

## Imipenem 내성 *Pseudomonas aeruginosa*의 분리 현황과 내성 획득 기전

윤외숙<sup>1</sup>, 이보영<sup>1</sup>, 배일권<sup>2</sup>, 권수봉<sup>2</sup>, 정석훈<sup>2,3\*</sup>, 정태전<sup>2</sup>, 정연옥<sup>3</sup>

고신대학교 의과대학 소아과학교실<sup>1</sup>, 진단검사의학교실<sup>2</sup>, 고신대학교 복음병원 적정진료관리실<sup>3</sup>

**배 경** : Carbapenem에 내성인 *Pseudomonas aeruginosa*의 출현 및 확산은 이 세균에 의한 감염증 치료의 어려움을 가중시킬 수 있으므로 임상적으로 중대한 문제이다. 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *P. aeruginosa*를 대상으로 carbapenem에 대한 내성 현황을 조사하고 이들 내성세균이 생성하는 carbapenemase의 유전형을 규명함으로써 이 세균의 치료지침과 내성세균의 확산 방지책을 마련하는데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

**방 법** : 2004년 6월에서 9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 *P. aeruginosa*를 대상으로 하였다. 항균제 감수성은 디스크 확산법, carbapenemase 생성균주 선별은 Hodge 변법, metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주 선별은 EDTA-disk synergy법으로 시험하였다. 최소억제농도는 한천희석법으로,  $\beta$ -lactamase의 pI는 isoelectric focusing으로 측정하였다. Carbapenemase의 유전형은 PCR 증폭산물의 염기서열을 분석하여 확인하였다.

**결 과** : 시험기간 중 총 77주의 *P. aeruginosa*가 분리되었다. Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법에 각각 22주(55.0%)와 15주(37.5%)가 양성반응을 보였으며, 12주는 *bla*<sub>IMP-1</sub>, 15주는 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 지니고 있었다. OXA-23 생성 *P. aeruginosa*에 대한 imipenem 및 meropenem의 MIC 범위는 각각 8-16  $\mu$ g/mL 및 2-32  $\mu$ g/mL였고, IMP-1 생성 균주에 대한 MIC는 각각 2-256  $\mu$ g/mL 이상 및 2-128  $\mu$ g/mL였다.

**결 론** : 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *P. aeruginosa*는 OXA-23 혹은 IMP-1의 생성에 의해서 imipenem에 대한 내성을 흔히 획득함을 확인할 수 있었다. 이들 내성세균의 확산과 새로운 내성기전의 출현을 감시하기 위한 주기적인 조사가 필요한 것으로 생각한다.

### 서 론

*Pseudomonas aeruginosa*는 호기성의 포도당 비발효 그람음성간균으로 병원감염의 주요 원인균이다. 이 세균은 자연계에 널리 분포하고 있으며, 병원내에서는 수분이 많은 환경에 흔히 존재한다. *P. aeruginosa*에 의한 감염은 대부분 기회감염이며, 외이도염, 골수염, 뇌수막염, 심내막염, 폐렴, 요로감염, 균혈증 등 다양한 유형의 감염증을 유발한다[1]. *P. aeruginosa*는 특징적인 세포외막 porin[2]과 염색체성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성[3]으로 인하여 광범위  $\beta$ -lactam 항균제 일부를 포함한 다양한  $\beta$ -lactam 항균

제에 내재적 내성이다. Ceftazidime, piperacillin, ticarcillin 등 일부 광범위 항균제는 이 세균에 대한 강한 활성을 지니고 있지만[4], 세포외막 porin 구조의 변성, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성 등 다양한 기전에 의하여 이들 항균제에 내성을 획득한 균주가 증가하였다[5]. Carbapenem은 그람음성세균이 생성하는  $\beta$ -lactamase 대부분에 안정하며, 표적물질인 penicillin-binding protein과의 친화도가 높기 때문에 이들 내성세균의 선택치료제로 사용되고 있다[6]. 그러나 근래 carbapenem에 대한 내성을 획득한 균주가 증가하여서 임상적으로 심각한 위협이 되고 있다.

