

Imipenem-nonsusceptible
*Acinetobacter baumannii*와
*Pseudomonas aeruginosa*의
carbapenemase에 의한
항생제 내성유형과
분자생물학적인 특성분석

연세대학교 보건환경대학원
의생명과학전공
이진희

Imipenem-nonsusceptible
*Acinetobacter baumannii*와
*Pseudomonas aeruginosa*의
carbapenemase에 의한
항생제 내성유형과
분자생물학적인 특성분석

지도 김 종 배 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6 월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

이 진 희

이 진 회의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 보건환경대학원

2008년 6 월 일

감 사 의 글

많은 분들이 있어 오늘의 제가 존재합니다. 그 시간들을 함께 했던 많은 분들께 감사를 드립니다.

이 한편의 논문을 쓸 수 있도록 부족한 저를 받아주시고, 지도해 주셨던 김종배 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 늦은 밤까지 몇 명의 학생에게라도 배움을 주고자 애쓰셨던 양용석 교수님, 오옥두 교수님, 김태우 교수님, 박용석 교수님, 이해영 교수님, 그리고 김윤석 교수님께도 감사드립니다.

그리고, 제게는 또 다른 스승인 이규상 선생님, 주말 그리고 늦은 밤까지도 함께 하며 저의 부족함을 채워주었던, 임관훈 선생님과 김지용 선생님께도 감사를 드립니다.

학업과 직장생활을 병행하느라 일주일에 한번 늦은 밤에 만나 공부하고 헤어지면서도 늘 밝은 웃음을 주었던 이지아 선생님, 박임희 선생님, 박순덕 선생님, 이동섭 선생님, 박수정 선생님, 그리고 오대위님께도 고맙다고 말하고 싶습니다.

무엇보다 직장생활과 학업을 병행할 수 있도록 많은 배려와 용기를 주신 강원대학교병원 진단검사의학과 가족들에게 감사를 드립니다. 서인범 과장님, 류숙원 교수님, 문종식 실장님, 노승기 선생님, 윤석관 선생님, 홍명국 선생님, 조용희 선생님께 감사드립니다. 또한 함께 일하며 저의 빈자리를 잘 채워 주었던 박순미 선생님을 비롯한 우리 후배 선생님들께도 고맙다고 말하고 싶습니다.

논문을 핑계로 자주 찾아뵙지 못한 며느리에게 힘내라고 늘 말씀해 주시던 시부모님, 그리고 하나뿐인 오빠와 새언니, 제 삶의 활력소인 사랑하는 우리조카 승연이과 내현, 내경이가 있어 끝까지 최선을 다할 수 있었습니다.

결혼과 함께 논문을 쓰느라 주말마다 운전기사가 돼 주며, 늦은 시간까지 같이 기다려주었던 우리 신랑, 일태오빠, 사랑하고 고마워요. 그리고 논문을 쓰던 힘든 사이에 제게로 와, 무한한 행복을 느끼게 해준 뱃속의 아가에게 모든 사랑을 전합니다.

서른이 넘은 딸의 귀갓길이 걱정되어 잠 못 이루시던 엄마, 엄마가 있어 힘든 줄도 모르고 2년 반을 지냈습니다. 사랑해요 엄마.

그리고 만약 살아가셨다면 가장 많은 조언과 격려를 아끼지 않으셨을 아빠에게 이 모든 고마움을 드립니다.

2008년 6월 이 진 희 드림

목 차

표 및 그림 목차	iii
약 기 호 표	v
국문 요약	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	5
1. 임상검체에서 세균의 분리 동정	5
2. 항생제 감수성 시험	5
3. Carbapenemase 생성 균주 선별	6
3-1 Carbapenemase 생성 균주 선별	6
3-2 Metallo- β -lactamase 생성 선별 시험	6
4. DNA 추출	7
5. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응	7
5-1 Carbapenemase 특이 primer	7
5-2 Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응	9
6. RAPD에 의한 유전자 지문 분석법	9
제 3 장 연구 성적 및 결과	11
1. 임상검체에서 세균의 분리 동정 결과	11
2. 항생제 감수성 시험 결과	13
3. Carbapenemase 생성 균주 선별 시험 결과	15
4. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응 결과	18
5. 중합효소 연쇄반응에 의한 carbapenemase 유전형 분류	19
6. RAPD에 의한 유전자 지문 분석	21
7. 분리 균주간 유전적 유연성 분석	24
제 4 장 고 찰	28
제 5 장 결 론	34

참 고 문 헌	35
영 문 요 약	43

표 및 그림 목차

Table 1. Primer sequences for identification of carbapenemase	8
Table 2. Sources of imipenem-nonsusceptible <i>A. baumannii</i> and <i>P. aeruginosa</i> isolates	12
Table 3. Antimicrobial resistance for carbapenemase-producing clinical isolates of <i>A. baumannii</i> and <i>P. aeruginosa</i> by Microscan Walkaway 96 SI System ..	14
Table 4. Carbapenemase genotypes identified by PCR	20
Table 5. Resistance patterns of imipenem-nonsusceptible isolates	27
Figure. 1. Identification of carbapenemase-producing clinical isolates using modified Hodge tests.	16
Figure. 2. Double disk synergy tests using disks of IPM and EDTA with SMA	17
Figure. 3. Random amplified polymorphic DNA of carbapenemase-producing <i>A. baumannii</i> isolates using RTG-2 primers	22
Figure. 4. Random amplified polymorphic DNA of carbapenemase-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates using M13 primers	23
Figure. 5. Dendrogram of the similarity index among isolates of <i>A. baumannii</i>	

by RAPD with RTG-2 primers 25

Figure. 6. Dendrogram of the similarity index among isolates of *P. aeruginosa*
by RAPD with M13 primers 26

