

OXA-23 혹은 IMP-1 β -Lactamase 생성 *Acinetobacter baumannii*에 의한 감염의 분자 역학

박광옥¹, 손한철², 배일권³, 정석훈³

부산대학교병원 의료질관리실¹, 부산대학교 의과대학 진단검사의학교실²,
고신대학교 의과대학 진단검사의학교실³

배 경 : 본 연구에서는 부산의 한 종합병원에서 분리된 *Acinetobacter baumannii*를 대상으로 imipenem 내성현황을 조사하고 내성 획득 기전을 규명하고자 하였다.

방 법 : 2004년 6월에서 9월에 부산의 한 종합병원 환자의 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 하였다. 항균제 감수성은 디스크 확산법과 한천희석법으로 시험하였다. Carbapenemase와 metallo- β -lactamase 생성 균주의 선별을 위하여 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy 시험을 시행하였다. IMP, VIM 및 OXA형 유전자 검출을 위한 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였으며, PCR 산물의 염기서열 분석을 통하여 유전형을 확인하였다. Isoelectric focusing으로 β -lactamase의 등전점을 측정하였으며, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR로 균주의 역학적 연관성을 조사하였다.

결 과 : 시험기간 중 총 58주의 *A. baumannii*가 임상검체에서 분리되었으며, 이 중 14주 (24.1%)가 imipenem에 내성이었다. Imipenem 내성 14주 중 9주는 Hodge 변법에 양성이었으며, 이 중 2주는 EDTA-disk synergy법도 양성이었다. Hodge 변법에 양성인 7주는 *bla*_{OXA-23} 유전자를 지니고 있었으며, 나머지 두주는 *bla*_{IMP-1} 유전자를 지니고 있었다. OXA-23을 생성하는 7주와 IMP-1을 생성하는 2주는 ERIC PCR에서 각각 동일한 band 양상을 보였다.

결 론 : 임상검체에서 분리된 *A. baumannii* 9주는 OXA-23 혹은 IMP-1 β -lactamase 생성에 의해서 imipenem 내성을 획득하였음을 확인할 수 있었으며, ERIC PCR을 통하여 OXA-23과 IMP-1 생성 균주는 각각 동일감염원에서 유래되었음을 확인할 수 있었다.

서 론

*Acinetobacter baumannii*는 폐렴, 패혈증, 심내막염, 요로감염, 창상감염, 수막염 등 다양한 유형의 감염증을 유발하며, *Pseudomonas aeruginosa*에 이어 두 번째로 흔히 병원감염을 유발하는 포도당 비발효 그람음성간균이다 [1]. *A. baumannii*는 여러 항균제에 대해 내재성 혹은 획득 내성을 지니고 있기 때문에 이 세균에 의한 감염증의 치료는 쉽지 않다[2,3]. Imipenem은 세포외막의 porin을 용이하게 투과하고, penicillin-binding protein과의 친화도가 높으며, 그람음성간균이 생성하는 β -lactamase에 대한 안정성이 여타의 β -lactam 항균제에 비해서 상대적으로 높

기 때문에 항균제 다제내성 *A. baumannii*에 의한 감염증의 선택 치료제로 사용되어 왔다[1,4-6]. 그러나 최근 국내 대형병원에서는 imipenem에 대한 내성을 획득한 *A. baumannii*가 확산되고 있어서 임상적으로 심각한 위협이 되고 있다.

*A. baumannii*가 imipenem에 대한 내성을 획득하는 가장 중요한 기전은 β -lactamase의 생성이다[7-9]. Ambler class B의 IMP, VIM, SPM, GIM 등 metallo- β -lactamase는 그람음성간균이 생성하는 대표적인 carbapenemase이다. 이들 효소는 penicillin, 헤파임 및 광범위 cephalosporin, carbapenem 등 aztreonam을 제외한 β -lactam 항균제 대부분에 가수분해 활성이 있으며, EDTA에 의해서 활성이 억제되는 특성이 있다. IMP형 metallo- β -lactamase는 1988년 일본에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 발견되었으며[10], 지금까지 17가지 이상의 변종이 보고되었다. VIM형 metallo- β -lactamase는 1999년 이태리에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 발견되었으며[11], 현재까지 11가지 변종이 보고되었다. 최근에는 브라질과 독일에서 분리된