*P. aeruginosa*가 carbapenem에 대한 내성을 획득하는 가장 중요한 기전은  $\beta$ -lactamase 생성이다. Class A의 GES-2, GES-3 및 GES-4[7-9], class B의 VIM 혹은 IMP metallo- $\beta$ -lactamase[10-13], class D의 OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27 및 OXA-40  $\beta$ -lactamase는 *P. aeruginosa*가 생성하는 대표적인 carbapenemase이다.

GES형 ESBL은 1998년 프랑스에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*에서 처음 검출되었다. GES-1으로 명명된 이

본 연구는 2004년 식약청 위탁과제 지원에 의하여 이루어진 것임(04062항 내안673).

접 수 일: 05/1/13 게재승인일: 05/1/21

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

효소는 carbapenem에 대한 활성이 없는데, 2000년 남아프리카 공화국에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 검출된 GES-2는 GES-1에 비하여 아미노산 하나만 치환된 것이지만 imipenem에 대한 활성이 있다[5]. 2002년 일본에서 분리된 *K. pneumoniae*에서 검출된 GES-3과 GES-4 역시 imipenem에 대한 활성이 있다[8, 9]. 국내에서는 아직 GES형 ESBL의 검출 보고가 없다.

*P. aeruginosa*가 생성하는 class B metallo- $\beta$ -lactamase는 1988년 일본에서 처음 발견되었으며[14], imipenem을 가수분해하는 효소라는 의미에서 IMP-1으로 명명되었다. 그 후 일본을 비롯한 여러 나라에서 변종 IMP를 생성하는 *P. aeruginosa*와 장내세균이 분리되었으며[10, 11], 현재까지 10여종의 IMP가 보고되었다. 1999년 이탈리아에서는 새로운 metallo- $\beta$ -lactamase인 VIM-1을 생성하는 *P. aeruginosa*가 분리되었으며[15], 그 후 프랑스와 그리스에서 VIM-2를 생성하는 *P. aeruginosa*, 대만에서는 VIM-3를 생성하는 *P. aeruginosa*가 보고되었다[12, 13]. 국내에서는 VIM-2를 생성하는 *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter genomospecies 3*, *Serratia marcescens* 및 *Enterobacter cloacae*가 보고된 바 있다[16-20].

Class D의 OXA형  $\beta$ -lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대한 활성이 강한 특성이 있다. OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27 및 OXA-40 등 일부 OXA형  $\beta$ -lactamase는 carbapenem에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 알려졌다. OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 확인되었으며, 처음에는 ARI-1으로 불리우다 최근 OXA-23으로 개명되었다[21]. OXA-24는 1997년 스페인에서 집단감염을 일으킨 imipenem 내성 *A. baumannii* 균주에서 분리되었다[22]. 이들 효소의 염기서열 상동성에 따라 OXA-23, OXA-27과 OXA-24, OXA-25, OXA-26 및 OXA-40의 두 군으로 나눌 수 있으며, 두 군간 상동성(60%)은 높지 않다[23]. 국내에서는 2004년 전 등[24]이 OXA-23  $\beta$ -lactamase 생성에 의해 imipenem 내성을 획득한 *A. baumannii*가 국내에 혼입을 보고하였으나 OXA형 carbapenemase를 생성하는 *P. aeruginosa*에 대한 보고는 아직 없다.

Carbapenem에 내성인 *P. aeruginosa*의 출현 및 확산은 이 세균에 의한 감염증 치료의 어려움을 가중시킬 수 있는 임상적으로 중대한 문제이다. 이에 본 연구에서는 고신대학교 복음병원에서 분리되는 *P. aeruginosa*를 대상으로 carbapenem에 대한 내성 현황을 조사하고 이들 내성 세균이 생성하는 carbapenemase의 유전형질을 규명함으로써 이 세균의 치료지침과 내성세균의 확산 방지책을 마련하는데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2004년 6월에서 9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 *P. aeruginosa*를 대상으로 하였다. 균종 동정은 전통적인 생화학적 방법으로 하였으며[25], Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)로 동정을 확인하였다.

