

## 부산의 대학병원에서 분리된 *Acinetobacter baumannii* 생성 Class D $\beta$ -Lactamase OXA-23

전병찬<sup>2</sup>, 권기영<sup>2</sup>, 정석훈<sup>1</sup>, 배일권<sup>1</sup>, 권수봉<sup>1</sup>, 조병규<sup>1</sup>, 용동은<sup>3</sup>, 이경원<sup>3</sup>

고신대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 신경외과학교실<sup>2</sup>, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>3</sup>

### Prevalence of OXA-23 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital, Busan, Korea

Byung-Chan Jeon<sup>2</sup>, Ki-Young Kwon<sup>2</sup>, Seok Hoon Jeong<sup>1</sup>, Il Kwon Bae<sup>1</sup>, Su Bong Kwon<sup>1</sup>,  
Byung Kyu Cho<sup>1</sup>, Dongeun Yong<sup>3</sup>, Kyungwon Lee<sup>3</sup>

Departments of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Neurosurgery<sup>2</sup>, Kosin University College of Medicine; Department of  
Laboratory Medicine<sup>3</sup>, Yonsei University College of Medicine

**Background** : *Acinetobacter baumannii* is a glucose-nonfermenting gram-negative rod and is a well-recognized nosocomial pathogen. In recent years, *A. baumannii* strains showing resistance to carbapenems by producing metallo- $\beta$ -lactamases or OXA-type  $\beta$ -lactamases have increased, and it is considered to be a serious clinical problem. But genotypes of carbapenemases produced by *A. baumannii* isolates in Korea have been rarely reported. The purpose of this study was to investigate the prevalence of imipenem-resistant *A. baumannii* and to determine the mechanism of resistance.

**Methods** : During the period of January through September, 2003, susceptibilities to imipenem of *A. baumannii* isolates from patients admitted in Kosin University Gospel Hospital in Busan, Korea were investigated. The modified Hodge and EDTA-disk synergy tests were performed for screening of carbapenemase and metallo- $\beta$ -lactamase-production. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the agar dilution method. For detection of IMP, VIM and OXA-type  $\beta$ -lactamases genes, polymerase chain reactions (PCR) were performed, and the DNA sequences of OXA-type  $\beta$ -lactamases genes were determined by using the dideoxy-chain termination method. The isoelectric points of  $\beta$ -lactamases were determined by isoelectric focusing. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of the *Sma*I-digested genomic DNA was performed.

**Results** : A total of 193 strains of *A. baumannii* were collected from patients during the surveillance period. Twenty-seven percents (52/193) of *A. baumannii* isolates were resistant to imipenem. Among the 52 imipenem-resistant isolates, 41 isolates (78.8%) showed positive results in the modified Hodge test, but none of the isolates showed positive results in the EDTA-disk synergy test. Thirty-eight modified Hodge test-positive isolates harbored *bla*<sub>OXA-23</sub> gene, but none of the isolates harbored IMP- or VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases genes. Analytical isoelectric focusing revealed that all the 38 isolates had a nitrocefim-positive band at pI of 6.65. Thirty-five OXA-23-producing isolates

접 수 일 : 04/8/3      게재승인일 : 04/8/24

교신저자 : 정석훈

(602-702) 부산광역시 서구 암남동 34번지

고신대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL : 051)990-6373      FAX : 051)990-3034

E-mail : kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

본 연구는 2003년 식약청 위탁과제 지원에 의하여 이루어진 것임(03092항

내안750-2).

## 서      론

*Acinetobacter baumannii*는 포도당 비발효 그람음성간균으로 병원감염의 주요 원인균이다. 폐렴, 패혈증, 요로감염, 창상감염, 수막염 등 다양한 유형의 감염증을 유발

showed a similar PFGE pattern when digested by *Sma*I endonuclease.

**Conclusion :** Thirty-eight clinical isolates of *A. baumannii* acquired resistance to imipenem by producing OXA-23  $\beta$ -lactamase. Among them were 35 isolates thought to be originated from the same source, because they contained a similar chromosomal type. To the best of our knowledge, this is the first time that OXA-23  $\beta$ -lactamase has been detected in Korea.