* 이 논문은 2004년도 고신대학교 의과대학 연구비지원으로 수행된
접 수 일: 05/7/29 게재승인일: 05/8/19
교신저자: 정석훈

(602-702) 부산광역시 서구 압남동 34번지

고신대학교 의과대학 진단검사의학교실

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

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

*P. aeruginosa*에서 새로운 유형의 metallo- β -lactamase인 SPM-1과 GIM-1이 각각 보고되었다[12,13]. 국내에서는 VIM-2를 생성하는 *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *A. baumannii*, *Acinetobacter genomospecies 3*, *Serratia marcescens* 및 *Enterobacter cloacae*가 보고된 바 있다[14-16].

Class D의 OXA형 β -lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대한 활성이 강한 특성이 있다. OXA-23, -24, -25, -26, -27, -40, -48 등 일부 OXA형 β -lactamase는 carbapenem에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 알려졌다[17]. OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 확인되었으며[18,19], 처음에는 ARI-1으로 불렸으나 최근 OXA-23으로 개명되었다[20]. OXA-24는 1997년 스페인에서 집단감염을 일으킨 imipenem 내성 *A. baumannii* 균주에서 검출되었다[21]. OXA-48은 2001년 터키에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*에서 검출되었다[22]. 국내에서는 2004년 전 등[23]이 OXA-23 β -lactamase 생성에 의해 imipenem 내성을 획득한 *A. baumannii*가 국내에 흔하다고 보고하였다.

Imipenem에 내성인 *A. baumannii*의 출현 및 확산은 이 세균에 의한 감염증 치료의 어려움을 가중시킬 수 있기에 임상적으로 중대한 문제이다. 본 연구에서는 부산의 한 종합병원에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 imipenem에 대한 내성 현황을 조사하고 이들 내성세균이 생성하는 carbapenemase의 유전형질을 규명함으로써 이 세균의 치료지침과 내성세균의 확산 방지책을 마련하는데 필요한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

2004년 6월에서 9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 하였다. 전통적인 생화학적 방법과 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)로 균종을 동정하였다.

2. 항균제 감수성 시험

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 권장에 따라서 디스크 확산법으로 항균제 감수성을 시험하였다[24]. 항균제 디스크로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, cefotetan, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, meropenem, imipenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, tetracycline 및 trimethoprim-sulfamethoxazole 디스크(BBL, Cockeysville, MD, USA)를 사용하였다. 정도관리를 위하여 표준균주 *Escherichia*

coli ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. Carbapenemase 생성균주 선별

Hodge 변법으로 carbapenemase 생성균주를 선별하였다[25]. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 0.5 McFarland로 맞춘 후 Mueller-Hinton 한천(Difco, Detroit, MI, USA)에 고르게 접종하였다. 배지의 중앙에 imipenem 디스크(30 μ g, BBL)를 놓은 후, 시험균주를 백금으로 디스크로부터 평판의 가장자리로 한 줄로 굽게 접종하였다. 35 $^{\circ}$ 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 등[25]의 방법에 따라서 EDTA-disk synergy 시험으로 선별하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, Tryptic soy broth(Difco)에 접종하여 0.5 McFarland로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 5 mM EDTA 디스크를 가운데 두고 imipenem과 meropenem 디스크(각 30 μ g, BBL)를 양옆에 두되 가장자리 간격이 1.5 cm가 되도록 배치하였다. 세균이 접종된 배지는 35 $^{\circ}$ C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

5. 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 MIC를 측정하였다[26]. 시험항균제로는 piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, ceftazidime-clavulanic acid, cefepime, imipenem 및 meropenem을 사용하였다. 시험균주 10^4 colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 μ g/mL 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, PA, USA)로 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 정도관리를 위하여 표준균주인 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

6. Isoelectric focusing (IEF)

β -Lactamase의 pI 확인을 위해서 IEF를 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.