약 기 호 표

ATCC : American Type Culture Collection

bp : base pair

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

GIM : German imipenemase

IMP : Active on imipenem

MBL : Metallo- β -lactamase

MIC : Minimal inhibitory concentration

OXA : Active on oxacillin

PCR : Polymerase chain reaction

RAPD : Random amplified polymorphic DNA

SIM : Seoul imipenemase

SMA : Sodium mercaptoacetic acid

SPM : Sao Paulo metallo- β -lactamase

VIM : Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

국문 요약

Imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 carbapenemase에 의한 항생제 내성유형과 분자생물학적인 특성분석

2007년 7월부터 2008년 4월까지 강원도 춘천시 소재 강원대학교병원 진단검사의학과에서 분리된 imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* 34주와 *Pseudomonas aeruginosa* 32주를 대상으로 Microscan System을 통하여 여러 항생제에 대한 최소발육억제농도를 측정하고, modified Hodge test와 IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test를 시행하여 carbapenemase 생성 균주를 선별하였다. 그리고 중합효소 연쇄반응을 이용하여 국내에서 보고된 metallo- β -lactamase 및 OXA- β -lactamase를 검출하고자 하였다. 그 결과 *A. baumannii*중 bla_{OXA-23} -like가 20주, bla_{IMP-1} -like, bla_{VIM} 이 각각 10주와 5주 검출되었다. 그리고 *P. aeruginosa*에서는 bla_{IMP-1} -like 31주, bla_{VIM} 1주를 확인할 수 있었다.

또한 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 분자 역학적인 검사법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR을 시행하고, dendrogram을 작성하여 균주들 간의 유사성으로 근연도를 분석하였다. 그 결과 *A. baumannii*는 40% 이상의 수준에서 크게 6개의 군으로 나뉘어졌고, AC2와 AC6 군은 검사에 사용한 모든 항생제에 내성을 보였으며, AC5 군은 ampicillin/sulbactam과 imipenem을 제외한 항생제에 모두 내성을 나타내었다. AC4 군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem을 제외한 항생제에, AC3 군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem, tobramycin을 제외한 항생제에 내성을 나타내었으며, AC1 군은 ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefepime, levofloxacin, tobramycin을 제외한 항

생제에 내성을 나타내었다. *P. aeruginosa*는 50% 이상의 수준에서 7개의 군으로 나뉘어졌고, PS3 군이 가장 많은 항생제에 내성을 지니고 있었으며, PS1 군은 대부분의 항생제에 감수성을 보였다. PS7 군은 다른 군과 다르게 aztreonam에 내성을 지니고 있었으며, PS4, 5, 6군은 각 군간 두 개의 항생제에 차이를 보이며 유사한 양상을 보였다.

각각의 군들의 결과를 비교해 본 결과 항생제 내성 유형과 carbapenemase 유전자 검사 결과를 토대로 imipenem-nonsuceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 분류가 가능하였다.

핵심되는 말: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Carbapenemase, *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{IMP-1}-like, *bla*_{VIM}, RAPD-PCR

제 1 장 서 론

포도당 비발효 그람음성 간균인 *Acinetobacter baumannii*(이하 *A. baumannii*)와 *Pseudomonas aeruginosa*(이하 *P. aeruginosa*)는 병원감염의 중요 원인균으로 그 분리빈도가 높고, 호흡기 및 요로감염, 수막염, 심내막염, 화상감염, 창상감염, 패혈증 등 다양한 유형의 감염증을 유발한다(6). 현재 이 두 균종이 다약제 내성을 보이는 경우가 증가하고 있어 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있다(32).

β -lactamase의 생성은 그람음성 간균이 β -lactam계 항생제에 내성을 획득하는 중요한 기전이다(40). β -lactam계 항생제중 carbapenem 항생제는 주로 imipenem과 meropenem이 사용되는데, 이는 이들 항생제가 다약제 내성을 보이는 포도당 비발효 그람 음성 간균에도 효과적으로 사용할 수 있기 때문이다(22,25). 그 이유는 carbapenem 항생제는 penicillin binding protein과 친화도가 높으며, extended spectrum β -lactamase와 AmpC- β -lactamase에 안정도가 상대적으로 높으며, bacteria의 세포외막에 높은 투과도를 보이기 때문이다(25). 그러나 다약제 내성 그람음성 간균이 증가함에 따라서 carbapenem의 사용이 증가하였고, 결국은 carbapenem에 대해서도 내성인 균주가 보고되기 시작하였다(37). 현재 carbapenem 내성은 주로 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*에서 관찰되는데, 국내에서도 carbapenem 내성균주가 점차 증가하고 있어 더욱 심각한 문제가 되고 있다(14,41).

그람 음성 간균의 carbapenem 내성 기전 중 가장 중요한 것은 β -lactamase의 생성에 의한 carbapenem의 불활화이며, 특히 *Acinetobacter* spp.와 *Pseudomonas* spp.의 carbapenem-hydrolyzing β -lactamase(carbapenemase)는 주로 molecular class B metallo- β -lactamase 또는 class D β -lactamase이다(36,44).

Amber class B β -lactamase는 metallo- β -lactamase(MBL)로서 효소활성시 metal ion, 주로 zinc²⁺를 가져 활성을 나타낸다. 이들은 penicillin뿐만 아니라 협범위 및 광범위의 cephalosporin계, carbapenem계 등 aztreonam을 제외한 β

-lactam 항생제 대부분에 가수분해 활성이 있으며, metal chelator 즉, EDTA에 의해서 활성이 억제되는 특징이 있다(24,44,45). IMP(Active on imipenem), VIM(Verona integron-encoded metallo- β -lactamase)이 대표적인 MBL이며, SPM(Sao Paulo metallo- β -lactamase)과 GIM(German imipenemase), SIM(Seoul imipenemase)등도 보고되었다(9,21).

IMP-1 metallo- β -lactamase는 1988년 일본에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 보고되었으며, 현재까지 IMP-24까지 발견 되었다 (<http://www.lahey.org/studies/>)(38). VIM-1 metallo- β -lactamase는 1999년에 이태리에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 보고되었으며, 2000년에 프랑스에서 VIM-2가 보고되었다 (33,34). 지금까지 VIM-20까지의 변종이 보고되었다(<http://www.lahey.org/studies/>). 또한 SPM-1과 GIM-1이 각각 브라질과 독일에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 보고되었으며, 국내에서 분리된 *Acinetobacter* spp.에서 SIM-1이 보고되었다. 국내에서는 포도당 비발효 그람음성 간균에서 IMP-1과, VIM-2 그리고 SIM-1이 보고된 바 있다(5,21,39).

VIM, IMP, GIM, SIM 등의 대부분의 MBL 유전자는 class I integron 내에 gene cassette 형태로 존재한다. 이 integron에 존재하는 항생제 내성 유전자 cassette는 한 integron에서 다른 integron으로 자유롭게 이동할 수 있으나 이들 자신이 다른 세균으로 이동하지는 못하며, plasmid나 transposon이 이동될 때 함께 이동하므로 내성유전자가 다른 균종으로 쉽게 전파되는 것으로 알려져 있다 (2,36). 국내에서 MBL 생성으로 인한 imipenem-resistant *Acinetobacter* spp.와 *P. aeruginosa*가 각각 50%와 10% 이상으로 보고되었으며, 다른 그람 음성 간균으로 imipenem 저항성이 쉽게 전파될 수 있음을 경고하였다(20,42).

Amber class D β -lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대한 강한 활성을 나타내므로 oxacillinase라고 부른다(10,28,32). OXA- β -lactamase 또한 MBL와 마찬가지로 extended-spectrum cephalosporin을 가수분해하며, carbapenem을 불활화한다. 또한 clavulanic acid나 EDTA에 의해 억제되지 않는 특징이 있다(28,46). 국내에서 보고된 OXA-type carbapenemase는 주로 두 가지 다른 무리로 분류되는데, OXA-23-like cluster(OXA-23, -27)와 OXA-24-like cluster(OXA-24, -25,

-26, -40)이다. OXA-23과 27은 99% 이상의 아미노산 동일성을 보이지만, OXA-23-like cluster와 OXA-24-like cluster는 몇 개의 아미노산 치환으로 인해 60%의 일치도를 보인다(1,3,12).

OXA-23은 1985년 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 처음 확인되었으며, OXA-24는 1997년 스페인에서 집단감염을 일으킨 imipenem 내성 *A. baumannii* 균주에서 검출되었다(3,8,31). 국내에서는 Jeon(2004년) 등이 imipenem에 내성을 지닌 *A. baumannii*의 69.2%에서 OXA-23 β -lactamase 생성을 보고한 바 있다(15). OXA-type β -lactamase는 다른 β -lactamase와 마찬가지로 class I integron에 다른 효소들과 함께 cassette로 존재한다(11).

그러나 국내에 carbapenem 내성균의 보고는 비교적 최근이며, 이에 대한 연구가 아직 많지 않다. *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*가 원내감염의 주요 원인균임을 고려할 때, 면역이 저하된 중증의 장기 입원환자가 많은 병원에서 더 많이 분리되고, 또 이에 따라 carbapenem을 많이 사용하게 되는 병원에서 carbapenem 항생제에 대한 내성율이 높을 것으로 생각된다. 그러나 포도당 비발효 그람 음성 간균의 carbapenemase 검출 지침이 Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS ; National Committee for Clinical Laboratory Standards) 권장에 포함되어 있지 않아 정확한 검사가 이루어지지 않으므로 검출이 어렵고, 이런 다약제 내성균에 대한 치료시 감수성 약제의 제한으로 병원내 내성균 확산이 임상적으로 중요한 문제로 대두되고 있다.

Lee 등은 modified Hodge test로 carbapenemase 생성 그람 음성 간균을 선별하고, imipenem(IPM)-EDTA double-disk synergy test로 MBL 생성 그람 음성 간균과 MBL 비생성 그람 음성 간균을 분리할 수 있다고 보고하였다(19,22).