(*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(2):139-147)

**Key words :** *Acinetobacter baumannii*, Imipenem, OXA-23  $\beta$ -lactamase

하며 면역력이 저하된 환자에서 감염증을 흔히 일으킨다 [1]. 과거 임상검체에서 분리된 *A. baumannii* 대부분은 carbapenem에 감수성이었으나, 최근 다양한 기전에 의해서 이 항균제에 대한 내성을 획득한 예가 보고되었다.

그람음성간균이 carbapenem에 대한 내성을 획득하는 기전은 다양하지만 가장 흔한 것은  $\beta$ -lactamase 생성이다. Class A의 IMI-1, NmcA, Sme-1, class B의 VIM 혹은 IMP metallo- $\beta$ -lactamase, class D의 OXA-23, -24, -25, -26, -27, -40 등은 carbapenem에 대한 가수분해 활성이 있는 대표적인  $\beta$ -lactamase이다[2].

Class A carbapenemase 중 NmcA, IMI-1, SME-1, -2는 주로 *Enterobacter cloacae*와 *Serratia marcescens*에서 발견된다. 이들 효소는 meropenem보다 imipenem을 잘 분해하고, 광범위 cephalosporin은 분해하지 않으며, 효소의 활성이 clavulanic acid에 의해 부분적으로 억제된다[3-7]. KPC-1, -2는 주로 *Klebsiella pneumoniae*와 *K. oxytoca*에서 보고되었으며, imipenem과 meropenem에 대한 활성이 비교적 강하고 clavulanic acid에 의해서 활성이 억제된다[2,8].

그람음성세균이 생성하는 class B metallo- $\beta$ -lactamase는 1988년 일본에서 처음 발견되었으며[9], imipenem을 가수분해하는 효소라는 의미에서 IMP-1으로 명명되었다. 그 후 일본을 비롯한 여러 나라에서 변종 IMP를 생성하는 *Pseudomonas aeruginosa*와 장내세균이 분리되었으며[10,11], 현재까지 10여종의 IMP가 보고되었다. 1999년 이태리에서 새로운 metallo- $\beta$ -lactamase인 VIM-1을 생성하는 *P. aeruginosa*가 분리되었으며[12], 그 후 프랑스와 그리스에서 VIM-2를 생성하는 *P. aeruginosa*, 대만에서는 VIM-3를 생성하는 *P. aeruginosa*가 보고되었다[13,14]. 국내에서는 1995년 Lee 등[15]이 VIM-2를 생성하는 *P. aeruginosa*를 처음 보고한 이후, 이 효소를 생성하는 *Pseudomonas putida*, *A. baumannii*, *Acinetobacter genomospecies* 3, *S. marcescens* 및 *E. cloacae*가 보고된 바 있다[16,17].

Class D의 OXA형  $\beta$ -lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대한 활성이 강한 특성이 있다. OXA-23, -24, -25, -26, -27 및 -40 등 일부 OXA형  $\beta$ -lactamase는 carbapenem에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 보고되었다. OXA-23은 1985년에 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 확인되었으며 처음에는 ARI-1으로 불리

우다 최근 OXA-23으로 개명되었다[18]. OXA-24는 1997년 스페인에서 집단감염을 일으킨 imipenem 내성 *A. baumannii* 균주에서 분리되었다[19]. 이들 효소의 염기서열 상동성에 따라 OXA-23, -27과 OXA-24, -25, -26 및 -40의 2군으로 나눌 수 있으며, 2군간의 상동성(60%)은 높지 않다[20].

Chong과 Lee[21]에 의하면 1998년에 시행된 한 조사에 따르면 국내에서 분리된 *A. baumannii*의 imipenem 내성율은 5%였으나 2002년의 조사에서는 imipenem 내성율이 13%로 과거에 비해 현저한 증가를 보였다[22]. 그러나 국내에서는 imipenem 내성 *A. baumannii*의 일부가 VIM-2 혹은 IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase를 생성한다는 보고가 있었을 뿐[23], OXA형 class D  $\beta$ -lactamase의 생성 현황에 대한 보고는 아직 없었다. 본 연구에서는 종합병원에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 imipenem 내성 현황을 조사하고, imipenem 내성세균의 metallo- $\beta$ -lactamase와 OXA형 class D  $\beta$ -lactamase 생성 현황과 유전형질을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집

2003년 1월-9월에 고신대학교 복음병원환자의 요, 객담, 혈액 등 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 하였다. 전통적인 생화학적 방법으로 균종을 동정하였으며, Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc, Hazelwood, Mo, USA)로 동정을 확인하였다.