Table 1. Sequence of the PCR primers

Name	Nucleotide Sequence	Product size (bp)	Accession No.	Related β -lactamase genes
IMP-1F	5'-GCTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	656	S71932	IMP -1, -3, -6, -10
IMP-1R	5'-CCTTTAACCGCCTGCTCTAATG-3'			
IMP-2F	5'-ATGTTACGCAGCAGGGCAG-3'	938/991	AJ243491	IMP -2, -8, -10, -12, -13
IMP-2R	5'-ATGCTCAGTCATGAGGCGC-3'			
IMP-4F	5'-GAAGGCGTTTATGTTTACTACTTCG-3'	473	AF244145	IMP -4, -5, -7, -9
IMP-4R	5'-GCGTCACCCAAATTACCTAGACC-3'			
IMP-11F	5'-GAGAAGCTTGAAGAGGGTGTATTAT-3'	420	AB074436	IMP -11, -12, -21
IMP-11R	5'-AGGTAGCCAAACCACTACGTTATC-3'			
IMP-18F	5'-CATTGCTGCTGCAGATGATTC-3'	634	AY780674	IMP -18
IMP-18R	5'-CTGCAAGAGTGATGCGTTTC-3'			
IMP-19F	5'-GTTTTATGTGTATGCTTCCTTTGTAGC-3'	679	AB201265	IMP -19, -20
IMP-19R	5'-CAGCCTGTTCCCATGTACG-3'			
VIM-1F	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	581	Y18050	VIM -1, -4, -5, -7, -11
VIM-1R	5'-AGACCGCCCGGTAGACC-3'			
VIM-2F	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	645	AF191564	VIM -2, -3, -6, -8, -9, -10
VIM-2R	5'-CTACTCAACGACTGAGCGATTTGT-3'			
GIM-1F	5'-CAGGGTCATAAACCGCTAGAAG-3'	613	AJ620678	GIM -1
GIM-1R	5'-AACTTCCAACCTTGCCATGC-3'			
SPM-1F	5'-GAGAGCCCTGCTTGATTC-3'	783	AY341249	SPM -1
SPM-1R	5'-GCGACCTTGATCGTCTTGTT-3'			
OXA-23F	5'-ACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC-3'	817	AJ132105	OXA -23, -27, -49
OXA-23R	5'-TGTC AAGCTCTTAAATAATATTCAGC-3'			
OXA-24F	5'-GATGAAGCTCAAACACAGGGTG-3'	687	AJ239129	OXA -24, -25, -26, -40, -72
OXA-24R	5'-TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC-3'			
OXA-48F	5'-GATTATCGGAATGCCTGCGG-3'	845	AY236073	OXA-48, -54
OXA-48R	5'-CTACAAGCGCATCGAGCATCA-3'			
GES-F	5'-GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT-3'	903	AF329699	GES -1, -2, -3, -4, IBC -1, -2
GES-R	5'-TGTCCTGCTCAGGATGAGT-3'			

IEF한 gel을 0.05% (500 μ g/mL) nitrocefin 용액 (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA)에 염색하여 β -lactamase의 pI를 측정하였다.

7. 분자유전학적 방법에 의한 β -lactamase 유전형 시험

β -Lactamase의 유전형은 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 시험하였다. 염기서열의 상동성에 따라서 IMP형 metallo- β -lactamase는 IMP-1, -2, -4, -11, -18 및 -19의 6개 유형, VIM형 metallo- β -lactamase는 VIM-1 및 -2의 2개 유형, OXA형 carbapenemase는 OXA-23, -24 및 -48의 3개 유형으로 나누어서 primer를 고안하였다. 아형이 보고되지 않은 GIM-1과 SPM-1 및 class A의 GES형 β -lactamase의 유전자 검출을 위해서는 각 1쌍의 primer를 고안하였다 (Table 1). β -Lactamase 유전자의 염기서열은 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 취하였으며, DNA Space version 3.02 (Genetic Systems, Hitachi, Japan)

와 Vector NTI Suite (InforMax, Frederick, MD, USA)을 사용한 multialignment 분석 결과에 기초하여 β -lactamase 유전자의 특이적인 부분을 시발체로 고안하였다. 고안된 시발체와 ESB� 유전자의 염기서열 동정은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)로 분석하였다. 시험세균을 TSB에 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 5분간 13,000 $\times$ g로 원침 후, 상층액은 버리고 침사는 증류수 500 μ L에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후 13,000 $\times$ g로 원침하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5 μ L, primer 각 1 μ L, deoxynucleotide triphosphates 2.5 mM (8 μ L), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5 μ L), 10X TAE buffer 10 μ L 및 증류수 75.5 μ L를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 94℃로 30초간 denaturation, 58℃로 30초간 annealing, 72℃로 30초간 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다. 증폭산물 3 μ L를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)의 홈에 넣고 40