## 2. 방법

### 1) 항균제 감수성 시험

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 권장에 따라서 디스크 확산법[26]으로 시험하였다. 즉, 시험세균을 MacConkey 한천 (Difco, Detroit, Mich., USA)에 계대배양하여 1개의 독립된 집락을 백금침으로 채취한 후, Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여 0.5 McFarland로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 접종한 후, 시험항균제 디스크를 놓았다. 세균이 접종된 배지는 35℃ 항온기에 18시간 배양하고, 각 항균제 디스크 주위에 생긴 억제대의 크기를 측정 후 NCCLS 기준에 따라 감수성을 판정하였다. 항균제 디스크로는 piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, meropenem, imipenem, gentamicin, tobramycin 및 amikacin 디스크 (이상 BBL, Cockeysville, Md., USA)를 사용하였다. 정도관리를 위하여 표준균주 *Escherichia coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

### 2) Carbapenemase 생성균주 선별

Hodge 변법으로 carbapenemase 생성균주를 선별하였다[27]. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 0.5 McFarland로 맞추는 후 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 고르게 접종하였다. 배지의 중앙에 imipenem 디스크 (30  $\mu$ g, BBL)를 놓은 후, 시험균주를 백금침으로 디스크로부터 평판의 가장자리로 한 줄로 굽게 접종하였다. 35℃로 호기성 환경에서 18시간 배양 후 시험균주 접종 선 중앙쪽 말단부가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되면 양성으로 판정하였다.

### 3) Metallo- $\beta$ -lactamase 생성 선별시험

Lee 등[27]의 방법에 따라서 EDTA-disk synergy 시험으로 선별하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, TSB에 접종하여 0.5 McFarland로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, EDTA 디스크 (5 mM)를 가운데 두고 imipenem과 meropenem 디스크 (각 30  $\mu$ g, BBL)를 양옆에 두되 가장자리 간격이 1.5 cm가 되도록 배치하였다. 세균이 접종된 배지는 35℃ 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

### 4) 최소억제농도(minimum inhibitory concent-

## ration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 MIC를 측정하였다[28]. 시험항균제로는 piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, meropenem 및 imipenem을 사용하였다. 시험균주  $10^4$  colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256  $\mu\text{g/mL}$  농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, Pa., USA)로 접종하였다. 37℃ 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 정도관리를 위하여 표준균주인 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

## 5) Isoelectric focusing (IEF)

$\beta$ -Lactamase 생성의 확인을 위해서 IEF를 시행하였으며 Matthew 등[29]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  $\mu\text{g/mL}$ ) nitrocefin 용액 (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, Md., USA)에 염색하여  $\beta$ -lactamase의 pI를 측정하였다.

## 6) 분자유전학적 방법에 의한 $\beta$ -lactamase 유전형 시험

$\beta$ -Lactamase 유전형은 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 시험하였다. IMP-1, VIM-2, OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27 및 OXA-40의 검출을 위해서는 기존의 시발체를 사용하였다[24, 30]. GES형 ESBL 검출을 위해서는 새로운 시발체 IG F와 IG R을 고안하였다(Table 1). GES형 ESBL의 염기서열은 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 결정하였다. DNASpace version 3.02 (Genetic Systems, Hitachi, Japan)와 Vector NTI Suite (InforMax, Frederick, Md., USA)을 사용한 multialignment 분석 결과에 기초하여 ESBL 유전자의 특이적인 부분을 시발체로 고안하였다. 고안된 시발체와 ESBL 유전자의 염기서열 동정은 BLAST로 분석하였다. 시험세균을 TSB에 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕배양하였다.

배양액 1 mL를 취하여 5분간  $13,000 \times g$ 로 원침 후, 상층액은 버리고 침사는 증류수 500  $\mu\text{L}$ 에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후  $13,000 \times g$ 로 원침하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5  $\mu\text{L}$ , primer 각 1  $\mu\text{L}$ , deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 2.5 mM (8  $\mu\text{L}$ ), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5  $\mu\text{L}$ ), 10X buffer 10  $\mu\text{L}$  및 증류수 75.5  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)으로 94℃로 25초간 denaturation, 58℃로 40초간 annealing, 72℃로 50초간 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다. 증폭산물 10  $\mu\text{L}$ 를 2% agarose gel (Promega, Madison, Wi., USA)의 홈에 넣고 40분간 전기영동하여서 band를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 agarose gel에서 분리 후, Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, Oh., USA)를 이용하여 dideoxy-mediated chain termination 법[31]으로 양방향으로 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 항균제 감수성