### 2. Imipenem에 대한 감수성 시험

NCCLS 디스크 확산법으로 시험하였다[24]. 즉, 시험세균을 MacConkey 한천 (Difco, Detroit, Mich., USA)에 계대배양하여서 1개의 독립된 집락을 백금침으로 채취한 후, Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여 McFarland No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 접종한 후, imipenem 디스크 (30  $\mu$ g; BBL, Cockeysville, Md., USA)를 한천 위에 놓았다. 세균이 접종된 배지는 35 $^{\circ}$ C 항온기에 18시간 배양하고, imipenem 디스크 주위에 생긴 억제대의 크기를 측

정하였다. 결과의 정확성을 위하여 대조균주인 *Escherichia coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

### 3. Carbapenemase 생성균주 선별

Hodge 변법으로 시험하였다[25]. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 McFarland No. 0.5로 맞춘 후 Mueller-Hinton 한천(Difco)에 고르게 접종하였다. 배지의 중앙에 imipenem 디스크 (30 µg, BBL)를 놓은 후, 시험균주를 백금으로 디스크로부터 평판의 가장자리로 한 줄로 굽게 접종하였다. 35°C로 호기성 환경에서 18시간 배양 후 시험균주 접종 선 중앙쪽 말단부가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되면 양성으로 판정하였다.

### 4. Metallo-β-lactamase 생성 선별시험

Lee[25] 등의 방법에 따라서 EDTA-disk synergy 시험으로 선별하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, TSB에 접종하여 McFarland No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, EDTA 디스크 (5 mM)를 가운데 두고 imipenem과 meropenem 디스크(각 30 µg, BBL)를 양옆에 두되 가장자리 간격이 1.5 cm가 되도록 배치하였다. 세균이 접종된 배지는 35°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

### 5. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다[26]. 시험항균제는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin, cephalothin, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam, cefepime 및 imipenem을 사용하였다. 시험균주 10<sup>4</sup> colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 µg/mL 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, Pa., USA)로 접종하였다. 37°C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

### 6. Isoelectric focusing (IEF)

β-lactamase 생성의 확인을 위해서 시행하였으며 Matthew 등[27]의 방법에 따랐다. 시험세균의 추출액을 polyacrylamide gel (pH 3.5 to 9.5; Pharmacia LKB, Piscataway, Nj., USA)에 접종하고 LKB Multiphor II apparatus (Pharmacia LKB)를 이용하여 전기영동하였다. IEF한 gel을 0.05% (500 µg/mL) nitrocefin 용액 (Becton Dickinson Mic-

robiology Systems, Cockeysville, Md., USA)에 염색하여서 β-lactamase의 pI를 측정하였다.

### 7. 분자유전학적 방법에 의한 β-lactamase 유전형 시험

중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 시험하였다. *bla*<sub>IMP</sub> 및 *bla*<sub>VIM</sub>의 검출을 위해 IMP-F (5'-CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT-3'), IMP-R (5'-ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC-3') 및 VIM-F (5'-ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC-3'), VIM-R primer (5'-TGC TAC TCA ACG ACT GAG CG-3')를 각각 사용하였다[28]. OXA형 class D β-lactamase 유전자의 검출을 위해서는 새로운 primer를 고안하였다 (GenBank, <http://ncbi.nlm.nih.gov>). OXA-23, -27의 검출을 위한 primer로는 OXA-23F (5'-GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG-3')과 OXA-23R (5'-TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG-3'), OXA-24, -25, -26 및 -40의 검출을 위한 primer로는 OXA-24F (5'-GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA-3')과 OXA-24R (5'-TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT-3')을 사용하였다. 시험세균을 TSB에 접종하여 37°C로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여서 5분간 13,000 ×g로 원심 후, 상층액은 버리고, 침사는 증류수 500 µL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 ×g로 원심하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5 µL, primer 각 1 µL, deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 2.5 mM (8 µL), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5 µL), 10X buffer 10 µL 및 증류수 75.5 µL를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 94°C로 25초간 denaturation, 52°C로 40초간 annealing, 72°C로 50초간 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다 (Fig. 1). 증폭산물 10 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)의 홈에 넣고 40분간 전기영동하여서 band를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Quiagene, Hiden, Germany)로 agarose gel에서 분리 후, Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, Oh., USA)를 이용하여서 dideoxy-mediated chain termination 법 [29]으로 양방향으로 염기서열을 분석하였다 (Fig. 2).