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of *A. baumannii* isolates

Antimicrobial agents	% Resistance		
	IMP-S (n=44)	IMP-R (n=14)	Total (n=58)
Ampicillin	93.2	100	94.8
Ampicillin-sulbactam	0	50	12.3
Piperacillin	2.3	92.9	24.6
Piperacillin-tazobactam	2.3	78.6	21.1
Cefoxitin	86.4	92.9	87.3
Cefotetan	97.9	85.7	94.5
Ceftazidime	4.5	92.9	25.9
Cefotaxime	13.6	92.9	32.8
Cefepime	2.3	85.7	22.4
Aztreonam	63.6	78.6	67.2
Imipenem	0	100	24.1
Meropenem	0	100	24.1
Amikacin	6.8	92.9	27.6
Gentamicin	9.1	92.9	29.3
Tobramycin	9.1	92.9	29.3
Tetracycline	6.8	71.4	22.4
Trimethoprim-sulfamethoxazole	11.4	71.4	25.9
Ciprofloxacin	4.5	85.7	24.1

Abbreviations: IMP-S, imipenem-susceptible isolates; IMP-R, imipenem-resistant isolates.

분간 전기영동하여서 band를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hiden, Germany)로 agarose gel 에서 분리 후, Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH, USA)를 이용하여 양 방향으로 염기서열을 분석하였다.

8. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR

ERIC PCR로 균주의 역학적 연관성을 조사하였다. Primer로는 ERIC 1R (5' -atg taa gct cct ggg gat tca c-3')과 ERIC 2 (5' -aag taa gtg act ggg gtg agc g-3')로 명명된 장내 세균의 반복 서열을 사용하였다[28]. 증폭반응은 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각 0.2 mM, 50 pM primer, 임상균주에서 채취한 10 ng의 주형 DNA, 25 mM의 TAPS [N-Tris(hydroxy) methyl-3-amino-propane sulfonic acid, pH 9.3], 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ 및 1.25 U의 TaKaRa Ex Taq polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)를 포함한 1 mM 2-mercaptoethanol 50 µM의 혼합액으로 시행하였다. 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 52℃에서 1분, 70℃에서 5분, 92℃에서 1분씩 35회 증폭 반응시키고, 70℃에서 10분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(3 µL)은 2% Sea-kem LE 한천(BMA, Rockland, MA, USA)에서 분석하였다. Band의 강도와 상관없이 band의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 band 차이가 있으면 역학

적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 58주의 *A. baumannii*가 중환자실 환자 20명, 일반병동 환자 36명 및 외래환자 2명의 임상검체에서 분리되었는데, 이 중 37주는 호흡기 검체, 10주는 요 검체, 6주는 체액검체, 4주는 혈액검체, 1주는 농 검체에서 분리되었다. 이들 균주의 ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin 및 piperacillin-tazobactam에 대한 내성률은 각각 94.8%, 12.3%, 24.6% 및 21.1%로 β -lactamase 억제제가 혼합된 경우 내성률이 낮아지는 현상을 보였다. Cefoxitin과 cefotetan에 대한 내성률은 87.3%와 94.5%로 높았으며, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem 등 광범위 β -lactam 항균제에 대한 내성률은 각각 25.9%, 32.8%, 22.4%, 67.2%, 24.1% 및 24.1%였다. Imipenem에 내성인 14주는 meropenem에도 동시에 내성이었으며, 두 항균제에 중간인 균주는 없었다. Imipenem 내성 균주 중 4주는 중환자실 환자, 9주는 일반병동 환자, 1주는 외래환자에서 분리되었다. Imipenem과 meropenem에 내성인 균주의 gentamicin, tobramycin, amikacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole 및 ciprofloxacin에 대한 내성률은 각각

Table 3. Characteristics of imipenem-resistant *A. baumannii* isolates

Isolate	Age/ Sex	Ward	Specimen	MICs (μg/mL)							Hodge	EDTA	Genotype
				PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA ^a	FEP	IPM	MEM			
K0420673	71/M	General ward	Urine	64	4	>256	>256	128	32	16	+	+	IMP-1
K0421793	46/M	General ward	Urine	>256	16	>256	>256	256	8	8	+	+	IMP-1
K0420859	65/F	General ward	Urine	>256	32	256	>256	32	16	8	+	-	OXA-23
K0418396	61/F	General ward	Pus	>256	128	256	>256	64	16	16	+	-	OXA-23
K0418480	64/M	Intensive care unit	Sputum	>256	128	256	>256	64	16	16	+	-	OXA-23
K0418919	72/F	Intensive care unit	Sputum	>256	128	256	>256	64	32	16	+	-	OXA-23
K0419543	79/M	Intensive care unit	Sputum	>256	128	>256	>256	64	32	16	+	-	OXA-23
K0419583	56/F	General ward	Sputum	>256	128	>256	>256	64	16	16	+	-	OXA-23
K0425685	1/M	Outpatient	Urine	128	32	4	8	8	8	4	+	-	OXA-23
K0424931	51/M	General ward	Sputum	16	4	32	32	16	8	2	-	-	
K0418843	45/M	General ward	Bile juice	256	32	128	256	128	2	4	-	-	
K0418529	63/M	Outpatient	Urine	>256	32	128	256	32	2	4	-	-	
K0420039	58/F	Intensive care unit	Sputum	>256	128	>256	>256	>256	2	4	-	-	
K0425523	57/M	General ward	Pleural fluid	>256	64	128	256	32	1	4	-	-	

a Clavulanic acid at a fixed concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$.

Abbreviations: PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime-clavulanic acid; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; Hodge, Modified Hodge method; EDTA, EDTA-disk synergy test.

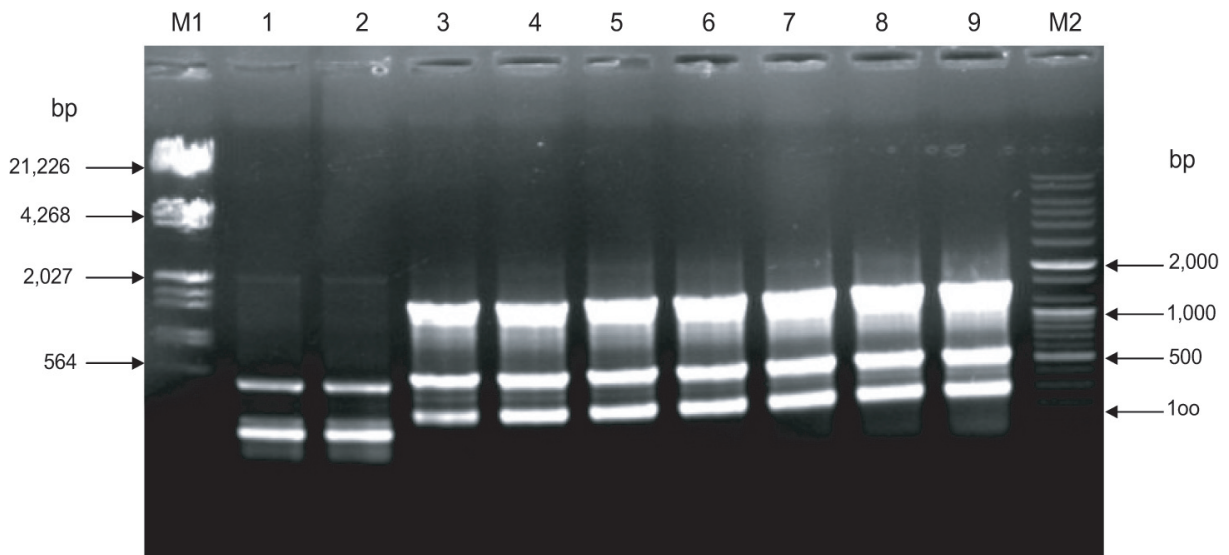


Fig. 1. ERIC patterns with primers of ERIC IR and ERIC 2 with clinical *A. baumannii* isolates from a hospital, Busan, Korea. Lane M1, Hind III /EcoRI-digested phage λ ; lane M2, 100bp plus DNA ladder; 1-2, IMP-1 metallo- β -lactamase-producing clinical *A. baumannii* isolates; 3-9, OXA-23 β -lactamase-producing clinical *A. baumannii* isolates.

92.9%, 92.9%, 92.9%, 71.4%, 71.4% 및 85.7%로 carbapenem에 감수성인 균주의 내성률 9.1%, 9.1%, 6.8%, 6.8%, 11.4% 및 4.6%에 비해서 현저하게 높았다 (Table 2).

2. Hodge 변법 및 EDTA-disk synergy법

수집된 균주 중 imipenem과 meropenem에 내성인 균주 14주를 대상으로 하였다. 대상 균주 중 9주는 Hodge 변법

에 양성반응을 보였으며, 이 중 2주는 EDTA-disk synergy 법에서도 양성반응을 보였다.

3. β -Lactamase 유전형 및 효소의 pI

OXA-23형 유전자 검출을 위한 PCR에서는 Hodge 변법 양성이면서 EDTA-disk synergy 음성인 7주가 양성반응을 보였으며, IMP-1형 유전자 검출을 위한 PCR에서는 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법 모두에 양성인 균주 2주가 양성반응을 보였다. 여타의 carbapenemase 검출을 위한 PCR에 양성을 보인 균주는 없었다. Imipenem에 내성인 5주에서 carbapenemase 유전자 검출에 실패하였으며, 이들 균주는 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법 모두에 음성이었다. OXA-23형 PCR 증폭산물의 염기서열은 모두 *A. baumannii* RCY 52763/97 (GenBank accession no. AJ239129)의 OXA-23 유전자와 일치하였다. 또한 IMP-1형 PCR 증폭산물의 염기서열은 모두 *P. aeruginosa* DU-40799/00 (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 *A. baumannii*의 특성

OXA-23 혹은 IMP-1을 생성하는 *A. baumannii* 9주에 대한 ceftazidime의 MIC는 모두 256 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 높았고, clavulanic acid의 첨가에 의해서 MIC가 낮아지는 현상을 관찰할 수 없었다. IMP-1을 생성하는 2주에 대한 imipenem과 meropenem의 MIC는 각각 32 $\mu\text{g/mL}$ 와 16 $\mu\text{g/mL}$ 및 8 $\mu\text{g/mL}$ 와 8 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, OXA-23을 생성하는 7주에 대한 이들 항균제의 MIC 범위는 각각 8-32 $\mu\text{g/mL}$ 와 4-16 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 내성 유전자가 검출되지 않은 5주에 대한 이들 항균제의 MIC 범위는 각각 1-8 $\mu\text{g/mL}$ 와 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 로 IMP-1 혹은 OXA-23 생성 균주에 비해서 상대적으로 낮았다 (Table 3).

5. ERIC PCR

IMP-1을 생성하는 *A. baumannii* 2주는 ERIC PCR에 의해서 각각 500 bp 이하의 band 두개를 보였으며, 두 band의 크기는 동일하였다(Fig. 1). 한편 OXA-23을 생성하는 *A. baumannii* 7주는 ERIC PCR에 의해서 각각 2,000 bp 이하의 band 3개를 보였으며, 균주간 동일한 band 양상을 나타내었다(Fig. 1).

고 찰

*A. baumannii*는 carbapenemase의 생성, 염색체성 AmpC β -lactamase의 과량생성, 세포외막 투과도 변화 등 다양한

기전에 의해서 imipenem에 대한 내성을 획득할 수 있다 [6,9,29]. 본 연구에서는 carbapenemase의 선별을 위하여 Hodge 변법을 사용하였다. 이 검사법은 metallo- β -lactamase 생성균주 뿐 아니라 GES형 class A ESBL과 일부 OXA형 class D β -lactamase 등 비금속성 carbapenemase를 생성하는 균주도 이 시험에서 양성반응을 보인다. EDTA-disk synergy 시험은 metallo- β -lactamase의 활성이 EDTA에 의해서 억제되는 원리를 이용한 검사법으로 이 효소를 생성하는 균주의 선별에 사용하였다. Class B의 IMP형 혹은 VIM형 metallo- β -lactamase는 이 시험에서 양성을 보이는데 반하여, class A나 D의 비금속성 carbapenemase를 생성하는 균주는 EDTA-disk synergy 시험에서 음성반응을 보인다. 본 연구에서는 2주가 Hodge 변법과 EDTA-disk synergy법 모두에 양성반응을 보여 class B metallo- β -lactamase 생성을 추측할 수 있었다. 또한 7주는 Hodge 변법에 양성이면서 EDTA-disk synergy법에 음성이었기 때문에 비금속성 carbapenemase 생성을 추측할 수 있었다.