시험기간 중 총 77주의 *P. aeruginosa*가 분리되었다. 이들 균주의 piperacillin, ceftazidime, cefepime, aztreonam 및 imipenem에 대한 내성률은 각각 38.9%, 29.8%, 25.9%, 29.8% 및 31.2%이었다. 또한 aminoglycoside 계열의 gentamicin, tobramycin 및 amikacin에 대한 내성률은 각각 44.2%, 44.2% 및 29.9%이었다(Table 2).

### 2. Hodge 변법 및 EDTA-disk synergy법

수집된 균주 중 imipenem 혹은 meropenem에 중간 또는 내성인 균주 40주를 대상으로 하였다. 이들 균주 중 24주는 imipenem에 내성, 32주는 meropenem에 내성이었으며, 16주는 두 항균제 모두에 내성이었다. Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법에 각각 22주(55.0%)와 15주(37.5%)

Table 1. Sequences of the PCR primers

Name	Nucleotide Sequence	Product size (bp)	Accession No.	References
IMP-F	5'-cat ggt ttg gtg gtt ctt gt-3'	429	AB188812	30
IMP-R	5'-ata att tgg cgg act ttg gc-3'			
VIM-F	5'-att ggt cta ttt gac cgc gtc-3'	780	AY507153	30
VIM-R	5'-tgc tac tca acg act gag cg-3'			
OXA-23F	5'-gat gtg tca tag tat tcg tcg-3'	1058	AJ132105	24
OXA-23R	5'-tca caa caa cta aaa gca ctg-3'			
OXA-24F	5'-gta cta atc aaa gtt gtg aa-3'	1003	AY228470	24
OXA-24R	5'-ttc ccc taa cat gaa ttt gt-3'			
IG F	5'-gtt aga cgg gcg tac aaa gat aat-3'	903	AY260546	This study
IG R	5'-tgt ccg tgc tca gga tga gt-3'			

**Table 2.** Antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates (n=77)

Antimicrobial agents	% Susceptibilities	
	Intermediate	Resistant
Piperacillin	0.0	38.9
Piperacillin-tazobactam	0.0	40.6
Ceftazidime	5.2	29.8
Cefotaxime	36.2	57.4
Cefepime	10.4	25.9
Aztreonam	20.8	29.8
Meropenem	2.6	41.6
Imipenem	12.9	31.2
Gentamicin	2.6	44.2
Tobramycin	0.0	44.2
Amikacin	2.6	29.9

가 양성반응을 보였다. EDTA-disk synergy 양성인 균주 모두는 Hodge 변법에도 양성이었다.

### 3. $\beta$ -lactamase 유전형 및 효소의 pl

OXA-23과 OXA-27을 검출하기 위한 PCR에서는 15주, IMP-1을 검출하기 위한 PCR에서는 12주가 양성반응을 보였다. OXA-24, OXA-25, OXA-26 및 OXA-40, GES형  $\beta$ -lactamase 및 VIM-2를 검출하기 위한 PCR에 양성반응을 보인 균주는 없었다. 6주는 OXA-23, OXA-27 PCR과 IMP-1 PCR에서 동시에 양성반응을 보였다. EDTA-disk synergy법에 양성인 15주 중 3주에서는 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자가 검출되지 않았다. OXA-23, OXA-27 PCR의 증폭산물의 염기서열은 모두 *A. baumannii* RCY 52763/97

**Table 3.** Characteristics of *P. aeruginosa* isolates carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> genes

Isolate	Specimen	EDTA	Hodge	MIC ( $\mu$ g/mL)						
				PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA	FEP	MEM	IMP
K20756	Resp	-	-	16	8	4	8	8	8	8
K20897	Resp	+	+	16	8	4	8	8	8	8
K2902B	Blood	-	-	>256	256	32	128	>256	16	16
K21652	Resp	-	+	>256	128	32	64	32	8	8
K22053	Resp	-	+	>256	128	32	64	64	16	8
K22842*	Resp	+	+	8	4	4	4	2	2	8
K23413*	Resp	+	+	8	4	2	4	4	2	8
K25430*	Resp	+	+	16	8	8	16	32	8	16
K24555	Urine	-	+	>256	256	32	64	>256	32	16
K25752	Urine	-	+	>256	256	32	128	>256	32	16
K19027*	Resp	+	+	16	8	8	8	8	8	16
K19204	Pus	-	+	>256	256	32	64	>256	32	16
K19446	Wound	-	+	128	64	32	32	16	8	16
K20371*	Resp	+	+	16	8	4	8	8	8	16
K21500*	Urine	+	+	>256	256	32	128	>256	32	16

Abbreviations: EDTA, EDTA disk-synergy test; Hodge, modified Hodge method; MIC, minimum inhibitory concentration; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime-clavulanic acid; FEP, cefepime; MEM, meropenem; IMP, imipenem; Resp, respiratory specimens.

\* Isolates carried both of *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes, simultaneously.

**Table 4.** Characteristics of *P. aeruginosa* isolates carrying *bla*<sub>IMP-1</sub> genes

Isolate	Specimen	EDTA	Hodge	MIC ( $\mu$ g/mL)						
				PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA	FEP	MEM	IMP
K22842*	Resp	+	+	8	4	4	4	2	2	8
K23413*	Resp	+	+	8	4	2	4	4	2	8
K23529	Resp	+	+	4	2	1	4	2	2	8
K24246	Resp	+	+	>256	128	16	32	64	128	>256
K24466	Resp	+	+	4	2	1	2	2	2	2
K24857	Wound	+	+	64	32	>256	>256	128	4	8
K25375	Resp	+	+	64	8	4	32	8	8	8
K25430*	Resp	+	+	16	8	8	16	32	8	16
K25447	Resp	+	+	>256	256	2	4	>256	8	4
K19027*	Resp	+	+	16	8	8	8	8	8	16
K20371*	Resp	+	+	16	8	4	8	8	8	16
K21500*	Urine	+	+	>256	256	32	128	>256	32	16

Abbreviations: See Table 3.

\* Isolates carried both of *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes, simultaneously.

(GenBank accession no. AJ239129)의 OXA-23 유전자와 일치하였다[32]. 또한 IMP-1 PCR의 증폭산물의 염기서열은 모두 *P. aeruginosa* DU40799/00 (GenBank accession no. AY168635)의 IMP-1 유전자와 일치하였다. OXA-23이나 IMP-1 유전자가 검출된 균주에서는 IEF를 통해 각 효소에 해당하는 pI 6.7 혹은 9.0의 band를 확인할 수 있었다.

#### 4. Carbapenemase 생성 *P. aeruginosa*의 특성

OXA-23 생성 *P. aeruginosa*에 대한 imipenem 및 meropenem의 MIC 범위는 각각 8-16  $\mu\text{g/mL}$  및 2-32  $\mu\text{g/mL}$ 였고, IMP-1 생성 균주에 대한 이들 carbapenem의 MIC는 각각 2-256  $\mu\text{g/mL}$  이상 및 2-128  $\mu\text{g/mL}$ 였다(Table 3, 4).

### 고 찰

시험기간 중 분리된 *P. aeruginosa*의 ceftazidime과 cefepime의 내성률은 각각 29.8%와 25.9%로 2003년 전국 12개 병원을 대상으로 한 조사[33]의 21%와 25%와 유사하였다. Cefotaxime과 aztreonam의 내성률은 각각 57.4%와 29.8%로 2003년 조사에 비해서 낮았으나 중간인 균주의 비율이 36.2%와 41.6%로 2003년 조사의 25%와 26%에 비해 높았다.

Hodge 변법은 carbapenemase 생성을 선별하기 위해 사용하였다. 즉, metallo- $\beta$ -lactamase 생성균주 뿐 아니라 GES형 class A ESBL과 일부 OXA형 class D ESBL 등 비금속성 carbapenemase를 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 A나 class D의 비금속성 carbapenemase를 생성하는 균주는 이 시험에서 음성반응을 보인다. 본 연구에서는 15주가 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법 모두에 양성반응을 보여 class B metallo- $\beta$ -lactamase를 생성함을 추측할 수 있었다. 그러나 12주에서 *bla*<sub>IMP-1</sub> 유전자를 확인하였을 뿐 3주에서는 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자를 검출하는데 실패하였다. 또한 Hodge 변법에 양성인 *P. aeruginosa* 22주 중 3주에선 carbapenemase를 검출하지 못하였다. 이들 균주의 내성기전 확인을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

Hodge 변법 양성이었던 *P. aeruginosa* 22주 중 15주는 OXA-23F 및 OXA-23R primer를 이용한 PCR에 양성반응을 보였으며, 이들 PCR 산물의 염기서열은 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자와 일치하였다. OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 발견된 효소이며, 발견초기에는 ARI-1이란 이름으로 불리기도 했다[21]. 2002년에는 프랑스에서 OXA-23을 생성하는 *Proteus mirabilis*가 보고되었으며, 2003년에는 이 효소를 생성하는 *A. baumannii*에 의한 감염의 집단발생이 브라질에

서 보고되었다. 국내에서는 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*가 이 효소를 흔히 생성한다고 알려졌으며, 이 효소를 생성하는 *P. aeruginosa*는 본 연구를 통해서 국내에서 처음 분리되었다. 본 연구의 결과는 국내에도 OXA-23을 생성하는 *P. aeruginosa*가 확산되고 있음을 시사하며, 이의 감시를 위한 전국적 규모의 조사의 필요성을 절감하게 한다.

인접한 일본에서는 IMP-1을 생성하는 그람음성세균의 분리가 흔한 것으로 알려지는데 반하여[34], 국내에서의 IMP-1 생성균주의 분리는 흔하지 않다. Kim 등은 부산의 종합병원에서 IMP-1 생성 *A. baumannii*의 분리를 보고한 바 있으며[30], Lee 등[35] 또한 국내에 IMP-1 생성 *A. baumannii*가 드물지 않다고 하였다. 그러나 국내에서는 이 효소를 생성하는 *P. aeruginosa*는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 기존의 보고와 달리 국내 환자의 임상검체에서 *bla*<sub>IMP-1</sub> 유전자를 갖고 있는 다수의 *P. aeruginosa*가 검출되었는데, 이 결과는 국내에서도 IMP-1 생성에 의해서 carbapenem에 대한 내성을 획득한 *P. aeruginosa*의 감염이 확산되고 있음을 보여준다.

VIM 혹은 IMP metallo- $\beta$ -lactamase 유전자는 흔히 다른 내성 유전자 cassette와 함께 class 1 integron을 구성한다[36]. Integron은 유전자 cassette를 통합(integration)하고 이동시킬 수 있는 유전적 요소이므로, integron에 포함된 내성 유전자는 clone성 확산 뿐 아니라 균종간 수평적 확산에 의해서도 내성이 전달될 수 있다. 본 연구에서 검출된 *bla*<sub>IMP-1</sub> 유전자 역시 integron에 의해서 운반되는 것으로 추측되며, 이들 내성유전자를 지닌 *P. aeruginosa*의 감염 역학을 확인하기 위한 integron에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *P. aeruginosa*는 OXA-23 혹은 IMP-1의 생성에 의해서 imipenem에 대한 내성을 흔히 획득함을 확인할 수 있었다. 이들 내성세균의 확산과 새로운 내성기전의 출현을 감시하기 위한 주기적인 조사가 필요한 것으로 생각한다.

### 참 고 문 헌

1. Bergogne-Berezin E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram-negative bacilli. In : Cohen J and Powerly WG, eds. Infectious Diseases. 2nd ed. New York: Mosby, 2004:2203-26.
2. Satake S, Yoshihara E, Nakae T. Diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:685-90.
3. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother

- 1992;36:2046-8.
4. Chamberland SL, Ecuyer J, Lessard C, Bernier M, Provencher P, Bergeron MG. Antibiotic susceptibility profiles of 941 gram-negative bacteria isolated from septicemic patients throughout Canada. The Canadian Study Group. Clin Infect Dis 1992;15:615-28.
5. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2385-92.
6. Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1697-704.
7. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2598-603.
8. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A  $\beta$ -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1960-7.
9. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A  $\beta$ -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the  $\Omega$ -loop. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2905-10.
10. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia 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 ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford 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. 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.
13. 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.
14. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
15. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM-1</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1584-90.
16. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1053-8.
17. Yum JH, Yong D, Lee K, Kim HS, Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;42:217-9.
18. 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.
19. 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.
20. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003;41:4623-9.
21. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, 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.
22. 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.
23. Heritier 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.
24. Jeon BC, Kwon KY, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho BK, et al. Prevalence of OXA-23 extended-spectrum  $\beta$ -

- lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:139-47.
25. 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.
  26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. ed. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informational supplement. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001:M100-S11.
  27. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, 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;7:88-91.
  28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. ed. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000:M7-A5.
  29. Mathew A, 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.
  30. Kim JH, Jeong SH, Kim BN, Jeong TJ, Kim TS, Kim JC, et al. Genotypes of metallo- $\beta$ -lactamase produced by imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from clinical specimens. Korean J Infect Dis 2002;34:360-6.
  31. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
  32. 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.
  33. Hong SG, Lee J, Yong D, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, et al. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:171-7.
  34. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:824-9.
  35. Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;50:51-8.
  36. Bennett PM. Integron and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J Antimicrob Chemother 1999;43: 1-4.



## Prevalence of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates and Mechanisms of Resistance

Woe Sook Yoon<sup>1</sup>, Bo Young Lee<sup>1</sup>, Il Kwon Bae<sup>2</sup>, Su Bong Kwon<sup>2</sup>, Seok Hoon Jeong<sup>2,3\*</sup>,  
Tae Jeon Jeong<sup>2</sup>, and Yeon Wook Jung<sup>3</sup>

*Departments of Pediatrics<sup>1</sup> and Laboratory Medicine<sup>2</sup>, Kosin University College of Medicine, Busan; Department of Quality Improvement<sup>3</sup>, Kosin University Gospel Hospital, Busan, Korea*

**Background:** Spread of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates is an important clinical threat. The aim of this study is to survey the prevalence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates in a university hospital, Busan, Korea, and to determine the mechanisms of the resistance.

**Methods:** *P. aeruginosa* isolates from the patients in Kosin University Gospel Hospital were collected during the period of June through September, 2004. Antimicrobial susceptibilities were tested by the disk diffusion method, and production of carbapenemase and metallo- $\beta$ -lactamase was determined by the modified Hodge and EDTA-disk synergy tests, respectively. MICs were determined by the agar dilution method, and pIs of  $\beta$ -lactamases were determined by the isoelectric focusing. Genotypes of carbapenemases were determined by direct sequencing of amplified products.

**Results:** A total of 77 clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected. Twenty-two (55.0%) and 15 (37.5%) isolates showed positive results in the modified Hodge and EDTA-disk synergy tests, respectively. Searches for *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes showed positive results in 15 and 12 isolates, respectively. MIC ranges of imipenem and meropenem to OXA-23-producing isolates were 8-16  $\mu$ g/mL and 2-32  $\mu$ g/mL, respectively, and those to IMP-1-producing isolates were 2- $\geq$ 256  $\mu$ g/mL and 2-128  $\mu$ g/mL, respectively.

**Conclusion:** Production of OXA-23 or IMP-1 is the most prevalent mechanism of imipenem-resistance in *P. aeruginosa* isolates in a university hospital, Busan, Korea. Periodical surveys are necessary to monitor the spreading of imipenem-resistant isolates and emerging new mechanisms of imipenem-resistance. (*Korean J Clin Microbiol* 2005;8(1):26-33)

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, IMP-1, OXA-23, Imipenem-resistance

Address reprint requests to : Seok Hoon Jeong, M.D., Department of Laboratory Medicine, Kosin University College of Medicine,  
34 Amnam-Dong, Suh-Gu, Busan 602-702, Korea.  
Tel. 82-51-990-6373 Fax. 82-51-990-3034 E-mail: kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr