Ann Clin Microbiol Vol. 16, No. 3, September, 2013
http://dx.doi.org/10.5145/ACM.2013.16.3.126
ISSN 2288-0585

Molecular Characteristics of *bla*$_{OXA-23}$-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated from a University Hospital

In-Ho Jang[1], Soon Deok Park[1], Young Uh[1], Gyu-sang Lee[2], Jong-Bae Kim[2], Il Choi[3]

[1]Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, [2]Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, [3]Department of Animal Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Sangi University, Wonju, Korea

Background: Multi-drug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* has emerged as a significant infectious agent in hospitals worldwide. The purpose of this study was to determine the molecular characterization of MDR *A. baumannii* clinical isolates.
Methods: Two hundred eighty-five strains of non-duplicated *A. baumannii* collected from March to November 2011 from a university hospital laboratory located in the Wonju area of the Gangwon province of Korea were analyzed for MDR genes.
Results: All of the 285 imipenem-resistant *A. baumannii* isolates were encoded by a *bla*$_{OXA-23}$-like gene, and all isolates with the *bla*$_{OXA-23}$-like gene had the upstream element IS*Aba*1. The 16S rRNA methylase gene *arm*A was detected in 153 (50.2%) clinical isolates, but *rmt*A, *rmt*B, *rmt*C, *rmt*D and *npm*A were not detected in any isolates in the present study. The gene encoding *aac(6')-Ib* was the most prevalent aminoglycoside-modifying enzyme. The sequencing data for the quinolone resistance-determining region of *gyrA* and *parC* revealed the presence of Ser (TCA) 83 to Leu (TTA) and Ser (TCG) 80 to Leu (TTG) substitutions. All but one of the 285 *A. baumannii* isolates showed similar band patterns on repetitive extragenic palindromic-PCR profiles.
Conclusion: The molecular characteristics of the resistance genes of MDR *A. baumannii* isolates obtained from the Wonju area of Gangwon province were similar to those of other areas in Korea. **(Ann Clin Microbiol 2013;16:126-133)**

Key Words: *Acinetobacter baumannii*; Beta-lactamases; Genes, Multidrug resistance; Imipenem

INTRODUCTION

*Acinetobacter baumannii*에 의한 감염증 치료에는 imipenem, meropenem과 같은 β-lactamase에 비교적 안정한 carbapenem 계열의 항생제들이 사용되어 왔으나, 다제내성 *A. baumannii* 균주들의 증가로 인하여 치료 약제를 선택하기가 어려워 졌다. Lockhart 등[1]은 병원 내 중환자실에서 분리된 *A. baumannii* 중 30% 정도가 carbapenem과 quinolone계 항균제가 포함된 적어도 3가지 이상의 항균제 계열에 내성을 나타내는 임상 분리 균주임을 보고한 바 있다. *Acinetobacter* spp.의 carbapenem 내성의 주된 기전은 OXA형의 carbapenemase로서 OXA-23, OXA- 24/40, OXA-51 및 OXA-58의 4개 주요 군이 있으며, 최근에는 브라질에서 분리된 *A. baumannii*에서 OXA-143이 확인되었고[2], OXA-182는 최초로 국내에서 분리된 *A. baumannii*에서 검출되었다[3]. 현재까지 보고된 OXA형 carbapenemase는 주로 OXA-23-like (OXA-23, -27)와 OXA-24-like (OXA-24, -25, -26, -40)의 두 가지 다른 무리로 분류된다[4-6]. OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 검출되었고, 국내에서는 2004년에 imipenem 내성을 획득한 *A. baumannii*의 77.8%에서 OXA-23 생성을 보고하였으며[7], 2006년에는 imipenem 내성을 획득한 *Acinetobacter* spp. 75주 중 25주(33.3%)에서 OXA-23 생성을 보고하였다[8]. *A. baumannii*에서 발견되는 insertion sequence IS*Aba*1은 OXA-23을 생성하는 *A. baumannii*의 경우에 *bla*$_{OXA-23}$ 유전자의 upstream에 존재하여 promoter로 작용하고 *bla*$_{OXA-23}$ 유전자를 과도 발현시켜 다제내성을 유발하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다[9]. OXA-51-like는 모든 *A. baumannii*의 염색체에 존재하므로 균종의 동정에도 사용할 수 있으며, OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78,

Received 18 March, 2013, Revised 10 May, 2013, Accepted 27 May, 2013

Correspondence: Young Uh, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, 162, Ilsan-dong, Wonju 220-701, Korea. (Tel) 82-33-741-1592, (Fax) 82-33-731-0506, (E-mail) u931018@yonsei.ac.kr

ⓒ The 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/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

-79, -80, -82 등이 OXA-51-like에 속한다[10]. OXA-51의 carbapenem 분해능은 매우 약하며, IS*Aba*1이 OXA-51-like 유전자의 upstream에 위치하지 않은 경우에는 carbapenem 감수성에 영향을 거의 미치지 않는다[11]. 그러나 IS*Aba*1이 upstream에 위치하게 되면 이 insertion sequence는 OXA-51-like 유전자에 promoter sequences를 공급하여, OXA-51의 과량 생성을 유발하지만 OXA-51의 미약한 carbapenem 분해능때문에 OXA-51이 과량 생성되어도 *A. baumannii* 균주에 대한 carbapenem의 최소억제농도는 3배 정도만 증가하는 것으로 알려져 있다[12].

Ambler class A에 속하는 bla_{PER-1} 유전자는 국내에서 분리되는 *A. baumannii*가 cefepime에 대한 내성을 획득하는 데 중요한 기전 중 하나로 알려져 있는데, cefepime 내성 *A. baumannii*에서 PER-1 효소의 검출률은 37.2-86.9%로 보고되었다[13-15].

Acinetobacter spp.의 quinolone계 항균제에 대한 내성은 DNA gyrase (GyrA)와 topoisomerase IV (ParC)의 subunit A의 돌연변이에 의하여 야기된다. 가장 중요한 돌연변이는 quinolone resistance-determining region (QRDR)이라 불리는 GyrA와 ParC의 특정 위치에서 발생하며, 주로 GyrA의 83번째와 ParC의 80번째 코돈에서 치환이 발생한다[16,17]. GyrA의 추가적인 돌연변이는 Gly81, Ala84, Glu87로 알려져 있으며, 이들 돌연변이로 인해 quinolone계 항균제에 내성을 유도하며, ParC의 경우는 Gly78과 Glu84의 아미노산 치환이 Ser83과 Ser80과 같이 확인되는 경우에는 quinolone에 높은 수준의 농도에서까지 내성을 유발하는 것으로 알려져 있다[18,19].

Aminoglycoside 항생제에 대한 주요 내성기전은 acetylation, adenylation, phosphorylation과 같은 화학적 변화에 의한 aminoglycoside의 불활성화이며[20], ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD와 NpmA와 같은 효소들에 의하여 16S rRNA A site의 변화가 유발되어 대부분의 모든 aminoglycoside 항균제에 내성을 보이게 된다[21]. 2003년에는 16S rRNA를 methylation하여 고도 내성을 나타내는 새로운 기전이 규명되었다[22]. 2003년과 2005년에 국내 환자에서 분리된 *Acinetobacter* 균주 중에는 *arm*A 유전자가 비교적 흔하였다고 보고되었다[23].

*A. baumannii*의 carbapenem 내성 유전자의 분포는 지역적으로 차이가 있으므로 이들 carbapenem 내성 유전자의 분포 조사는 *A. baumannii*의 역학조사와 carbapenem 내성의 특성 연구에 필수적이다. 본 연구에서는 강원도 원주시 소재의 대학병원에서 분리된 *A. baumannii* 중 imipenem 내성 *A. baumannii*를 선별하여 β-lactam, aminoglycoside와 quinolone계에 대한 내성기전을 조사하였으며, repetitive extragenic palindromic (REP) sequence-based polymerase chain reaction (PCR)법을 시행하여 imipenem 내성 *A. baumannii*의 유전적 근연도를 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 시험 균주

2011년 3월부터 11월까지 임상 검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 균 동정과 항균제감수성검사 결과를 바탕으로 중복 분리주를 제외한 285주의 imipenem 내성 *A. baumannii*를 선별하여 본 시험에 사용하였다. 임상 검체별로는 객담(218주), 흡인관끝(9주), 혈액(4주), 기관지세척액(23주), 가슴관끝(1주), 카테터끝(3주), 상처(4주), 소변(2주), 기타 검체(21주)였다.

2. 시험 균주의 동정

임상 검체에서 분리된 세균의 동정은 전통적 동정법과 MicroScan COMBO NC44 (Siemens Healthcare Diagnostics, Sacramento, CA, USA)로 동정하였다.

3. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)를 이용한 *A. baumannii*의 유전종 동정

균종의 유전종(genomic species)은 ARDRA 기법[24]을 사용하여 확인하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 16S rRNA의 conserved region이 포함된 곳으로 primer sequence는 16S rRNA 유전자의 5' 시작 부위의 서열인 5'-TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC-3'과 16S rRNA 유전자의 3' 말단 부분의 서열인 5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCA-3'를 사용하였다.

4. 항균제 감수성검사

선별된 *A. baumannii*의 항균제감수성검사는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 권장하는 디스크확산법[25]을 시행하였다. 시험 대상 항균제는 piperacillin, ceftazidime, cefepime, cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem, aztreonam, gentamicin, tobramycin, amikacin, levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole과 colistin이었다. Colistin의 항균제감수성검사는 CLSI[25]의 *Pseudomonas aeruginosa* 판정 기준에 따랐다. 항균제감수성사 정도관리를 위하여 *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였으며, β-lactam/β-lactamase inhibitor 혼합제제의 정도관리를 위하여 *E. coli* ATCC 35218을 사용하였다. 항균제 디스크는 BD (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)의 제품을 이용하였다.

5. Carbapenemase 활성 검사

Imipenem 내성 *A. baumannii*에 대한 carbapenemase의 활성을 검사하기 위하여 modified Hodge test와 imipenem-EDTA disk synergy test를 시행하였다[26].

6. 중합효소연쇄반응을 이용한 β-lactamase 유전자의 증폭

bla$_{OXA-23}$-like, *bla*$_{OXA-24}$-like, *bla*$_{OXA-51}$-like와 *bla*$_{OXA-58}$-like를 동시에 검출할 수 있는 다중중합효소연쇄반응[27]을 실시하였다. PCR 반응이 끝난 후 2%의 agarose gel을 사용하여 전기영동을 시행하고, 증폭 산물을 비교 관찰하였다. Ambler class A에 속하는 *bla*$_{PER-1}$ 유전자를 증폭하기 위해 PCR을 시행하였다[15].

7. Insertion sequence IS*Aba*1 검출 및 촉진자 역할 확인

IS*Aba*1 유전자를 확인하기 위하여 PCR을 시행하였다[28]. IS*Aba*1 유전자의 존재가 확인되면 *bla*$_{OXA-23}$의 upstream에 IS*Aba*1가 존재하여 promotor로 작용하는지를 확인하기 위하여, IS*Aba*1을 증폭하기 위한 forward primer와 *bla*$_{OXA-23}$를 증폭하기 위한 reverse primer를 사용하여 중합효소연쇄반응으로 확인하였다[11].

8. 중합효소연쇄반응과 염기서열분석법을 이용한 quinolone계 항균제의 내성 기전 조사

Quinolone계 항균제에 내성을 유발하는 *A. baumannii*의 *gyr*A와 *pac*C 유전자의 돌연변이를 확인하기 위하여 Hujer 등[29]의 방법에 따라 QRDR을 중합효소연쇄반응으로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열 분석을 위하여 Applied Biosystems 3730XL 96 capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, USA)를 사용하였고, ABI Prism® BigDye™ Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster city, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열결정 결과는 *A. baumannii*의 *gyr*A와 *par*C 유전자의 표준 염기서열로 각각 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)에 accession number X82165과 X95819로 등록되어 있는 유전자 서열과 비교 분석하여 돌연변이 여부를 확인하였다.

9. 중합효소연쇄반응을 이용한 aminoglycoside계 항균제의 내성 기전 조사

Aminoglycoside 항생제에 내성을 유발하는 유전자를 확인하기 위하여 PCR을 시행하였다[21,30]. PCR 반응이 끝난 후 2%의 agarose gel을 사용하여 전기영동을 시행하고, 각각의 증폭 산물의 크기를 100 bp DNA plus ladder와 비교 관찰하였다.

10. REP-PCR을 통한 균주 간 근연도 조사

Brain heart infusion broth에 *A. baumannii*로 동정된 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하고, 배양액 1 mL를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거하고 saline (0.85% NaCl) 1 mL에 부유시켜 원침하여 생긴 pellet을 DOKDO-Prep® Genomic DNA Purification Kit (ELPIS-Biotech Inc., Daejeon, Korea)의 술식에 따라 genomic DNA를 분리하였다. REP-PCR에 사용된 primer는 REP1 (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3')과 REP2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3')로 사용하여 세균의 genomic DNA의 REP 서열을 증폭하였다. 주형 DNA 2 μL에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 최종 농도가 200 μmol이 되도록 첨가하였다. 그 후 10×buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) 2 μL, SP-*Taq* DNA polymerase (Cosmo Genetech Co., Seoul, Korea) 0.5 U, $MgCl_2$0.8 μL를 첨가하였다. 각각의 primer set 10 pmol/μL를 최종 반응 농도가 2 pmol이 되도록 넣은 후, 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20 μL가 되도록 하여 DNA의 증폭을 시행하였다. PCR 반응은 총 30 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94°C에서 10분간 가온한 후에 매 cycle 당 94°C에서 60초 동안 denaturation, 45°C에서 60초 동안 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72°C에서 16분간 지속하였다. PCR 반응이 끝난 후 2.5%의 agarose gel을 사용하여 전기영동을 시행하고, Molecular Imager®Gel Doc™XR+Imaging System (Bio-Rad)로 각각의 증폭 산물을 비교 관찰하였다.

RESULTS

1. 임상 분리 균주의 동정

생화학 시험으로 *A. baumannii*로 동정된 285주의 시험 대상 균주는 ARDRA 시험에서 Dijkshoorn 등[24]의 결과와 같이 모두 *A. baumannii*로 확인되었고, 또한 시험 균주 모두 *bla*$_{OXA-51}$-like이 검출되어 *A. baumannii*임을 확인할 수 있었다.

2. 항균제 내성률

285주의 *A. baumannii*는 piperacillin, ceftazidime, meropenem, piperacillin/tazobactam과 levofloxacin에 100% 내성이었고, cefepime과 trimethoprim-sulfamethoxazole에 98.2%, tobramycin 96.5%, gentamicin 96.1%, aztreonam 95.4%, cefoperazone-sulbactam 78.6% 및 amikacin 70.2%의 순으로 내성률을 보였으며, colistin에는 모두 감수성이었다(Table 1).

3. Carbapenemase 활성

285주의 *A. baumannii* 모두에서 modified Hodge test 양성이었고, Imipenem-EDTA disk synergy test에서는 모두 음성이었다.

4. OXA형 β-lactamase와 IS*Aba*1 검출

OXA형 β-lactamase 유전자 검출을 위한 다중중합효소연쇄반응에서 285주의 *A. baumannii* 모두에서 *bla*$_{OXA-23}$-like와 *bla*$_{OXA-51}$-like가 검출되었고 전기영동에서도 증폭 산물이 확인되었다. 또한 *bla*$_{OXA-23}$-like가 검출된 모든 임상 분리균주들에

Table 1. Antimicrobial resistance for 285 imipenem-resistant *A. baumannii* isolates

Antimicrobial classes	Antimicrobial agents	% susceptibility		
		S	I	R
Penicillins	Piperacillin	0	0	100
β-lactam/β-lactamase inhibitor	Cefoperazone/sulbactam	1.4	20	78.6
	Piperacillin/tazobactam	0	0	100
Cephems	Ceftazidime	0	0	100
	Cefepime	0.4	1.4	98.2
Carbapenem	Meropenem	0	0	100
Monobactam	Aztreonam	0.4	4.2	95.4
Aminoglycosides	Amikacin	9.5	20.4	70.2
	Gentamicin	2.5	1.4	96.1
	Tobramycin	3.2	0.4	96.5
Quinolone	Levofloxacin	0	0	100
Folate pathway inhibitor	Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.4	1.4	98.2
Lipopeptide	Colistin	100	0	0

Abbreviations: S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

Table 2. Distribution of quinolone resistant genotypes in *A. baumannii*

Target genes	Genotypes		Mutations	Number of isolates (%)
*gyr*A	Amino acid substitution	Ser 83 to Leu	TCA→T**T**A	285 (100.0%)
	Polymorphism	Ser 71	GGT→GG**G**	285 (100.0%)
		Arg 162	CGA→CG**T**	285 (100.0%)
*par*C	Amino acid substitution	Ser 80 to Leu	TCG→T**T**G	285 (100.0%)
	Polymorphism	Pro 109	CCT→CC**A**	149 (52.3%)
		Pro 109	CCT→CC**G**	136 (47.7%)
		Lys 124	AAA→AA**G**	136 (47.7%)
		Lys 126	TCG→TC**A**	136 (47.7%)

Table 3. Distribution of aminoglycoside resistance genes in *A. baumannii*

Genotypes	Number of isolates (%)
aac(3)-Ia	81 (28.4)
aac(3)-IIa	0 (0.0)
aac(6')-Ih	0 (0.0)
aac(6')-Ib	101 (35.4)
aph(3')-Ia	28 (9.8)
aph(3')-VI	0 (0.0)
ant(2'')-Ia	0 (0.0)
rrn	0 (0.0)
aac(3)-Ia+*aac(6')-Ib*	52 (18.3)
aac(3)-Ia+*aph(3')-Ia*+*aac(6')-Ib*	28 (9.8)
*arm*A	143 (50.2)
*rmt*A	0 (0.0)
*rmt*B	0 (0.0)
*rmt*C	0 (0.0)
*rmt*D	0 (0.0)
*npm*A	0 (0.0)
*arm*A+*aac(3)-Ia*	1 (0.3)
*arm*A+*aac(6')-Ib*	17 (6.0)
*arm*A+*aac(3)-Ia*+*aph(3')-Ia*	46 (16.1)
*arm*A+*aac(3)-Ia*+*aph(3')-Ia*+*aac(6')-Ib*	26 (9.1)

서 IS*Aba*1 유전자가 검출되었다.

5. bla_{PER-1}의 중합효소연쇄반응

285주의 *A. baumannii* 모두에서 bla_{PER-1} 유전자는 검출되지 않았다.

6. Quinolone 내성 유발 *gyr*A와 *par*C 유전자의 QRDR 염기서열 분석

285주의 *A. baumannii* 모두에서 *Gyr*A의 83번째 코돈인 serine (TCA)이 점 돌연변이에 의하여 leucine (TTA)으로 치환되었다. 추가적으로 모든 균주에서 코돈의 치환이 발생하지 않는 돌연변이로 *Gyr*A의 71번째 코돈인 Ser에서 염기서열인 GGT가 GGG로, 162번째 코돈인 Arg에서 CGA가 CGT로 염기서열이 바뀐 것을 확인할 수 있었다(Table 2). *par*C 유전자의 경우 모든 균주에서 내성을 유발하는 부위로 알려진 ParC의 80번째 코돈인 serine (TCG)이 leucine (TTG)으로 치환되었다. 또한 코돈의 치환이 발생하지 않는 점 돌연변이가 3곳에서 확인되었는데, 첫 번째는 109번째 코돈인 proline에서 CCT가 CCA로 점 돌연변이가 발생한 균주가 149주(52.3%)에서 확인되었고, CCT가 CCG로 확인된 균주가 136주(47.7%)였으며, 두 번째로 124번째 코돈인 lysine에서 AAA가 AAG로 점 돌연변이가 발생한 균주가 136주 있었고, 세 번째로 126번째 코돈인 lysine에서 TCG가 TCA로 점 돌연변이가 발생한 균주가 136주에서 확인되었다. 아미노산의 변화가 없는 109번째 코돈에서의 CCG로의 점 돌연변이가 발생한 136주는 124번째와 126번째에도

돌연변이가 발생하였다(Table 2).

7. Aminoglycoside계 내성 유발 유전자 분포 조사

16S rRNA methylase 유전자의 중합효소연쇄반응에서 143주(50.2%)에서 *arm*A 유전자가 검출되었으나, *rmt*A, *rmt*B, *rmt*C, *rmt*D와 *npm*A 유전자는 검출되지 않았다(Table 3). 다중중합효소연쇄반응에 의한 AME 유전자 검출률은 *aac*(3)-*Ia* 28.4%, *aac*(6')-*Ib* 35.4%와 *aph*(3')-*Ia* 9.8%였으며, 세 종류의 유전자가 모두 검출된 균주는 28주(9.8%)였고, 26주는 세 종류 AME 유전자와 *arm*A 유전자를 동시에 가지고 있었다(Table 3).

8. REP-PCR을 이용한 균주간의 근연도 검사

REP-PCR 후 전기영동에서 증폭산물의 크기가 100 bp에서 3,000 bp 사이에 8-11개의 밴드들을 확인하였다. 대조균주로 *A. baumannii* ATCC 19606을 사용하여 MDR *A. baumannii* 임상 분리 균주와 비교해 본 결과 다제내성을 나타내는 임상 분리 균주는 대조 균주와 증폭 산물의 크기와 개수의 차이가 확인되었다. 다제내성 임상 분리 균주의 대부분의 증폭 산물들은 비슷한 밴드 양상을 나타냈고, 특정 증폭 산물의 결여를 통한 DNA band 수의 차이와 100 bp DNA plus ladder와의 증폭 산물의 크기로 균주들 간의 차이를 확인할 수 있었다. 증폭된 산물의 DNA band들은 Quantity One version 4.5.0 program (Bio-Rad)을 사용하여 유전적 근연도의 차이를 unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) 방법을 이용하여 dendrogram을 작성하였다. REP-PCR 증폭 산물 DNA의 근연도는 tolerance setting을 5.0%로 하여 band-based Dice coefficient로 계산하였다. Dendrogram에서의 결정값을 80% 수준에서 REP-PCR pattern들을 구분하여 근연도를 가지는 4개의 군(group)으로 구분하였다(Fig. 1). 세부적으로 군 1을 두 개의 아 군(sub-group)으로 구분하였으며, 근연도 60% 미만으로 구분되는 1개의 균주를 기타로 구분하여 각 군의 내성 표현형을 확인하였다(Table 4).

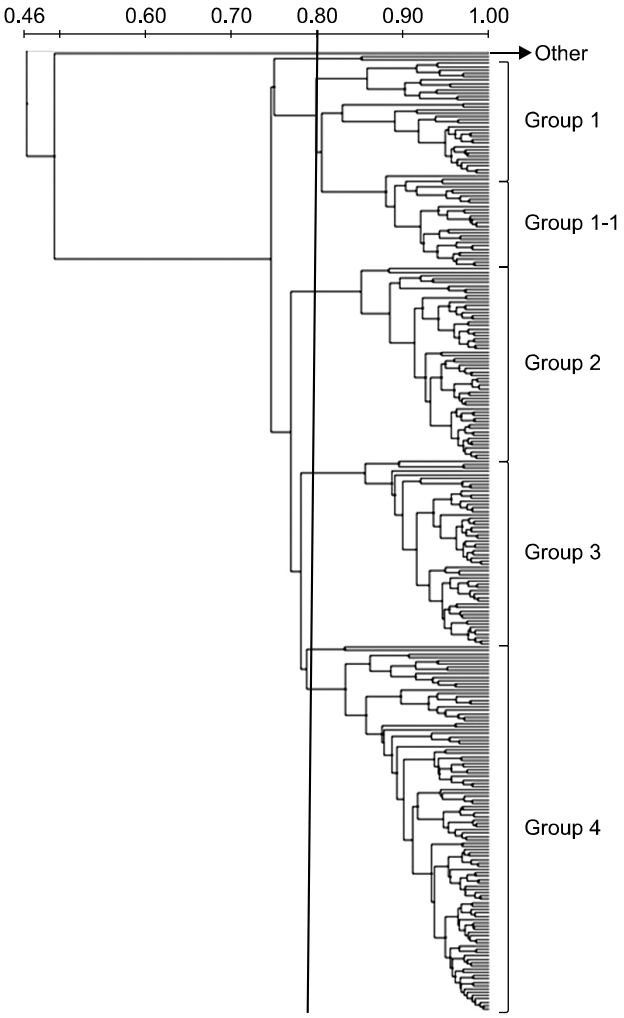

Fig. 1. Dendrogram of the similarity index by unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) among two hundred sixty-five *A. baumannii* isolates provided by REP-PCR analysis.

DISCUSSION

국내 24개 병원에서 분리된 *Acinetobacter* spp.의 imipenem 내성률은 1997년 1%에서 2007년 22%로 꾸준한 증가를 보이다가 2009년에는 51%로 급격히 증가하였고 이러한 급격한 증가는 OXA형 carbapenemase의 생성에 의한 것이며, 특히 *A. baumannii*의 경우 bla_{OXA-23}-like의 생성이 주된 원인으로 보고하였다[31]. 또한 quinolone, amikacin, ceftazidime에 대한 내성률은 1999년부터 2007년까지 감소하였으나, 2009년 다시 증가하는 경향을 보이면서 각각 67%, 66%와 48%까지 증가하였다[31]. 2005년 1-8월까지 국내 17개 병원과 한 곳의 임상검사센터에서 수집된 144주의 imipenem 내성 *Acinetobacter* spp. 중에서 49주의 *A. baumannii*에서 bla_{OXA-23} 유전자가 존재하므로 bla_{OXA-23} 유전자가 carbapenem 내성의 주요 원인임을 보고되었다[32]. 2010년 충청 지역의 대학병원에서 분리된 MDR *A. baumannii* 중 77%에서 bla_{OXA-23} 유전자가 확인되었으며, 이들 모두에서 IS*Aba*1이 확인되었다[33]. 2006년에서 2007년까지 Asia-Pacific (APAC) 지역의 10개국 41개 병원에서 분리된 imipenem 내성 *Acinetobacter* spp.는 bla_{OXA-23} 유전자의 분포가 가장 높았다[34]. 따라서 국내를 비롯한 아시아 태평양 지역에서 분리된 *A. baumannii*의 imipenem 내성은 bla_{OXA-23} 유전자가 가장 흔한 원인으로 여겨진다. 또한 본 연구를 포함한 국내의 자료를 종합해 보면 bla_{OXA-23} 유전자가 시간이 지날수록 더 우세하게 분포하는 것을 알 수 있었다. 2010년 강원도 춘천에서 분리된 86주의 *A. baumannii*도 대부분의 β-lactam계와 quinolone계 항균제에 내성을 나타내었으며, cefepime과 aminoglycoside계 항균제

Table 4. Molecular characterization group of MDR *A. baumannii* by REP-PCR similarity index

Group	Number of isolates (n=285)	Number of isolates showing resistance patterns (%)																
		β-lactam		Aminoglycoside					Quinolone									
				Aminoglycoside modifying enzyme				16S rRNA methylase	*gyr*A				*par*C					
		$bla_{OXA-23-like}$/ $bla_{OXA-51-like}$	IS*Aba*1/ $bla_{OXA-23-like}$	*aac(3)-Ia*	*aac(6')-Ib*	*aph(3)-Ia*	*arm*A	Substitution	Polymorphism		Substitution		Polymorphism					
								83	71	162	80	109 (A)	109 (G)	124	126			
1	36	36 (100.0)	36 (100.0)	12 (33.3)	16 (44.4)	4 (11.1)	22 (61.1)	36 (100.0)	36 (100.0)	36 (100.0)	36 (100.0)	10 (27.8)	26 (72.2)	26 (72.2)	26 (72.2)			
1-sub	28	28 (100.0)	28 (100.0)	8 (28.6)	20 (71.4)	0	24 (85.7)	28 (100.0)	28 (100.0)	28 (100.0)	28 (100.0)	0	28 (100.0)	28 (100.0)	28 (100.0)			
2	57	57 (100.0)	57 (100.0)	8 (13.8)	20 (35.1)	8 (13.8)	3 (5.3)	57 (100.0)	57 (100.0)	57 (100.0)	57 (100.0)	55 (94.8)	3 (5.2)	3 (5.2)	3 (5.2)			
3	55	55 (100.0)	55 (100.0)	3 (5.4)	3 (5.4)	0	0	55 (100.0)	55 (100.0)	55 (100.0)	55 (100.0)	55 (100.0)	0	0	0			
4	107	107 (100.0)	107 (100.0)	57 (53.3)	61 (57.0)	23 (21.5)	92 (86.0)	107 (100.0)	107 (100.0)	107 (100.0)	107 (100.0)	28 (26.2)	79 (73.8)	79 (73.8)	79 (73.8)			
Other	1	1 (100.0)	1 (100.0)	0	0	0	0	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	0	0	0			

에도 높은 내성률이었고, colistin에는 모두 감수성이었는데[15] 본 연구의 강원도 원주 지역에서도 imipenem 내성 *A. baumannii*는 colistin을 제외한 대부분의 시험한 항균제에 다제내성이었다. 본 연구의 *A. baumannii*의 imipenem 내성 원인은 bla_{OXA-23}-like 유전자를 가지고 있는 모든 균주가 bla_{OXA-23}-like 유전자의 upstream에 IS*Aba*1이 존재하여 내성을 유도하는 것으로 확인되었다. 2010년 강원도 춘천 소재의 대학병원에서 분리된 86주의 *A. baumannii*에서도 본 연구와 동일하게 bla_{OXA-23}-like와 bla_{OXA-51}-like가 동시에 검출되었고, IS*Aba*1이 bla_{OXA-23}-like의 upstream에 존재하였다[15]. 이러한 결과로 볼 때 강원도 영서 지역은 IS*Aba*1이 upstream에 존재하는 bla_{OXA-23}-like 유전자를 생성하는 *A. baumannii*가 확산되어 만연되어 있어 임상검체에서 흔히 분리되며, carbapenem계 항균제에 내성을 유발하는 것으로 확인되었다. 그러나 bla_{OXA-23} 유전자의 발현에 의한 carbapenem 내성의 확산이 bla_{OXA-23} 유전자의 수평적 전달에 의한 것인지 bla_{OXA-23} 유전자를 보유한 세균의 클론 확산(clonal spread)에 의한 것인지는 불분명하다.

본 연구의 imipenem 내성 *A. baumannii*는 cefepime에 98.2%의 내성률을 보였으나 cefepime 내성을 획득하는 데 중요한 기전 중 하나인 bla_{PER-1} 유전자는 모든 균주에서 존재하지 않았다.

강원도 춘천에서 분리된 MDR *A. baumannii*에서도 본 연구에서 확인된 GyrA와 *par*C의 돌연변이에 의한 코돈의 치환이 확인되었다[15]. 충청 지역의 대학병원에서 분리된 *A. baumannii*에서는 GyrA의 83번째 codon인 Ser과 ParC의 80번과 84번 코돈의 변화가 보고되었는데[35], ParC는 본 연구에서도 80번 코돈의 치환이 있었으나, 84번 코돈의 치환은 없는 것으로 보아 국내에서도 유전자 치환이 지역적인 차이가 있는 것으로 여겨진다. 아미노산의 치환이 나타나지 않는 *gyr*A와 *par*C의 다형태가 quinolone계열 항균제 내성에 영향을 주는 지를 확인하기 위해서는 다양한 종류의 quinolone계열 항균제에 대한 MIC 농도를 측정해 볼 수 있을 것이다.

*A. baumannii*의 aminoglycoside계 항균제 내성 기전은 16S rRNA methylase에 의한 post-transcriptional rRNA methylation과 AME에 의한 것이 중요 내성 기전이다[10]. 본 연구에서는 *arm*A 유전자가 50.2%로 가장 흔하였고 *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, rmtE과 *npmA*는 검출되지 않았으며, AME 중에서는 *aac*(6')-*Ib*가 28.4%로 가장 흔하였다. 2005년 충청지역에서 분리된 *A. baumannii*는 *aac*(3)-*Ia*, *aac*(6')-*Ib*, *ant*(3")-*Ia*, *aph*(3')-*Ia*와 *aph*(3')-*VI* 등의 유전자가 검출되었고, *ant*(2")-*Ia*와 *ant*(3")-*Ia*를 같이 갖고 있는 균주도 보고하였으나[36] 본 연구에서는 aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT)를 생성하는 *A. baumannii*는 검출되지 않았다. 2010년 강원도 춘천에서 분리된 *A. baumannii*도 ANT 종류의 AME가 없었으며, *arm*A, *aac*(3)-*Ia*, *aac*(6')-*Ib*와 *aph*(3')-*Ia*를 생성하는 균주 비율은 52%로 원주 지역보다 높았다[15]. 이런 결과로 볼 때 강원도 영서 지역에서

는 아직 nucleotidyltransferase를 생성하는 *A. baumannii*가 만연하지 않은 것으로 여겨진다.

REP-PCR에 의한 균주 간의 근연도 80% 이상에서 크게 4개의 군으로 구분되었고, 이 중 1번군은 두 개의 소집단으로 구분이 가능하였다. 각 군별 분포는 군 4가 107주로 가장 많은 분포를 나타내었다. 각 군별 항생제 내성 양상의 특성으로 군 1-1의 경우(28주)는 AME 유전자 중 *aph*(3')-*Ia*가 존재하지 않았으며, *par*C 유전자의 염기서열에서 109번째 코돈에서의 다형태가 모든 균주에서 G로 확인되어 다른 군과 차이를 나타내었다. 군 3(55주)의 경우는 군 1-1과 마찬가지로 AME 유전자 중 *aph*(3')-*Ia*가 존재하지 않았으며, *arm*A도 없었고, *par*C 유전자 염기서열에서 109번째 코돈에서의 다형태가 모든 균주에서 A로 확인되었으며 124, 126번째 코돈에서의 다형태는 나타나지 않았다.

MDR *A. baumannii*의 항균제 내성률과 내성 유전자의 분포는 지속적으로 모니터링 하여 병원 내 전파나 지역 내 확산을 조기에 감지할 수 있는 시스템을 구축해야 할 것이다. 또한 지속적인 모니터링 데이터는 MDR *A. baumannii*에 의한 감염증의 치료 지침과 내성 세균 확산 방지를 위해 필요한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. J Clin Microbiol 2007; 45:3352-9.
2. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:5035-8.
3. Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN, et al. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;68:432-8.
4. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán 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.
5. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45: 583-8.
6. Héritier 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.
7. Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. J Microbiol 2006;44:423-31.
8. Roh KH, Kim CK, Yum JH, Yong D, Jeong SH, Lim CS, et al. Carbapenem resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. from four hospitals in Seoul and Gyeonggi province in 2006. Korean J Clin Microbiol 2010;13:27-33.
9. Segal H, Jacobson RK, Garny S, Bamford CM, Elisha BG. Extended-10 promoter in IS*Aba-1* upstream of bla_{OXA-23} from *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3040-1.
10. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21: 538-82.
11. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of IS*Aba*1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 2006;258:72-7.
12. Bae IK, Jeong SH, Lee K. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean J Clin Microbiol 2012;15:1-8.
13. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1749-51.
14. Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG, et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying bla_{OXA-23}, bla_{PER-1} and *arm*A in a Korean hospital. Clin Microbiol Infect 2008; 14:716-8.
15. Lee G, Lee JH, Lim K, Suh IB, Ryu SW, Eom YB, et al. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23-like from a healthcare facility of Gangwon Province, South Korea. Int J Antimicrob Agents 2012;39:452-3.
16. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyr*A gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1201-3.
17. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *par*C gene of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1997;39:757-62.
18. Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyr*A and *par*C associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003;51:177-80.
19. Hamouda A and Amyes SG. Novel *gyr*A and *par*C point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 2004;54:695-6.
20. Vakulenko SB and Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003;16:430-50.
21. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1843-5.
22. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2565-71.
23. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;56:305-12.
24. Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst Appl Microbiol 1998;21:33-9.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. Document M100-S21. Wayne, PA; Clinical and La-

boratory Standards Institute, 2011.
26. 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.
27. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006;27:351-3.
28. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS*ABA-1* customized for *Acinetobacter*? FEMS Microbiol Lett 2005;243:425-9.
29. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, et al. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2009;47:1436-42.
30. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. J Clin Microbiol 2010;48:1132-8.
31. Lee K, Kim MN, Kim JS, Hong HL, Kang JO, Shin JH, et al; KONSAR Group. Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009. Yonsei Med J 2011; 52:793-802.
32. Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH, et al; KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents 2009;33:520-4.
33. Park YS, Lee H, Lee KS, Hwang SS, Cho YK, Kim HY, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases--a multicentre study. Int J Antimicrob Agents 2010;36:430-5.
34. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2009;63:55-9.
35. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med 2010;30:498-506.
36. Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *arm*A in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;64:185-90.

=국문초록=

한 대학병원에서 분리된 bla_{OXA-23}을 생성하는 *Acinetobacter baumannii*의 분자생물학적 특성

[1]연세대학교 원주의과대학 진단검사의학교실, [2]연세대학교 원주캠퍼스 임상병리학과,
[3]상지대학교 생명자원과학대학 동물생명자원학부

장인호[1], 박순덕[1], 어 영[1], 이규상[2], 김종배[2], 최 일[3]

배경: 다제내성 *Acinetobacter baumannii*는 전 세계적으로 병원 내 감염의 중요한 원인균으로 증가하고 있다. 본 연구의 목적은 최근 임상검체에서 분리된 다제내성 *A. baumannii*의 분자유전학적 특성을 파악하고자 하였다.
방법: 2011년 3월에서 11월까지 강원도 원주시 소재의 한 대학병원에서 분리된 중복분리를 제외한 285주의 imipenem 내성 *A. baumannii*를 대상으로 다제내성 유전자를 분석하였다.
결과: 285주의 imipenem 내성 *A. baumannii* 모두에서 bla_{OXA-23}-like와 bla_{OXA-51}-like가 검출되었고, bla_{OXA-23}-like 유전자의 upstream에 IS*Aba*1이 존재하였다. 16S rRNA methylase인 *arm*A 유전자가 153주(50.2%)에서 확인되었으나, *rmt*A, *rmt*B, *rmt*C, *rmt*D과 *npm*A 유전자는 검출되지 않았다. Aminoglycoside 변경 효소에 관여하는 유전자 중에서는 *aac*(6')-*Ib*가 가장 높은 빈도를 나타내었다. *gyr*A와 *par*C의 quinolone resistance determining regions에서 염기서열분석에서는 Ser (TCA) 83이 Leu (TTA)으로, Ser (TCG) 80이 Leu (TTG)로 아미노산이 각각 치환되었다. 대상 균주의 근연도에서는 한 주를 제외한 모든 균주에서 유사한 repetitive extragenic palindromic-PCR profiles이 관찰되었다.
결론: 강원도 원주 지역에서 분리된 다제내성 *A. baumannii*의 내성 유전자의 특성은 국내 다른 지역과 유사하였다. [Ann Clin Microbiol 2013;16:126-133]

교신저자 : 어 영, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162
원주기독병원 진단검사의학과
Tel: 033-741-1592, Fax: 033-731-0506
E-mail: u931018@yonsei.ac.kr