이에 본 연구에서는 강원도의 한 대학병원에서 분리된 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 Amber Class B와 D의 carbapenemase 생성현황을 조사하고 유전형을 분석하고자 하였다. Microscan Walkaway 96 SI System (Dade Behring, West Sacramento, USA)을 통해 여러 항생제에 대한 MIC를 측정하여 약제 내성 유형을 비교하고 modified Hodge test와 imipenem(IMP)-EDTA-SMA double-disk synergy test를 시행하여

carbapenemase 생성 균주를 선별하였다. 또한 국내에서 대표적으로 분리되는 carbapenemase 유전자인 *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}를 검출하기 위하여 분자생물학적인 분석방법인 PCR을 실시하여 이들 유전자를 확인하였고, imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 내성 유형을 유전적으로 분석하기 위해서 PCR을 기반으로 한 fingerprinting 방법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR을 시행하였다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 임상검체에서 세균의 분리 동정

2007년 7월부터 2008년 4월까지 강원도 춘천시에 소재하고 있는 강원대학교병원 진단검사의학과에 의뢰된 가검물에서 분리된 *A. baumannii* 65주와 *P. aeruginosa* 56주중 중복검체를 제외한 imipenem-non susceptible *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주를 실험에 사용하였다. 임상분리 균주는 MacConkey agar(Asan Pharm., Hwaseong, Korea)에 배양하고, 균주의 동정은 Microscan Walkaway 96 SI System의 Dried Neg Combo panel type 44(Dade Behring, West Sacramento, USA)에 접종하여 세균의 생화학적 동정을 시행하였다. 동정 및 항생제 감수성 검사를 위한 표준균주는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다.

2. 항생제 감수성 시험

항생제 내성 유형을 파악하기 위한 항생제 감수성 실험은 Microscan Walkaway 96 SI System에 의한 최소발육억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)를 사용하였다. 실험방법으로는 실험균주를 MacConkey agar에 접종하고 37°C에서 호기성 환경으로 하룻밤 배양한 후 단일 집락을 멸균된 면봉으로 취하여 3.0 ml sterile inoculum water(Dade Behring, West Sacramento, USA)에 부유시키고 O.D.(optical density)값 0.1, 최종농도 0.5 McFaland barium sulfate turbidity standard에 맞추었다. 농도를 맞춘 3.0 ml sterile inoculum water에서 100 μ l를 25 ml inoculum water pluronic-D(Dade Behring, West Sacramento, USA)에 넣어 잘 혼합하였다. 혼합한 세균액을 inoculator-D(Dade Behring, West Sacramento, USA)에 분주하고 RENOK(Dade Behring, West Sacramento, USA)을 이용하여 이 부유액을 취하고 Dried Neg Combo panel type

44에 접종하여 Microscan System이 요구하는 조작에 따라 MIC를 측정하였다.

MIC의 측정을 위해 *A. baumannii*의 경우 ampicillin/sulbactam, amikacin, aztreonam, ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, ciprofloxacin, cefepime, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, trimethoprim/sufamethoxazole, ticarcillin/K clavulante, tobramycin을 사용하였다. *P. aeruginosa*의 경우 amikacin, aztreonam, ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime, ciprofloxacin, cefepime, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/ K clavulante, tobramycin을 사용하였다. 항생제 감수성의 판단은 CLSI M100-S16(formerly NCCLS, 2006)에 준하여 시행하였다.

3. Carbapenemase 생성균주 선별

3-1 Carbapenemase 생성균주 선별

Lee(19,22) 등의 방법에 따라서 modified Hodge test 시험으로 선별하였다. 50 mM의 zinc sulfate 용액($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)을 70 $\mu g/ml$ 의 농도로 Mueller-Hinton agar(Difco, Detroit, USA)에 첨가하여 제조하였다. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 0.5 McFarland로 맞추어 zinc sulfate가 첨가된 Mueller-Hinton agar에 고르게 접종하고, 시험균주를 백금으로 평판의 중앙에서 가장자리로 한 줄로 굵게 접종한 후 실온에서 15분 동안 방치하였다. 배지 중앙에 10 μg imipenem disk(Becton Dickinson, BBL, Sparks, USA)을 놓은 후 37°C에서 호기성 환경에서 하룻밤 배양 후 뒤틀린 억제대 확장현상이 관찰되거나, 접종선 중앙 쪽 말단 부위가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되면 carbapenem 가수분해 양성으로 판독하였다.

3-2 Metallo- β -lactamase 생성 선별시험

Lee(19,22) 등의 방법에 따라 IMP-EDTA-SMA(sodium mercaptoacetic acid, Acros Organics, Geel, Belgium) double-disk synergy 시험으로 선별하였다. 순수 배양된 집락을 백금침으로 채취한 후 멸균생리식염수에 부유하여 0.5 McFarland

로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 먼봉으로 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 접종한 후, 0.5 M EDTA와 SMA 용액(Disk당 EDTA 750 μg 과 SMA 2 mg)이 첨가된 6 mm diameter blank filter paper disk(Becton Dickinson, BBL, Sparks, USA)와 10 μg imipenem disk의 가장자리 간격이 10 mm가 되도록 부착한 후 실온에서 15분 동안 방치하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C의 호기성 조건에서 하룻밤 배양 후 두 disk 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

4. DNA의 추출

PCR에 사용할 template DNA를 추출하기 위하여 시험세균을 brain heart infusion(Difco, Detroit, USA) broth 4 ml에 접종하여 37°C의 호기성 조건에서 하룻밤 배양하였다. 배양액 1 ml을 1.5 ml conical tube에 취하여 12,000 rpm에서 10분간 원심 후, 상층액을 제거하고 멸균 증류수 1 ml에 부유시켜 다시 12,000 rpm에서 7분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물을 증류수 200 μl 에 부유시키고, 이를 10분간 끓인 후 12,000 rpm에서 7분간 원심 분리하여, 상층액을 취하고 template DNA로 사용하였다.

5. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응

5-1 Carbapenemase 유전자 특이 primer

Carbapenemase 생성시험과 metallo- β -lactamase 생성시험에서 양성을 보인 균주의 형별 확인을 위하여 사용된 각각의 β -lactamase에 대한 primer를 Table 1에 기술하였다. Metallo- β -lactamase인 *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM-1-like}를 검출하기 위한 primer는 각각 IMP-F, IMP-R, VIM-F, VIM-R, SIM1-F, SIM1-R(Bioneer Co., Taejun, Korea)을 사용하였다(15,21). OXA형 carbapenemase인 *bla*_{OXA-23-like}와 *bla*_{OXA-24-like}를 검출하기 위한 primer는 OXA-23F, OXA-23R과, OXA-24F, OXA-24R(Bioneer Co., Taejun, Korea)을 사용하였다(15).

Table 1. Primer sequences for identification of carbapenemase

Primer	Sequence (5' to 3')	Expected size (bp) of PCR product	Reference
IMP-F	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488	(15)
IMP-R	ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
VIM-F	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780	(15)
VIM-R	TGCTACTCAACGACTGAGCG		
SIM1-F	TACAAGGGATTCGGCATCG	571	(21)
SIM1-R	TAATGGCCTGTCCCATGTG		
OXA-23F	GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	1058	(15)
OXA-23R	TCACAACAACATAAAAGCACTGT		
OXA-24F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825	(15)
OXA-24R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		

5-2 Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응

중합효소연쇄 반응은 template DNA 2 μl 에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs(Bioneer Co., Taejun, Korea)를 최종 농도가 200 μM 이 되도록 넣었다. 그 후 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 2 μl , *Taq* DNA polymerase 0.5 U을 첨가하고, MgCl₂를 추가적으로 첨가하여 최종농도가 20 mM이 되도록 하였다. 각각의 primer set 10 pmol/ μl 를 최종 반응 농도가 1 pmol이 되도록 넣은 후, 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20 μl 가 되도록 하여 thermal cycler(GeneAmp[®] PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, USA)를 사용하여 DNA의 증폭을 시도하였다.

IMP-1 type β -lactamase 및 VIM type β -lactamase, SIM-1 β -lactamase의 검출을 위한 PCR 반응은 총 25 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가온한 후 매 cycler 당 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 동안 denaturation, 56 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 지속하였다.

OXA- β -lactamase의 검출을 위한 PCR 반응은 총 25 cycle을 시행하였다. OXA-23- β -lactamase는 첫 cycle이 시작하기 전에 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가온한 후 매 cycler 당 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 동안 denaturation, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 50초 동안 extension 반응을 시행하였다. OXA-24- β -lactamase의 annealing은 58 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 지속하였다. 반응이 종료된 후 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide를 첨가한 1.5 % agarose gel에 전기 영동하여 ultraviolet trans-illuminator(Viber Louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 증폭 산물들을 비교 관찰하였다.

6. RAPD에 의한 유전자 지문 분석법

RAPD-PCR에 사용한 primer는 Kalpoe(16)등이 사용한 것과 같은 M13, DAF4, RTG2, RTG3, RTG4, RTG6를 주문제작(Bioneer Co., Taejun, Korea)하여 본 실험에 사용하였다.

PCR은 template DNA 2 μ l에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 최종 농도가 200 μ M이 되도록 넣었다. 그 후 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 2 μ l, *Taq* DNA polymerase 1 U을 첨가하고, MgCl₂를 추가적으로 첨가하여 최종농도가 20 mM이 되도록 하였다. 각각의 primer set 20 pmol/ μ l를 최종 반응 농도가 2 pmol이 되도록 넣은 후 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20 μ l가 되도록 하여 thermal cycler를 사용하여 DNA의 증폭을 시도하였다.

RAPD에 사용되는 primer중 RTG-2와 RTG-4의 PCR 반응은 총 40 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 가온한 후 매 cycler 당 95 $^{\circ}$ C에서 40초 동안 denaturation, 47 $^{\circ}$ C에서 40초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 40초 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 시행하였다. DAF4의 annealing은 38 $^{\circ}$ C에서 반응을 시행하였으며, M13의 경우 47 $^{\circ}$ C, 그리고 RTG3와 RTG6의 경우 34 $^{\circ}$ C에서 시행하였다.

반응이 종료된 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 전기 영동하여 ultraviolet trans-illuminator로 각각의 증폭 산물들을 비교 관찰하였다. 관찰한 DNA band들은 Bio-Rad FingerprintingTM II software version 3.0(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 유전자형 양상을 분석하였으며, UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

제 3 장 연구 성적 및 결과

1. 임상검체에서 세균의 분리 동정 결과

강원대학교병원 진단검사의학과의 가검물에서 분리된 임상 분리 균주를 Microscan Walkaway 96 SI System에서 요구하는 방법으로 검사를 시행한 결과 *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주로 동정되었다. 각 균주에 따른 가검물의 내용은 Table 2와 같다. 이 중 *A. baumannii*는 sputum 검체 20주, urine 검체 5주, wound, blood, CSF 검체 각각 2주, ascitic fluid, bronchial washing, drain 검체 각각 1주가 분리되었다. *P. aeruginosa*는 sputum 검체 8주, urine 검체 8주, tip 검체 7주, wound 검체 4주, abscess, blood, drain, hemovac, sore 검체 각각 1주가 분리되었다.