Imipenem에 대한 내성을 세균에게 부여하는 효소의 다양성이 계속 증가하고 있어서 이들 효소의 검출법의 개발이 중요하다. 본 연구에서는 효소 유전자 염기서열의 상동성에 따라서 class B의 IMP형과 VIM형 metallo- β -lactamase를 각각 6개 및 2개 유형, class D의 OXA형 carbapenemase를 3개 유형으로 나누어서 검출을 시도하였다. 또한 최근 규명된 class B의 GIM-1과 SPM-1 metallo- β -lactamase 및 class A의 GES형 β -lactamase의 검출도 시도하였다.

총 58주의 *A. baumannii* 중 7주에서 OXA-23 유전자, 2주에서 IMP-1 유전자가 각각 검출되었다. IMP-1은 metallo- β -lactamase의 일종으로 1988년 일본에서 처음 발견되었으며, imipenem을 가수분해하는 효소라는 의미로 명명되었다[10]. IMP-1 유전자는 다른 내성 유전자 cassette와 함께 class 1 integron을 흔히 구성한다. Integron은 유전자 cassette를 통합(integration)하고 이동시킬 수 있는 유전적 요소이므로, integron에 포함된 내성 유전자는 clone성 확산 뿐 아니라 균종 사이의 수평적 확산에 의해서도 내성이 전달될 수 있다. 일본에서는 IMP-1을 생성하는 그람 음성세균의 분리가 혼한 것으로 알려진데 반하여 국내에서의 IMP-1 보고는 흔하지 않으나 김 등[30]은 부산의 종합병원에서 IMP-1 생성 *A. baumannii*의 분리를 보고한 바 있다. 본 연구에서 분리된 IMP-1 생성 *A. baumannii* 2주는 동일한 ERIC PCR 양상을 보였기에 동일한 감염원에서 유래된 것으로 판단할 수 있었다.

한편 *A. baumannii* 7주는 OXA-23을 생성하였다. OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 발견된 효소이며, 발견초기에는 ARI-1이란 이름으로 불리기도 했었다[17-19]. 2002년에는 프랑스에서 OXA-23을 생성하는 *Proteus mirabilis*가 보고되었으며[31], 2003년에는 이 효소를 생성하는 *A.*

*baumannii*에 의한 감염의 집단발생이 브라질에서 보고되었다[32]. 국내에서는 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*가 이 효소를 흔히 생성한다는 보고가 있었다[33]. 본 연구에서 분리된 OXA-23 생성 균주 7주 모두는 동일한 ERIC PCR 양상을 보였으므로 이들 균주가 동일한 감염원에서 유래되었음을 추측할 수 있었다.

이상의 결과에서 부산의 한 종합병원에서 분리된 *A. baumannii*는 IMP-1 혹은 OXA-23을 생성하여서 imipenem에 대한 내성을 획득한 균주가 존재함을 확인할 수 있었으며, IMP-1 생성 균주 2주 및 OXA-23 생성 균주 7주는 각각 동일 감염원에서 유래된 것으로 판단되었다. 이들 효소를 생성하는 균주의 확산은 *A. baumannii* 감염증에 대한 carbapenem의 치료 유용성을 제한할 것으로 우려되므로, 지속적인 감시와 내성세균 확산 억제책 마련이 필요한 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Bergogne-Bérézin E and Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 2004;9: 148-65.
- Pfaller MA, Jones RN, Biedenbach DJ. Antimicrobial resistance trends in medical centers using carbapenems: report of 1999 and 2000 results from the MYSTIC program(USA). Diagn Microbiol Infect Dis 2001;41: 177-82.
- Henwood CJ, Gatward T, Warner M, James D, Stockdale NW, Spence RP, et al. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK and in vitro evaluation of tigecycline(GAR-936). J Antimicrob Chemother 2002;49:479-87.
- Gehrlein M, Leying H, Cullman W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin binding proteins. Chemotherapy 1991;37:405-12.
- Urban C, Go ES, Meyer KS, Mariano N, Rahal JJ. Interactions of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin binding proteins of imipenem-resistant and susceptible *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 1995;125:193-7.
- Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii* association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. J Antimicrob Chemother 1996;38:245-51.
- Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. Antimicrob Agents Chemother 1982;22:323-9.
- Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E, Couvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. Plasmid 1983;10:138-47.
- Joly-Guillou ML, Vallee E, Bergogne-Bérézin E, Philippon A. Distribution of β -lactamases and phenotypic analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1988;22:597-604.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1584-90.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002;50:673-9.
- Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4654-61.
- Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla_{VIM-2}* cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agent Chemother 2002;46:1053-8.
- Yum JH, Yong D, Lee K, Kim HS, Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;42:217-9.
- Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother 2003;51:397-400.
- Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:583-8.
- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 1993;2:81-8.

19. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. J Antimicrob Chemother 1995;36:585-7.
20. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:196-9.
21. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1556-61.
22. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:15-22.
23. Cheon BC, Kwon KY, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho BK, et al. Prevalence of OXA-23 extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:139-47.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informational supplement, Pennsylvania; NCCLS, 2001:M100-S11.
25. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified-Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7: 88-91.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standards. 5th edition, Pennsylvania; NCCLS, 2000:M7-A5.
27. Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. J Gen Microbiol 1975;88:169-78.
28. Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC, et al. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type β -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. J Clin Microbiol 2003;41:2477-82.
29. Sato K and Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 1991;28:33-45.
30. Kim JH, Jeong SH, Kim BN, Jeong TJ, Kim TS, Kim JC. Genotypes of metallo- β -lactamases produced by imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from clinical specimens. Infection 2002;33:360-6.
31. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, et al. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2004-6.
32. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, 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.
33. Chong Y and Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. J Infect Chemother 2000;6:189-95.

Molecular Epidemiology of Infection Caused by OXA-23 or IMP-1 β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii*

Kwang Ok Park¹, Han Chul Son², Il Kwon Bae³, and Seok Hoon Jeong³

Department of Quality Improvement, Pusan National University Hospital¹;

Department of Laboratory Medicine, Pusan National University College of Medicine²;

and Department of Laboratory Medicine, Kosin University College of Medicine³, Busan, Korea

Background: The purposes of this study were to investigate the prevalence of imipenem-resistant clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and to determine the mechanism of the resistance.

Methods: During the period of June to September 2004, susceptibility to imipenem of *A. baumannii* isolates from a hospital in Busan, Korea were investigated. The isolates were screened for the production of carbapenemase and metallo- β -lactamase by Modified-Hodge and EDTA-disk synergy tests, respectively; minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by agar dilution method. Genes coding for GES, IMP, VIM, SMP-1, GIM-1 and OXA type β -lactamases were searched by PCR amplification, and the PCR products were subjected to direct sequencing. Isoelectric points of β -lactamases were estimated by isoelectric focusing and the epidemiological relationships of isolates were investigated by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR.

Results: Fifty eight strains of *A. baumannii* were isolated from clinical specimens during the surveillance period, and 14 isolates (24.1%) were resistant to imipenem. Of the 14 isolates, 9 were tested positive in Modified-Hodge test and 2 were also positive in EDTA-disk synergy test. Genes encoding OXA-23 and IMP-1 were detected in 7 and 2 isolates, respectively. In IEF studies, OXA-23 and IMP-1 enzymes had corresponding pIs at 6.7 and 9.0, respectively. Seven OXA-23-producing and 2 IMP-1-producing isolates showed the same ERIC PCR patterns.

Conclusion: It is concluded that 7 and 2 *A. baumannii* isolates from the patients in a hospital in Busan acquired resistance to imipenem by producing OXA-23 and IMP-1 β -lactamases, respectively. The isolates producing these β -lactamases might be originated from a common source.

(Korean J Clin Microbiol 2005;8(2):121–129)

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, OXA-23, IMP-1, 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, 602-030, Korea.
Tel. +82-51-990-6373 Fax. +82-51-990-3034 E-mail: kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr