was to investigate the synergistic effect of linalool and colistin combinations against MDRAB and extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDRAB).

**Methods:** A total of 51 strains of *A. baumannii* clinical isolates, consisting of 10 MDRAB and 41 XDRAB were tested. We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool for the test strains using the broth microdilution method and searched for interactions using the time-kill assay.

**Results:** The time-kill assay showed that the linalool and colistin combination displayed a high rate of synergy (92.1%) (by synergy criteria 2), low rate of indifference (7.8%), and a high rate of bactericidal activity (74.5%) in the 51 clinical isolates of *A. baumannii*. The synergy rates for the linalool and colistin combination against MDRAB and XDRAB were 96% and

92.1%, respectively. No antagonism was observed for the linalool and colistin combination.

**Conclusions:** The combination of linalool and colistin showed a high synergy rate, which may be beneficial for controlling MDRAB infections. Therefore, this combination is a good candidate for in vivo studies to assess its efficacy in the treatment of MDRAB infections.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Colistin, Linalool, Synergy, Time-kill assay

## INTRODUCTION

*Acinetobacter baumannii*는 기회감염을 일으키는 그람음성 구균으로 다양한 감염을 일으키며 균혈증, 폐렴, 수막염 및 요로감염과 관계가 깊다[1,2]. 최근 다제내성을 가진 *A. baumannii*가 등장하면서 임상 의사들이 항생제 선택에 어려움을 겪고 있다[3]. Polymyxin 항생제인 colistin은 신독성과 신경독성 때문에 잘 사용되지 않다가, *A. baumannii*를 포함한 다제내성 그람음성균에 활성이 있는 몇 안되는 항생제로 다시 주목을 받고 있다[4,5]. 하지만 colistin의 사용이 증가함에 따라 이에 내성을 보이는 *A. baumannii*가 나타났고, colistin의 유용성에 큰 위협이 되고 있다[5-7]. 다제내성 *A. baumannii*의 감수성 회복을 위한 방법으로 carbapenem의 지속적 주입, 박테리오파지 기반 치료 그리고 항생제 병합요법 등이 제시되었다[8-10]. 항생제 사용은 부작용을 야기할 수 있고[11], 점차 많은 사람들이 자연에서 유래하는 안전하게 여겨지는 성분을 선호함에 따라[12], 정유 같은 식물유래 성분과 항생제의 병합요법이 대안으로 대두되어 왔다[13]. 식물은 다양한 대사산물을 만드는데, 1차 대사산물은 호흡과 광합성에 관여하며 식물의 성장과 관련이 있다[14]. 2차 대사산물은 과거 수백만년 동안 식물이 포식자에 대항하면서 형성되었고 화학적 방어역할을 한다[15]. 정유는 휘발성있는 2차 대사산물의 복합체로[14] 꽃, 잎, 뿌리 그리고 씨앗 등에서 추출된다. 그리고 세균성장을 억제하는 성질이 있어서 오래 전부터 치료제로 사용되어왔다[15]. Linalool은 향수, 화장품 그리고 식품산업에서 널리 사용되는 모노테르펜(Monoterpene)으로 고수(Coriander) 정유의 주요 구성성분이며, 광범위 항균작용을 하는 것으로 보고되었다[16-18].

다양한 균종에 대해 항생제를 정유 또는 정유의 구성성분과 병합한 항균작용에 대한 연구는 그 동안 많이 있어왔다[17,19]. Multidrug-resistant *A. baumannii* (MDRAB)에 대한 항생제와 정유의 병합 또는 식물추출물의 병합연구도 일부 시행되었다[20-22]. 정유와 항생제의 병합요법에 대한 이전 논문들의 결과를 살펴보면, 균종간 그리고 균주간 변동성이 있기 때문에 병합에 사용할 약효성분이나 화합물의 상승효과와 길항효과 여부를 파악할 필요가 있다[15-17, 23,24]. 이 연구는 다제내성 *A. baumannii*를 MDRAB와 extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDRAB)를 대상으로, linalool과 colistin 병합제의 약효를 평가하기 위해 시행했다.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. 대상 및 검체수집

2009년 6월부터 2015년 5월까지 총 6년간 조선대학교병원에서 세균배양검사가 의뢰된 검체 중, *A. baumannii*로 동정되어 냉동보관해왔던 *A. baumannii* 51균주를 수집하여 분석, 조사하였다.

균주들은 두 번 계대배양 후 실험에 사용하였다. 균 동정은 VITEK2 System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)의 VITEK2 GN 카드를 이용하였다. VITEK2 자동분석기로 *A. baumannii*로 동정된 균주들은 균종명을 확인하기 위해 *bla*<sub>OXA-51-like</sub> PCR [25], Higgins PCR [26], *A. baumannii* species-specific PCR [27]을 시행하여 모두 양성인 경우 *A. baumannii*로 동정하였다. 항균제 감수성 검사는 VITEK2 System (bioMérieux)의 VITEK2 AST-N225 카드를 이용하였다. 연구에 사용된 균주는 Magiorakos 등이 제시한 기준에 항생제를 9개의 범주로 구분하고, MDR은 3개 이상의 범주에서 각 범주마다 1개 이상의 항생제에 감수성이 없는 경우이고, XDR은 2개 이하의 범주를 제외한 나머지 범주에서 1개 이상의 항생제에 감수성이 없는 경우로 정의하였다[28].

## 2. 항균물질의 감수성 검사

Linalool과 colistin은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA)사의 제품으로 각각 L2602, C4461의 제품번호를 사용했다. 각 항균제에 대한 MIC는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline에 따라 broth microdilution assay 방법으로 측정하였다[29]. Colistin에 대한 감수성 결과는 CLSI breakpoint 기준을 따라 해석하였다[29]. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853와 *Escherichia coli* ATCC 25922 균주를 정도관리를 위해 사용하였다.

## 3. Time-kill assay

Linalool과 colistin 단독제제를 각각 그리고 linalool과 colistin 병합제제로 time-kill assay를 시행하였다. 각 균주는 항생물질과 섞였을 때 최종 농도가  $1 \times 10^6$  CFU/mL가 되도록 Mueller-Hinton (MH) broth에 첨가했다. Colistin 농도는 임상적으로 도달 가능한 혈청 농도인 2 µg/mL를 사용했고[30], linalool은 시범적으로 1/4 MIC에 해당하는 농도를 사용했다. 항균제가 첨가된 MH broth가 담긴 tube에 균주를 접종해서,  $1 \times 10^6$  CFU/mL 농도로 전체 부피가 10 mL가 되도록 준비하여 37°C 진탕 배양기에서 배양하였다. 37°C에서 0시간과 24시간동안 배양한 균액을 10 µL씩 취해서 10배로 연속희석하고, 희석액을 MH agar plate에 접종하여 하룻밤 배양 후 총 집락수를 산정하였다[31].

상승효과의 판단은 연구자마다 다른 기준을 쓰는 경향이 있어 방법이 다를 때 비교하기 어렵기 때문에, 흔히 사용되고있는 두 가지 기준을 적용하여 각각 판정하였다. 24시간 배양 후, 가장 활성이 높은 단독약제 처리조건에서 자란 균 수보다 병합제 처리조건에서 자란 균 수가  $2 \log_{10}$  CFU/mL 이상 감소한 경우를 기준1 (criteria 1)로 정의하였다. 그리고 상승효과의 기준1을 만족하면서, 24시간 배양 후 집락수가 최초 균점종량보다  $2 \log_{10}$  CFU/mL 이상 감소한 경우를 기준2 (criteria 2)로 정의하였다. 무관 (indifferent)은 균 수가  $2 \log_{10}$  CFU/mL 미만으로 증가 또는 감소했을 경우이며, 길항효과 (antagonistic)는  $2 \log_{10}$  CFU/mL 이상으로 증가한 경우로 정의하였다[32]. 각각의 균주에 대해 기준1과 기준2를 모두 적용하여 상승효과율 (synergy rate)을 산출, 비교하였다. 최초 균점종량보다 24시간 배양 후 균 수가  $3 \log_{10}$  CFU/mL 이상 감소했을 때 살균력이 있다고 판정하였다[33].

## RESULTS

### 1. 균주의 항생제 감수성

51균주를 대상으로 VITEK2 장비의 항생제 감수성검사에서 감수성을 나타낸 비율은 ampicillin-sulbactam 10.4%, aztreonam 0%, cefepime 2%, cefotaxime 0%, ceftazidime 2%, tigecycline 24.4%, ciprofloxacin 0%, gentamicin 14.2%, imipenem 4%, meropenem 4%, piperacillin 2%, piperacillin-tazobactam 2%, ticarcillin-clavulanic acid 0%, trimethoprim-sulfamethoxazole 14.8%, colistin 63.2%, minocycline 82.9%이었다.

### 2. Linalool과 colistin의 MIC

수집된 51개의 검체는 10종의 MDRAB, 41종의 XDRAB로 확인하였다. Linalool의 MIC는 2-32 µg/mL, colistin의 MIC는 0.25-16 µg/mL를 관찰하였다. Linalool의 MIC<sub>50</sub>은 8 µg/mL, MIC<sub>90</sub>은 16 µg/mL였고, colistin의 MIC<sub>50</sub>은 2 µg/mL, MIC<sub>90</sub>은 8 µg/mL이었다.

### 3. Time-kill assay 결과

모든 *A. baumannii* 균주에 대한 time-kill assay결과는 Table 1에 제시하였다. 기준1을 적용한 상승효과 판정에서 MDRAB 10주 중 10주(100%), XDRAB 41주 중 39주(95.1%)에서 상승효과를 관찰하였다. 기준2를 적용한 상승효과 판정에서 MDRAB 10주 중 9주(90%), XDRAB 41주 중 38주(92.6%)에서 상승효과를 관찰하였다. 길항효과는 보이지 않았다(Table 2).

Colistin을 단독처리한 경우 모든 균주에서 살균력을 관찰할 수 없었고, linalool을 단독처리한 경우 MDRAB와 XDRAB 각각 1주에서 살균력을 보였다. 병합요법의 경우 MDRAB 10주 중 8주(80%), XDRAB 41주 중 30주(73.1%)에서 살균력을 관찰하였다(Table 2).

**Table 1.** Results of time-kill assay and bactericidal activity against two-drug combinations of linalool and colistin of 10 MDR and 41 XDR clinical isolates of *A. baumannii*

Group	Isolate	Log10(VCC of combination/ VCC of MASA) of 24 hr	Log10(VCC of 24 hr) – Log10(VCC of 0 hr)			Synergy criteria 1‡	Synergy criteria 2§	MIC	MIC	Category	Bactericidal activity		
			LNL* <sup>†</sup>	CST†	LNL*+CST†						LNL	CST	CST
MDR	89-92	-5.2	3.8	3.7	-1.4	S	I¶	4.0	8.0	R	N	N	N
	171-84	-6.1	0.1	2.9	-5.8	S	S	16.0	2.0	S	N	N	B
	172-91	-3.4	0.8	0.8	-2.5	S	S	16.0	2.0	S	N	N	N
	172-99	-5.1	-1.1	2.0	-6.2	S	S	4.0	1.0	S	N	N	B
	174-99	-8.1	2.9	3.1	-5.2	S	S	16.0	16.0	R	N	N	B
	180-82	-2.7	-3.4	0.1	-5.9	S	S	16.0	0.5	S	B	N	B
	181-67	-9.5	1.9	1.7	-5.3	S	S	32.0	0.5	S	N	N	B
	186-88	-5.0	-0.3	0.9	-5.2	S	S	16.0	2.0	S	N	N	B
	191-19	-8.2	3.1	4.2	-5.0	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	200-92	-7.4	2.1	4.1	-5.1	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B

**Table 1.** Results of time-kill assay and bactericidal activity against two-drug combinations of linalool and colistin of 10 MDR and 41 XDR clinical isolates of *A. baumannii* (continued)