### 8. PFGE

OXA-23 생성균주를 MacConkey 한천에 계대배양하여 1-2개의 독립된 집락을 백금침으로 채취한 후, Brain heart infusion (BHI, Difco)에 접종하여 37°C CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 배양하였다. 세균배양액 0.7 mL를 4에서 1분간 13,000 Xg로 원심한 후, 침사를 saline-EDTA 용액 (0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 1 mL에 부유하여 4°C에서 1분간 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 침사를 Pett IV 용

액 (1 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 500  $\mu$ L에 부유시킨 후 130  $\mu$ L를 동량의 50 $^{\circ}$ C 2% low-melting agarose (InCert Agarose, FMC BioProducts, Rockland, Me., USA)와 혼합하였고, 혼합액 200  $\mu$ L를 plug mold에 넣고 4에서 10분간 방치하여 고체화하였다. Agarose plug를 lysis 용액 (1 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0, 10 mM Tris, pH 8.0, 0.5% Brij 58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sarkosyl) 1 mL에 넣고 37 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 반응시킨 후, 0.1 mg/mL proteinase K (Sigma, St. Louis, Mo., USA)가 들어있는 ES 용액 (0.25 M EDTA, pH 8.0, 1% sarkosyl) 1.5 mL에 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시켰다. Agarose plug를 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma) 용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM PMSF) 1.5 mL에 넣고 실온에서 4시간 반응시킨 후, 1 mM EDTA-TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1.5 mL에 넣고 실온에서 10분씩 6번 세척하고, 다시 0.1 mM EDTA-TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) 1.5 mL에 넣고 실온에서 30분간 세척하였다. Agarose plug를 restriction buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM 2-mercaptoethanol) 1.5 mL에 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 16 U의 *Sma*I (Takara biotechnology, Shiga, Japan)이 있는 restriction buffer 100 L에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시켰다. Size marker로는 Lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca., USA)를 사용하였다. Agarose plug를 1% agarose gel (SeaKem Gold Agarose, FMC BioProducts)의 홈에 넣고 6 V/cm, switch time 0.5-60 초로 20시간 contour-clamped homogeneous field machine (CHEF-DRII, Bio-Rad)으로 전기영동하였다[30]. 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide 용액으로 30분간 염색 후, 20분간 탈색하였고, 자외선 조영하에서 PHC 34 Photoman camera (Po-

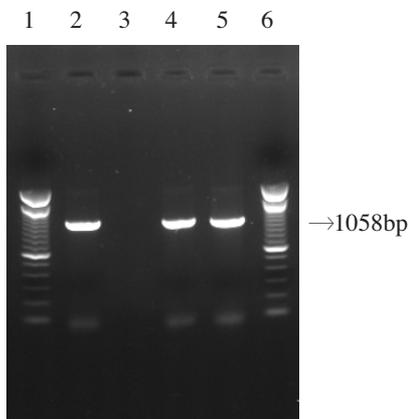


Fig. 1. Detection of amplified products of *bla*<sub>OXA-23</sub> genes after 2% agarose gel electrophoresis. Lanes: 1 and 6, DNA molecular weight markers (X174 DNA/*Hae* III Markers, Promega); 2, Positive control, OXA-23-producing *A. baumannii*; 3, Negative control, imipenem-susceptible *A. baumannii*; 4 and 5, Clinical isolates of *A. baumannii* resistant to imipenem and showed positive results in modified Hodge test.

laroid, Cambridge, Ma., USA)로 촬영하였다 (Fig. 2). 결과의 분석은 Tenover 등[31]의 방법을 따랐다. 즉, 각 균주의 염색체 DNA 분획의 위치와 수에 따라 형을 정하였는데, 위치가 다른 분획의 수가 6개 이하인 경우에는 같은 형으로, 7개 이상인 경우에는 다른 형으로 해석하였다. 3명 이상의 환자에서 같은 형이 분리된 경우에는 가장 큰 분획의 분자량에 따라 알파벳 순으로 형을 정하였고, 각 형은 분획의 차이에 따라 1, 2, 3 등의 아형군주로 나누었다.