Group	Isolate	Log <sub>10</sub> (VCC of combination/ VCC of MASA) of 24 hr	Log <sub>10</sub> (VCC of 24 hr) – Log <sub>10</sub> (VCC of 0 hr)			Synergy criteria 1‡	Synergy criteria 2§	MIC		Category	Bactericidal activity		
			LNL*	CST†	LNL*+CST†			LNL	CST		CST	LNL*	CST†
XDR	69-84	-5.2	2.6	3.9	-2.5	S	S	4.0	8.0	R	N	N	N
	99-73	-6.1	0.2	0.3	-5.3	S	S	8.0	8.0	R	N	N	B
	111-27	-6.2	0.9	2.8	-5.3	S	S	32.0	2.0	S	N	N	B
	130-33	-4.1	1.8	1.9	-2.3	S	S	4.0	16.0	R	N	N	N
	139-27	-4.0	-1.3	3.1	-5.3	S	S	16.0	2.0	S	N	N	B
	148-33	-4.4	-1.4	1.3	-5.8	S	S	8.0	8.0	R	N	N	B
	150-94	-5.4	2.2	2.1	-3.2	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	155-24	-2.7	1.8	3.6	-2.7	S	S	4.0	2.0	S	N	N	N
	158-46	-4.0	-1.9	-1.9	-5.9	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	158-86	-7.2	2.2	3.2	-5.0	S	S	8.0	1.0	S	N	N	B
	158-87	-5.8	0.7	4.2	-5.2	S	S	8.0	8.0	R	N	N	B
	159-86	-7.0	1.0	3.2	-6.0	S	S	8.0	0.3	S	N	N	B
	160-14	-2.4	-0.2	-0.3	-2.6	S	S	4.0	16.0	R	N	N	N
	160-15	-7.0	1.7	1.7	-5.2	S	S	16.0	1.0	S	N	N	B
	160-68	-6.0	0.7	3.9	-4.9	S	S	16.0	8.0	R	N	N	B
	160-92	-6.2	0.9	3.8	-5.3	S	S	16.0	4.0	R	N	N	B
	160-93	-3.2	-3.0	1.9	-6.0	S	S	8.0	8.0	R	N	N	B
	162-83	-6.0	-0.2	2.3	-5.9	S	S	16.0	0.5	S	N	N	B
	162-88	-3.1	0.7	3.8	-2.3	S	S	4.0	8.0	R	N	N	N
	163-71	-3.6	4.4	4.3	0.8	S	I	2.0	8.0	R	N	N	N
	163-72	-1.9	-0.5	0.7	-2.5	I	I	4.0	8.0	R	N	N	N
	163-77	-7.3	2.2	2.0	-5.1	S	S	16.0	4.0	R	N	N	B
	164-35	-4.3	1.8	1.9	-2.3	S	S	4.0	2.0	S	N	N	N
	164-62	-5.8	0.6	4.0	-5.0	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	165-41	-3.3	0.8	1.7	-2.4	S	S	4.0	8.0	R	N	N	N
	165-83	-8.2	2.9	2.9	-5.2	S	S	16.0	8.0	R	N	N	B
	165-83	-7.2	1.8	2.8	-5.2	S	S	16.0	8.0	R	N	N	B
	166-13	-6.4	2.0	2.9	-4.4	S	S	16.0	0.5	S	N	N	B
	166-24	-6.2	0.9	3.0	-5.3	S	S	8.0	1.0	S	N	N	B
	166-61	-8.3	3.5	4.3	-4.8	S	S	32.0	1.0	S	N	N	B
	172-89	-8.2	2.4	2.3	-6.0	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	177-35	-5.2	2.9	2.9	-2.1	S	S	4.0	2.0	S	N	N	N
	189-52	-7.2	2.1	3.2	-4.9	S	S	8.0	2.0	S	N	N	B
	189-97	-7.1	1.8	1.9	-5.2	S	S	16.0	2.0	S	N	N	B
	200-19	-4.3	2.0	2.0	-2.2	S	S	8.0	2.0	S	N	N	N
	218-62	-6.0	0.8	0.6	-5.2	S	S	16.0	1.0	S	N	N	B
	219-12	-5.3	2.1	1.9	-3.2	S	S	16.0	1.0	S	N	N	B
	219-56	-6.9	1.7	3.0	-5.0	S	S	16.0	1.0	S	N	N	B
	219-67	-0.4	-4.0	4.0	-4.4	I	I	16.0	1.0	S	B	N	B
	222-23	-2.8	-3.2	1.1	-6.1	S	S	8.0	1.0	S	B	N	B
	230-54	-5.0	-1.1	-1.0	-6.1	S	S	8.0	1.0	S	N	N	B

\*Linalool 1/4 MIC; †Colistin 2 µg/mL; ‡≥2 log<sub>10</sub> CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent of 24hr; §≥2 log<sub>10</sub> CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent and ≥2 log<sub>10</sub> CFU/mL reduction below the initial inoculum at 24 hr; || ≥3 log<sub>10</sub> CFU/mL reduction compared with the initial inoculum; ¶ <2 log<sub>10</sub> change in CFU/mL at 24 hr with the combination compared with the most active single agent

Abbreviation: MIC, minimum inhibitory concentration; LNL, Linalool; CST, Colistin; B, bactericidal; N, non-bactericidal; MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant; S, synergy; I, Indifference; VCC, viable cell count, MASA, most active single agent.

**Table 2.** Comparison of time-kill assay results between MDR and XDR groups against combination of colistin and linalool

Combination of antibiotics	Interaction	MDR	XDR	Total
		No. (%)	No. (%)	No. (%)
Colistin+Linalool	Synergy (criteria 1)	10 (100)	39 (95.1)	49 (96.0)
	Synergy (criteria 2)	9 (90.0)	38 (92.6)	47 (92.1)
	Indifference	1 (10.0)	3 (7.3)	4 (7.8)
	Antagonism	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Bactericidal	8 (80.0)	30 (73.1)	38 (74.5)

Abbreviation: MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.

## DISCUSSION

본 연구에서 다제내성 *A. baumannii* 임상분리주 51주로 linalool과 colistin을 병합하여 효과를 평가한 결과, 단일약제를 사용했을 때보다 우수한 항균력을 보였다. MDRAB를 이용한 과거 연구에서 레드 리버 검(*Eucalyptus camaldulensis*) 정유와 polymyxin B를 병합하여 상승효과를 관찰했다[21]. 은매화(*Myrtus communis* L.) 정유를 polymyxin B 그리고 ciprofloxacin과 각각 병합하여 MDRAB를 대상으로 상승효과를 관찰한 연구도 있었다[20].

*A. baumannii*에 linalool을 처리하자 항균활성과 빠른 살균효과를 나타냈고, biofilm 형성을 제한하고 표면에 세균부착과정을 억제했다[19]. *P. Aelenei* 등은 checkerboard 방법으로 oxacillin, erythromycin, gentamycin, ciprofloxacin, tetracyclin, clindamycin, erythromycin 을 각각 linalool과 병합한 효과를 평가하였다. *S. aureus* 3주, *P. aeruginosa* 2주, *Staphylococcus epidermidis* 1주, *E. coli* 1주를 대상으로 했고 모든 항생물질 조합 중 상승효과를 보인 비율을 균주별로 살펴보면, *S. aureus* 는 80% (12/15), *P. aeruginosa* 는 12.5% (1/8), *S. epidermidis* 42.8% (3/7), *E. coli* 40% (2/5)에서 상승효과가 있음을 확인하였다[17]. Silva 등은 checkerboard 방법으로 linalool과 imipenem 그리고 linalool과 ciprofloxacin의 병합요법을 참조균주 *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 25853, 임상분리주 *S. aureus*, *P. aeruginosa*을 포함한 총 네 균주에 대해 시행하였다. 저자는 fractional inhibitory concentration(FIC) 지수가 0.5이하면 상승효과, 0.5초과 1미만은 첨가효과, 1이상 4미만은 무관으로 정의하였다. Linalool과 imipenem을 병합한 결과 네 균주 모두 상승효과로, linalool과 ciprofloxacin의 병합은 *S. aureus*에서 첨가효과(additive), *P. aeruginosa* 는 무관을 보였다고 하였다[16]. 위의 결과들은 본 연구와는 다른 균종과 다른 항생제에 대한 병합효과를 평가한 결과이므로, 상승효과율을 직접 비교할 수는 없었다. 이 점을 고려하더라도, linalool과 colistin을 조합했을 때 기준2를 적용 시 92%의 상승효과를 보였기 때문에, 이 조합은 다제내성 *A. baumannii*에 대한 유망한 조합으로 여겨진다.

Linalool과 colistin 병합제가 세균에 작용하는 기전은 명확하지 않다. 일반적으로 정유는 세포벽의 투과성을 변화시켜서 전해질의 누출과 아미노산, ATP 그리고 DNA 등의 소실을 유도하며, 일부 정유는 축적되면서 세포벽 구조의 완전성(integrity)을 방해하고 세포사멸을 유도한다[34]. Linalool은 그람양성균과 그람음성균 모두에서 세포벽의 투과성을 증가시켜 세포구성성분의 소실을 유도한다고 보고되었다[35]. Colistin은 양친매성(amphiphilic) 항생제로, 세균 외부 세포벽의

lipopolysaccharide (LPS)의 lipid A (LPA)와 상호작용하여, 세포를 사멸시킨다[36]. Linalool과 colistin 모두 세포벽에 작용하는 항균기전을 가지고 있고, 상승작용의 기전을 밝히기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

결론적으로 *A. baumannii*에 대한 linalool과 colistin 조합은 MDRAB, XDRAB 모두 높은 비율로 상승효과를 보여 매우 효과적인 조합임을 확인할 수 있었다. 기존 항생제간의 병합요법을 통해 MDRAB에 적용하려는 노력들이 있어왔고 병합요법이 효과적임을 밝힌 기존의 연구들도 있었던 반면[37], *in vitro*와 *in vivo*가 상반되는 결과를 나타내는 연구도 있었다[38]. 본 연구는 기존 항생제간의 조합이 아닌, 정유의 성분인 linalool과 colistin을 병합하여 다제내성 *A. baumannii*에 적용한 최초의 연구로 의미있는 상승효과를 확인했다. 현재 정유와 항생제의 병합요법은 많은 연구가 이루어지지 않은 분야로, 임상적용을 위해서는 더 많은 *in vivo*, *in vitro* 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요약

**배경:** *Acinetobacter baumannii*는 약제내성의 증가로 세계적인 문제로 대두되고 있다. 다제내성 *A. baumannii* (MDRAB)감염의 치료법이 제한적이므로 새로운 치료법의 발견이 시급하다. Linalool은 *Coriandrum sativum*의 주요 구성요소로서 최근 *A. baumannii*에 대한 높은 항균효과를 가지고 있음이 밝혀졌다. 이 연구의 목적은 MDRAB와 광범위내성 *A. baumannii* (XDRAB)에 대하여 linalool과 colistin의 조합이 상승효과를 보이는지 조사하기 위함이다.

**방법:** *A. baumannii* 51균주로 실험하였으며 10균주의 MDRAB와 41균주의 XDRAB로 구성되었다. Broth microdilution으로 linalool의 MIC를 결정하였고 time-kill assay로 약제의 작용을 평가하였다.

**결과:** 51균주의 *A. baumannii* 임상분리주를 대상으로 Time-kill assay 시행한 결과 기준 2를 적용시, 높은 상승작용(92.1%), 낮은 무관(7.8%), 그리고 높은 살균효과(74.5%)가 관찰되었다. Linalool과 colistin조합의 상승효과는 MDRAB와 XDRAB에서 각각 96%와 92.1%로 관찰되었다. 길항작용은 관찰되지 않았다.

**결론:** Linalool과 colistin의 조합은 높은 상승작용률을 보여 MDRAB감염을 관리하는 효과적인 조합일 가능성을 보여주었다. 그러므로 이 조합의 MDRAB감염치료에 대한 효율성을 평가하기 위해 *in vivo* 추가연구가 필요하다.

## FUNDING

이 논문은 2017학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

## REFERENCES

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21:538-82.
2. Munoz-Price LS and Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. N Engl J Med 2008;358:1271-81.
3. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant acinetobacter. J Glob Infect Dis 2010;2:291-304.

4. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4971-7.
5. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1607-15.
6. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1163-7.
7. Park YK, Jung SI, Park KH, Cheong HS, Peck KR, Song JH, et al. Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:43-51.
8. Mohammadi M, Khayat H, Sayehmiri K, Soroush S, Sayehmiri F, Delfani S, et al. Synergistic effect of colistin and rifampin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Open Microbiol J* 2017;11:63-71.
9. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61.
10. Wang D. Experience with extended-infusion meropenem in the management of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:290-1.
11. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 2007;14:727-32.
12. Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *J Food Sci* 2009;74:M379-83.
13. Harris R. Synergism in the essential oil world. *Int J Aromather* 2002;12:179-86.
14. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant group A streptococci. *Front Microbiol* 2015;165.
15. Bassole IH and Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17:3989-4006.
16. Silva VA, Sousa JP, Guerra F, Pessôa HLF, Freitas AFR, Coutinho H, et al. Antibacterial activity of the monoterpene linalool: alone and in association with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Int J Pharmac Phytochem Res* 2015;7:1022-6.
17. Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoia AC, Brebu M, et al. Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2019;68:156-64.
18. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe* 2012;18:369-72.
19. Alves S, Duarte A, Sousa S, Domingues FC. Study of the major essential oil compounds of coriandrum sativum against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling* 2016;32:155-65.
20. Aleksic V, Mimica-Dukic N, Simin N, Nedeljkovic NS, Knezevic P. Synergistic effect of

- myrtus communis L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. *Phytomedicine* 2014;21:1666-74.
21. Knezevic P, Aleksic V, Simin N, Svircev E, Petrovic A, Mimica-Dukic N. Antimicrobial activity of eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Ethnopharmacol* 2016;178:125-36.
  22. Betts JW and Wareham DW. *In vitro* activity of curcumin in combination with epigallocatechin gallate (EGCG) versus multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2014;14:172.
  23. Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J* 2014;8:6-14.
  24. Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 2010;17:1061-6.
  25. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*<sub>OXA</sub> genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:274-8.
  26. 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.
  27. Li XM, Choi JA, Choi IS, Kook JK, Chang YH, Park G, et al. Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species. *Ann Clin Lab Sci* 2016;46:270-8.
  28. 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.
  29. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
  30. Park GC, Choi JA, Jang SJ, Jeong SH, Kim C-M, Choi IS, et al. *In Vitro* interactions of antibiotic combinations of colistin, tigecycline, and doripenem against extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med* 2016;36:124-30.
  31. Kumar S, Bandyopadhyay M, Mohiruddin Sk, Mukhopadhyay PK, Bandyopadhyay MK, Chatterjee A, et al. Antimicrobial synergy testing by time-kill methods for extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Dent Med Sci* 2017;16:79-84.
  32. Entenza JM and Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of *in vitro*, animal and case report studies. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:8.e1-9.
  33. Principe L, Capone A, Mazzarelli A, D'Arezzo S, Bordi E, Di Caro A, et al. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: possible options for the treatment of complicated infection. *Microb Drug Resist* 2013;19:407-14.
  34. Wang YM, Kong LC, Liu J, Ma HX. Synergistic effect of eugenol with colistin against clinical isolated colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7:17.
  35. Zengin H and Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* 2014;19:17773-98.

36. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis* 2015;60:1295-303.
37. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471-84.
38. Dinc G, Demiraslan H, Elmali F, Ahmed SS, Alp E, Doganay M. Antimicrobial efficacy of doripenem and its combinations with sulbactam, amikacin, colistin, tigecycline in experimental sepsis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2015;38:67-73.