## 결 과

### 1. Imipenem 감수성 양상

2003년 1월-9월에 고신대학교 복음병원의 임상검체에서 총 193주의 *A. baumannii*가 분리되었다. 이 중 imipenem에 감수성인 균주는 141주 (73.1%), 내성은 52주 (26.9%)였다.

### 2. Carbapenemase 및 metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주 선별

Imipenem에 내성인 균주 52주를 대상으로 시험하였다. 이 중 40주는 중환자실 환자의 검체에서 분리되었고, 나머지 12주는 외과계 병동 환자의 검체에서 분리되었다. 36주는 호흡기검체, 7주는 창상검체, 4주는 요검체, 3주는 정맥내 카테타 말단 검체에서 분리되었다. 52주 중 41주 (78.8%)가 Hodge 변법에 양성 있었고, EDTA-disk synergy법에 양성인 균주는 없었다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

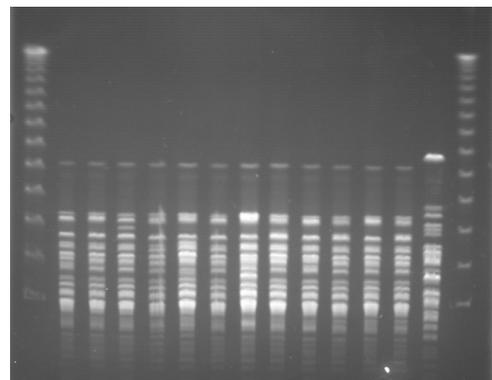


Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Sma*I-digested chromosomal DNA restriction fragments from *A. baumannii* isolates resolved in 1% SeaKem Gold agarose. The gel was run for 20 h at 6 V/cm with pulse times of 0.5 to 60 s. Lane 1 and 15, molecular weight standards of Lambda ladder. Lane 2, Positive control, OXA-23-producing *A. baumannii*. Lane 3, Negative control, imipenem-susceptible *A. baumannii*. Lanes 4-13, *Sma*I-digested chromosomal DNA from *A. baumannii* isolates (A1). Lane 14, *Sma*I-digested chromosomal DNA from *A. baumannii* isolate (C).

Table 1. Characteristics of OXA-23  $\beta$ -lactamase-producing *A. baumannii* isolates

No.	Ward	Source	MICs (mg/L)										PFGE
			AMP	A/S	PIP	CEP	FOX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IMP	
10708	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
11468	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A1
12817	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	C
13710	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A1
13994	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	256	256	32	A1
14190	502	Sputum	>256	64	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A1
14249	502	Urine	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
14615	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
14910	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A1
14911	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A1
15034	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
15289	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	B
15348	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A3
15657	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A5
15929	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A4
14192	351	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	8	A5
14687	511	Wound	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A2
16836	504	Wound	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	32	A4
18031	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A2
17885	502	SCVP tip	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A4
17877	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A4
18909	361	Urine	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A2
19654	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A4
19706	502	Sputum	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A4
20180	341	Catheter	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	32	256	32	A5
15173	352	Wound	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A4
15382	508	Sputum	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	32	256	32	A1
15647	361	Wound	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
21090	502	E-tube	>256	64	>256	>256	>256	>256	>256	64	256	64	A5
21161	504	Wound	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
21115	502	E-tube	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
21312	341	Urine	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
21503	502	Urine	>256	16	>256	>256	>256	128	>256	32	128	32	A1
21846	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
22202	502	Sputum	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
22222	502	E-tube	>256	16	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
16544	502	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	256	>256	64	256	32	A1
23070	509	Sputum	>256	32	>256	>256	>256	32	256	8	4	0.5	A1

\* A/S: Fixed ratio (ampicillin:sulbactam = 2:1)

Abbreviations: catheter, tip of intravenous catheter; AMP, ampicillin; A/S, ampicillin-sulbactam; PIP, piperacillin; CEP, cephalothin; FOX, cefoxitin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; AZT, aztreonam; FEP, cefepime; IMP, imipenem; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Sma*I-digested chromosomal DNA restriction fragments.

### 3. PCR 및 염기서열분석

Imipenem에 내성인 균주 52주를 대상으로 시험하였으

며, metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>IMP</sub> 및 *bla*<sub>VIM</sub> 유전자의 검출을 위한 PCR에 양성을 보인 균주는 없었다. *bla*<sub>OXA-24, -25, -26, -40</sub> 유전자의 검출을 위한 PCR에도 대상균주 모두 음성이었다

며, *bla*<sub>OXA-23, -27</sub> 유전자의 검출을 위한 PCR에서는 Hodge 변법 양성인 41주 중 38주가 양성반응을 보였다 (Fig. 1). PCR 산물의 염기서열은 *A. baumannii* RYC 52763/97 (Genbank accession no. AJ239129)의 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자와 일치하였다.

#### 4. 내성 표현형 및 $\beta$ -lactamase의 pl

*bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 지닌 *A. baumannii* 38주에 대한 imipenem의 MIC는 32-64 mg/L로 모두 내성이었으며, ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam, cefepime 등 시험한  $\beta$ -lactam 항균제 대부분에 내성이었다 (Table 1). 한편 IEF을 통하여서 38주 모두 OXA-23에 해당하는 pl 6.65의  $\beta$ -lactamase를 생성함을 확인할 수 있었다.

#### 5. 염색체형

*bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 지닌 *A. baumannii* 38주는 염색체를 *Sma*I으로 절단하여 PFGE한 결과에 따라서 A1, A2, A3, A4, A5, B 및 C의 7가지 유형으로 분류할 수 있었다. A1형은 21주로 가장 흔하였으며, A4형이 7주, A5형 4주로 분리되었으며, A2형 3주와 A3, B형, C형이 각 1주로 분리되었다 (Table 1, Fig. 2).

### 결론

Carbapenem은  $\beta$ -lactam 제제 중 가장 강력한 항균력을 지니고 있으며, TEM, SHV, PER 등 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase를 생성하는 그람음성간균의 선택치료제로 널리 사용되고 있다[32]. Carbapenem 내성균주의 등장과 확산은 임상적으로 큰 위협으로 간주되고 있다. 1998년 서울의 한 대학병원에서 분리된 *A. baumannii*의 imipenem 내성율은 5%에 불과하였으나[21], 본 연구기간 중 고신대학교 복음병원에서 분리된 *A. baumannii*의 imipenem 내성율은 26.9%에 달하였으며, 이는 imipenem 내성 *A. baumannii*가 급속히 확산하고 있음을 시사한다.

본 연구에서는 carbapenemase 및 metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주의 선별에 Hodge 변법 및 EDTA-disk synergy법을 사용하였다. Hodge 변법은 carbapenemase 생성을 선별하기 위해 사용하였다. 즉, metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주 뿐만 아니라 IMI-1, Sme-1, NmcA  $\beta$ -lactamase 등 class A의 비금속속성 carbapenem 가수분해 효소를 생성하는 균주도 이 시험에서 양성반응을 보인다. EDTA-disk synergy 시험은 metallo- $\beta$ -lactamase의 활성이 EDTA에 의해서 억제되는 원리를 이용하여 이 효소를 생성하는 균주를 선별할 수 있다. 따라서 class A의 비금속속성 carbapenemase를 생성하는 균주는 이 시험에서 음성반응을 보인다.

Metallo- $\beta$ -lactamase는 *A. baumannii*가 carbapenem 내성

을 획득하는 주요 기전으로 간주되고 있다. Metallo- $\beta$ -lactamase는 carbapenem에 대한 가수분해 활성이 있으며 EDTA에 의해서 활성이 억제되기 때문에 이 효소를 생성하는 세균은 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법에 양성반응을 보인다. Yum 등[23]은 VIM-2 및 IMP-1 생성 *A. baumannii* 각각 13주와 1주, 김 등[28]은 VIM-2 및 IMP-1 생성 *A. baumannii* 각각 8주와 9주를 분리하였음을 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 타 연구의 결과와 달리 metallo- $\beta$ -lactamase를 생성하는 *A. baumannii*가 단 1주도 분리되지 않았으며, 이는 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법 모두에 양성인 균주가 없었고, *bla*<sub>IMP</sub> 및 *bla*<sub>VIM</sub> 유전자 검출을 위한 PCR에 양성인 균주가 없음을 통해 확인할 수 있었다. 이와 같은 차이는 지역간 혹은 병원간 만연균주의 분포 차이에 기인하는 것으로 생각한다.

OXA형  $\beta$ -lactamase 중 carbapenem에 대한 가수분해 활성을 지닌 것으로 알려진 효소는 OXA-23, -24, -25, -26, -27 및 -40 등 6종에 불과하다[20]. 이들 효소는 EDTA에 의해서 가수분해 활성이 억제되지 않기 때문에 Hodge 변법에는 양성, EDTA-disk synergy법에는 음성조건을 보인다. 본 연구에서는 OXA형  $\beta$ -lactamase의 유전자 검출을 위해 이들 효소 6종의 염기서열을 분석하였으며, 그 상동성에 따라서 OXA-23과 -27 유전자의 검출을 위한 OXA-23F 및 OXA-23R primer와 OXA-24, -25, -26, -40 유전자의 검출을 위한 OXA-24F 및 OXA-24R primer를 각각 고안하였다.

Hodge 변법 양성인면서 EDTA-disk synergy법에서 음성되었던 균주 중 38주는 OXA-23F 및 OXA-23R primer를 이용한 PCR에 양성반응을 보였으며, 이들 PCR 산물의 염기서열은 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자와 일치하였다. OXA-23은 1985년 영국에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 발견된 효소이며, 발견 초기에는 ARI-1이란 이름으로 불리기도 했다[32]. 2002년에는 프랑스에서 OXA-23을 생성하는 *Proteus mirabilis*가 보고되었으며[33], 2003년에는 이 효소를 생성하는 *A. baumannii*에 의한 감염의 집단발생이 브라질에서 보고되었다[34]. 본 연구의 결과는 국내에도 OXA-23을 생성하는 *A. baumannii*가 광범위하게 확산되고 있음을 시사하며, 이의 감시를 위한 전국적 규모의 조사의 필요성을 절감하게 한다. 본 연구에서 분리된 OXA-23 생성균주 대부분에 대한 imipenem의 MIC는 32mg/mL 이상이었는데, 이는 OXA-23과 세포외막 porin 구조의 변성에 의한 투과도 저하가 결합된 결과로 추측된다[35].

본 연구에서 분리된 OXA-23 생성 *A. baumannii* 38주 중 21주는 항균제 감수성 양상이 유사하고 *Sma*I 효소에 의해서 동일한 절단양상(A1)을 보였고 A4형 7주와 A5 4주, A2 3주로 부분적인 집단감염이 있었음을 확인할 수 있었다. 즉, 이들 균주는 중환자실을 중심으로 외과계 병동에서 환자의 호흡기, 요로, 창상 등에 집단감염을 일으킨 것으로 보인다. 또한 A1의 변종들과 B형, C형, D형 균

주의 발견은 OXA-23을 생성하는 *A. baumannii*가 토착화되고 있음을 시사한다.

이상의 결과에서 국내에서 분리되는 *A. baumannii* 중 OXA-23  $\beta$ -lactamase 생성에 의해서 imipenem 내성을 획득한 균주가 혼함을 확인할 수 있었다. 이 효소를 생성하는 균주의 확산은 *A. baumannii* 감염증에 대한 carbapenem의 치료 유용성을 제한할 것으로 우려되며, 지속적인 감시와 내성세균 확산 억제책 마련이 필요한 것으로 생각된다.

## 요 약

**배 경 :** *Acinetobacter baumannii*는 포도당 비발효 그람음성간균이며 병원감염의 흔한 원인균이다. 근래 metallo- $\beta$ -lactamase 혹은 OXA형  $\beta$ -lactamase 생성에 의해서 carbapenem에 대한 내성을 획득한 세균이 증가하고 있어서 임상적으로 심각한 위협이 되고 있다. 그러나 국내에서 분리되는 *A. baumannii*의 이들 carbapenemase 생성 현황에 대한 조사는 매우 드물다. 본 연구에서는 종합병원 환자의 검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 imipenem에 대한 내성 현황을 조사하고, 그 내성기전을 규명하고자 하였다.

**방 법 :** 2003년 1월-9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상 검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 imipenem에 대한 감수성을 조사하였다. Carbapenemase와 metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주의 선별을 위해서 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy 시험을 수행하였고, 한천희석법으로 최소억제농도를 측정하였다. 내성 유전형의 규명을 위해서 IMP, VIM 및 OXA형 유전자 검출을 위한 중합연쇄반응을 시행하였으며, dideoxy-chain termination법으로 OXA형  $\beta$ -lactamase 유전자의 염기서열을 분석하였다. Isoelectric focusing으로  $\beta$ -lactamase의 등전점을 측정하였으며, *Sma*I으로 절단한 염색체 DNA를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)하였다.

**결 과 :** 시험기간 중 총 193주의 *A. baumannii*가 임상 검체에서 분리되었으며, 이 중 52주 (26.9%)가 imipenem에 내성이었다. Imipenem에 내성인 52주 중 41주 (78.8%)가 Hodge 변법 양성이었으며, EDTA-disk synergy법에 양성인 균주는 없었다. Hodge 변법 양성인 41주 중 38주는 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 지니고 있었으며, IMP형 및 VIM형의 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자 양성인 균주는 없었다. *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 지니고 있는 균주는 pl 6.65의 nitrocefim 양성 band를 생성함을 isoelectric focusing으로 확인할 수 있었다. *Sma*I으로 절단시 36주의 PFGE양상이 유사하였다.

**결 론 :** 임상검체에서 분리된 *A. baumannii* 38주는 OXA-23  $\beta$ -lactamase 생성에 의해서 imipenem 내성을 획득하였음을 확인할 수 있었으며, 이 중 36주는 유사한 염색체형을 지니고 있어서 동일감염원에서 유래된 것으로 추측되었다. OXA-23을 생성하는 균주는 본 연구를 통해

국내에서 처음 확인되었다.

## 참 고 문 헌

- Schreckenberger PC and von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology 1999;539-60.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-61.
- Naas T, and Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7693-7.
- Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262-70.
- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-46.
- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O' Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2080-6.
- Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Padoin C, Louchahi K, Petitjean O, et al. Efficacies of Imipenem, Meropenem, Cefepime, and Ceftazidime in Rats with Experimental Pneumonia Due to a Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase-Producing Strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:885-90.
- Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3881-9.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51.
- Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cor-

- naglia G, Fontana R et al. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1229-35.
11. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ETS, Palepou MFI, Lyon DJ, Wooford N, et al. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:710-4.
  12. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584-90.
  13. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891-7.
  14. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224-8.
  15. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Choi JR, Chong Y, et al. Emerge of VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* in Korea. In: Program and abstracts, 40th Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother 2000; Abstr 2003.
  16. Lee K, Yum JH, Tong D, Kim JM, Chong Y, Rossolini GM. Spreading of integron borne metallo- $\beta$ -lactamase gene among gram-negative bacilli in Korea. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease 2001; Abstr 1329.
  17. Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of Enterobacter cloacae. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:397-400.
  18. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:196-9.
  19. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1556-61.
  20. H ritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:268-73.
  21. Chong Y, Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. *J Infect Chemother* 2000;6:189-95.
  22. 홍성근, 용동은, 이경원, 김의중, 이위교, 정석훈 등. 국내 여러 지역 병원의 임상검체에서 분리된 주요 세균의 항균제 내성율. *대한임상미생물학회지* 2003;6(1):29-36.
  23. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:837-40.
  24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informational supplement. M100-S11. Pennsylvania: NCCLS, 2001.
  25. Lee K, Chong Y, Shin HB, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:204-7.
  26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. M7-A5. Pennsylvania: NCCLS, 2000.
  27. Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975;88:169-78.
  28. 김지혜, 정석훈, 김빛나, 정태전, 김택상, 김종철 등. 임상검체에서 분리된 imipenem 내성 *Acinetobacter* 생성 metallo- $\beta$ -lactamase의 유전형. *감염* 2002;33:360-6.
  29. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
  30. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Popolo AD, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *J Clin Microbiol* 2004;42:946-53.
  31. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin*

- Microbiol 1995;33:2233-9.
32. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob 1993;2:81-8.
33. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, et al. Chromosome encoded class D  $\beta$ -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2004-6.
34. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol 2003;41:3403-6.
35. Bou G, Cervera G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol 2000; 38:3299-305.