Table 2. Sources of imipenem-nonsusceptible *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates

Specimen	Isolated bacteria	
	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Abscess	0	1
Ascitic fluid	1	0
Blood	2	1
Bronchial washing	1	0
CSF	2	0
Drain	1	1
Hemovac	0	1
Sore	0	1
Sputum	20	8
Tip	0	7
Urine	5	8
Wound	2	4
Total	34	32

2. 항생제 감수성 시험 결과

MIC 측정을 위해 Microscan Walkaway 96 SI System을 사용한 결과는 Table 3과 같았다. *A. baumannii*와 *P. aeruginosa* 두 균종 모두 imipenem과 meropenem에 감수성을 나타낸 균주는 없었다.

*A. baumannii*의 경우 Microscan에서 사용한 각각의 항생제에 대한 내성률을 살펴보면 ticarcillin/K clavulanate, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, meropenem, gentamicin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 모든 실험균주들이 내성을 나타내었다. 나머지 항생제에 대한 내성률은 ampicillin/sulbactam 67.7%, cefepime 97.1%, aztreonam 91.2%, imipenem 76.5%, amikacin 91.2%, tobramycin 94.2%, levofloxacin 97.1% 이었다.

*P. aeruginosa*의 경우 Microscan에서 사용한 각각의 항생제에 대한 내성률을 살펴보면 cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin에 모든 실험균주들이 내성을 나타내었다. 나머지 항생제에 대한 내성률은 piperacillin/tazobactam 43.8%, ticarcillin/K clavulanate 93.7%, ceftazidime 93.8%, cefepime 31.3%, aztreonam 65.6%, imipenem 81.2%, meropenem 78.1%, amikacin 78.1%, gentamicin 90.6%, tobramycin 90.6%, levofloxacin 90.6% 이었다.

Table 3. Antimicrobial resistance for carbapenemase-producing clinical isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* by Microscan Walkaway 96 SI System

Antimicrobial classes	Antimicrobial agents	Number of isolates					
		<i>A. baumannii</i> (n=34)			<i>P. aeruginosa</i> (n=32)		
		S	I	R	S	I	R
β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations	Ampicillin/ Sulbactam	1	10	23	ND	ND	ND
	Piperacillin/ Tazobactam	ND	ND	ND	18	0	14
	Ticarcillin/ K clavulanate	0	0	34	2	0	30
Cephems	Cefotaxime	0	0	34	0	0	32
	Ceftazidime	0	0	34	1	1	30
	Ceftriaxone	0	0	34	0	0	32
	Cefepime	1	0	33	1	21	10
Monobactam	Aztreonam	0	3	31	3	8	21
Penems	Imipenem	0	8	26	0	6	26
	Meropenem	0	0	34	0	6	18
Aminoglycosides	Amikacin	3	0	31	7	0	25
	Gentamicin	0	0	34	2	1	29
	Tobramycin	1	1	32	3	0	29
Quinolones	Ciprofloxacin	0	0	34	0	0	32
	Levofloxacin	0	1	33	0	3	29
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim/ sulfamethoxazole	0	0	34	ND	ND	ND

Abbreviations. R; Resistant, I; intermediate, S; susceptible, ND; not done.

3. Carbapenemase 생성균주 선별 시험 결과

Carbapenemase 선별을 위한 modified Hodge test에서는 *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주 모두에서 접종선 중앙 쪽 말단 부위가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되어 carbapenem 가수분해 양성으로 판독하였다(Figure 1).

Carbapenemase 생성 균주 중 MBL 생성 균주를 선별하기 위한 IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test에는 *A. baumannii* 10주를 제외한 모든 균주에서 두 disk 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되어 양성으로 판정하였다(Figure 2).

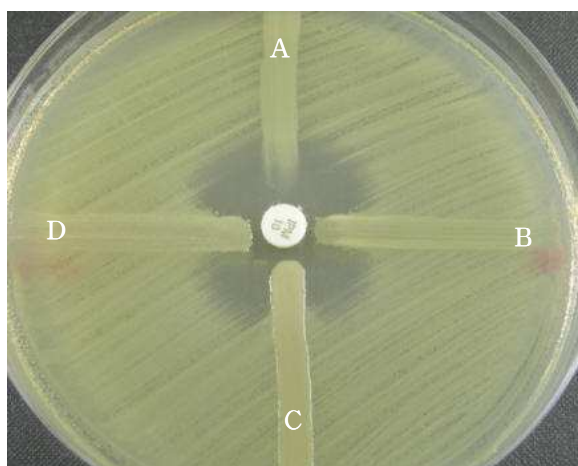
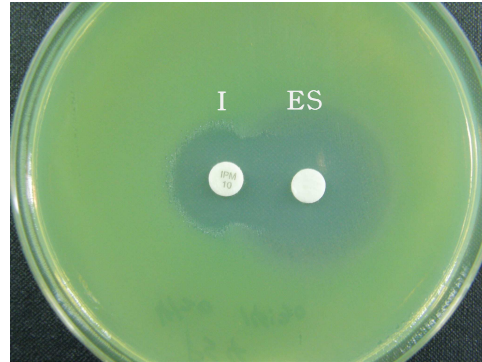


Figure 1. Identification of carbapenemase-producing clinical isolates using modified Hodge tests.

Positive result shows distorted inhibition zone of background. Line (A) is negative control (*E. coli* ATCC 25922), Line (B), (C), and (D) are imipenem-hydrolyzing strains which distorted the inhibition zone.



(A)



(B)

Figure 2. Double disk synergy tests using disks of IPM and EDTA with SMA

Positive result shows enlarged zone of inhibition between the two disks. Plate (A) is negative in IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test, while Plate (B) is positive.

I; imipenem disk, ES; EDTA+SMA disk.

4. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응 결과

국내에서 보고된 carbapenemase 유전자의 대표적인 유전형인 *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}를 검출하기 위해 사용된 PCR primer 들은 Table 1과 같다. PCR 결과 *bla*_{IMP-1-like} 형은 *A. baumannii*에서 10주, *P. aeruginosa*에서 31주에서 검출되었다. *bla*_{VIM} 형은 *A. baumannii*의 5주에서 검출 되었으며 *P. aeruginosa*의 1주에서 검출되었다. *bla*_{SIM-1} 형과 *bla*_{OXA-24-like} 형은 두 균종 모두에서 검출되지 않았다. *bla*_{OXA-23-like} 형은 *A. baumannii*의 20주에서 검출되었으며 *P. aeruginosa* 검체에서는 검출되지 않았다. *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 각각 13주와 1주에서 carbapenemase 유전자가 검출되지 않았다.

5. 중합효소 연쇄반응에 의한 carbapenemase 유전형 분류

PCR을 통하여 분류된 carbapenemase의 유전형을 분류하여 보면, *bla*_{IMP-1-like} 형, *bla*_{VIM} 형, *bla*_{SIM-1} 형, *bla*_{OXA-23-like} 형, *bla*_{OXA-24-like} 형, *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{VIM} 형, *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{OXA-23-like} 형, *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{VIM} + *bla*_{OXA-23-like} 형 그리고, non-typable의 총 9가지로 Table 4에서와 같이 분류가 가능하였다.

각각의 유전형을 살펴보면, *A. baumannii*는 *bla*_{VIM} 형이 1개의 균주에서 검출되었으며, *bla*_{OXA-23-like} 형이 10개의 균주에서만 검출되었다. *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{OXA-23-like} 형과 *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{VIM} + *bla*_{OXA-23-like} 형은 각각 6개와 4개의 균주에서 검출되었으며, non-typable 형은 1개로 확인되었다. *P. aeruginosa*는 30개의 균주에서 *bla*_{IMP-1-like} 형이 검출되었으며, *bla*_{IMP-1-like} + *bla*_{VIM} 형은 1개의 균주에서 검출되었다. non-typable 형은 1개로 확인되었다. *bla*_{SIM-1} 형과 *bla*_{OXA-24-like} 형은 두 균종 모두에서 검출되지 않았다.

Table 4. Carbapenemase genotypes identified by PCR

Carbapenemase genotypes by PCR	Number of isolated carbapenemase gene		Total number of isolates
	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
<i>bla</i> _{MP-1} -like	0	30	30
<i>bla</i> _{VIM}	1	0	1
<i>bla</i> _{SIM-1}	0	0	0
<i>bla</i> _{OXA-23} -like	10	0	10
<i>bla</i> _{OXA-24} -like	0	0	0
<i>bla</i> _{MP-1} -like + <i>bla</i> _{VIM}	0	1	1
<i>bla</i> _{MP-1} -like + <i>bla</i> _{OXA-23} -like	6	0	6
<i>bla</i> _{MP-1} -like+ <i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{OXA-23} -like	4	0	4
None-typable	13	1	24
Total	34	32	66

6. RAPD에 의한 유전자 지문 분석

Imipenem-nonsusceptible한 *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주를 대상으로 M13, DAF4, RTG2, RTG3, RTG4, RTG6 primer를 사용하여 RAPD-PCR을 시행한 결과 DAF4, RTG3, RTG4, RTG6 primer에서는 유전자 절편이 형성되지 않거나, 3개미만의 band를 형성하였다.

따라서 imipenem-nonsusceptible한 34주의 *A. baumannii*와 32주의 *P. aeruginosa*를 대상으로 각각 RTG-2와 M13 primer를 사용하여 RAPD-PCR을 시행하였고, 전기 영동한 결과에서 각각 100 bp에서 2 kb사이에서 10개 이내의 유전자 절편을 나타내었다(Figure 3, 4).

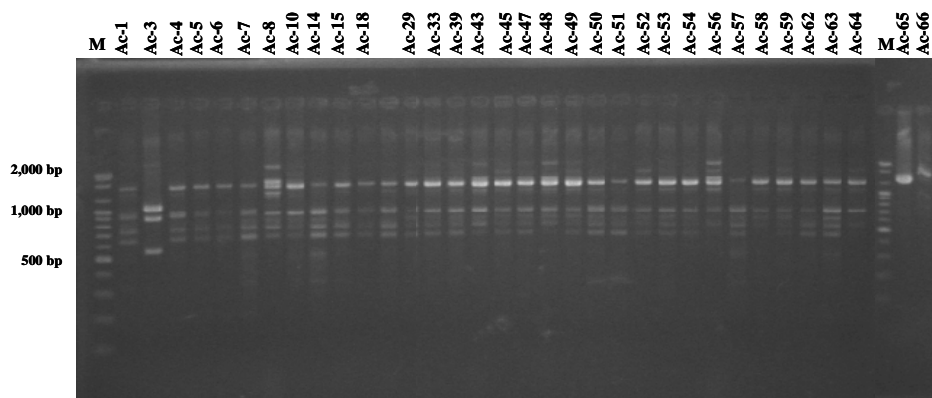


Figure 3. Random amplified polymorphic DNA of carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates using RTG-2 primers.

Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

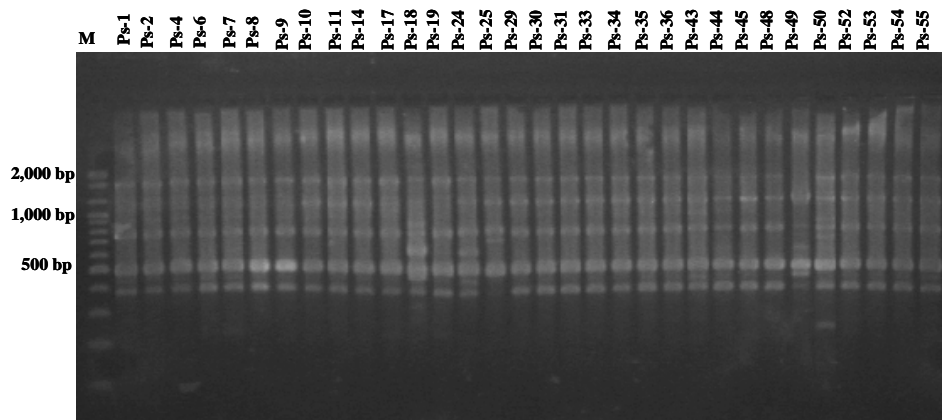


Figure 4. Random amplified polymorphic DNA of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates using M13 primers. Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

7. 균주간 유전적 유연성 분석

RAPD-PCR을 시행한 결과를 바탕으로 각각의 균주간의 유전적 유연관계를 알아보았다. Bio-Rad Fingerprinting™ II software version 3.0을 사용하여 관찰된 DNA band들의 유전자형 양상을 분석하였으며, UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

Imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*는 유사도 40% 이상의 수준에서 크게 6개의 군으로 분류가 가능하였으며(Figure 5), 각 군의 항생제 내성유형은 Table 5와 같이 분류되었다. AC2와 AC6 군은 시행한 모든 항생제에 내성을 나타내었으며, AC5 군은 ampicillin/sulbactam과 imipenem을 제외한 항생제에 모두 내성을 나타내었다. AC4군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem을 제외한 항생제에, AC3 군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem, tobramycin을 제외한 항생제에 내성을 나타내었다. AC1 군은 ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefepime, levofloxacin, tobramycin을 제외한 항생제에 내성을 나타내었다.

Imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa*는 유사도 50% 이상의 수준에서 크게 7개의 군으로 분류가 가능하였으며(Figure 6), 각 군의 항생제 내성유형은 Table 5와 같이 분류되었다. PS3 군이 가장 많은 항생제에 내성을 지니고 있었으며, PS1 군은 대부분의 항생제에 감수성을 보였다. PC7 군은 다른 군과 다르게 aztreonam에 내성을 지니고 있었으며, PS4, 5, 6군은 각 군간 두 개의 항생제에 차이를 보이며 유사한 양상을 보였다.

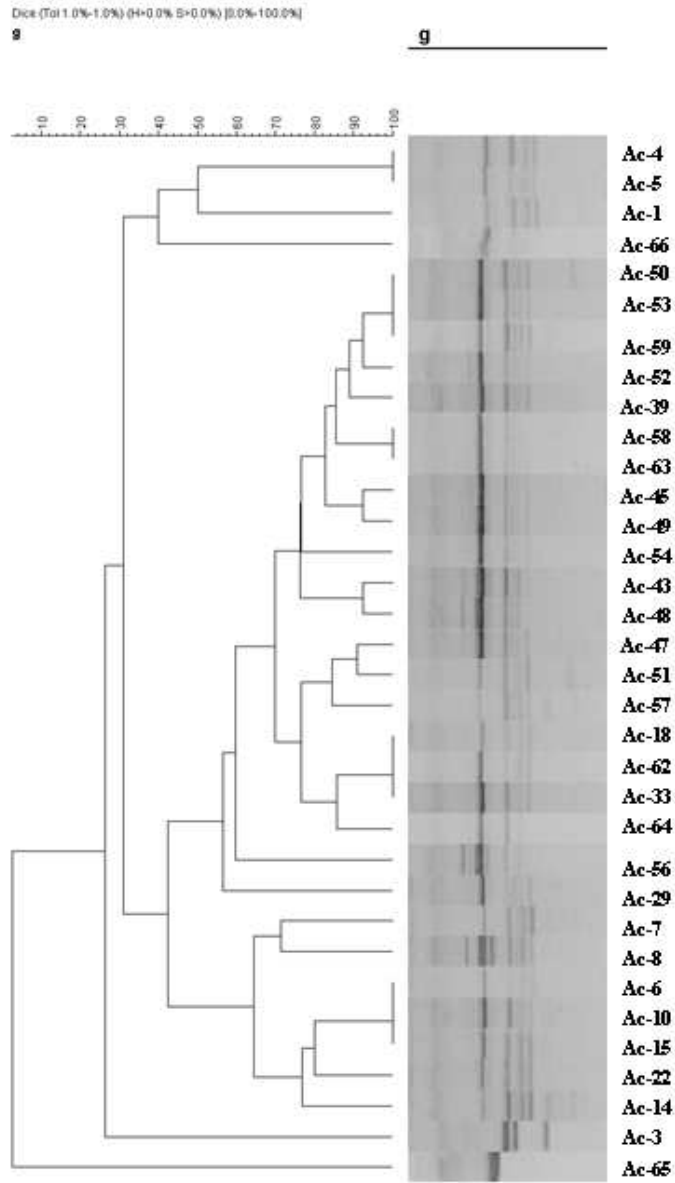


Figure 5. Dendrogram of the similarity index among isolates of *A. baumannii* by RAPD with RTG-2 primers.

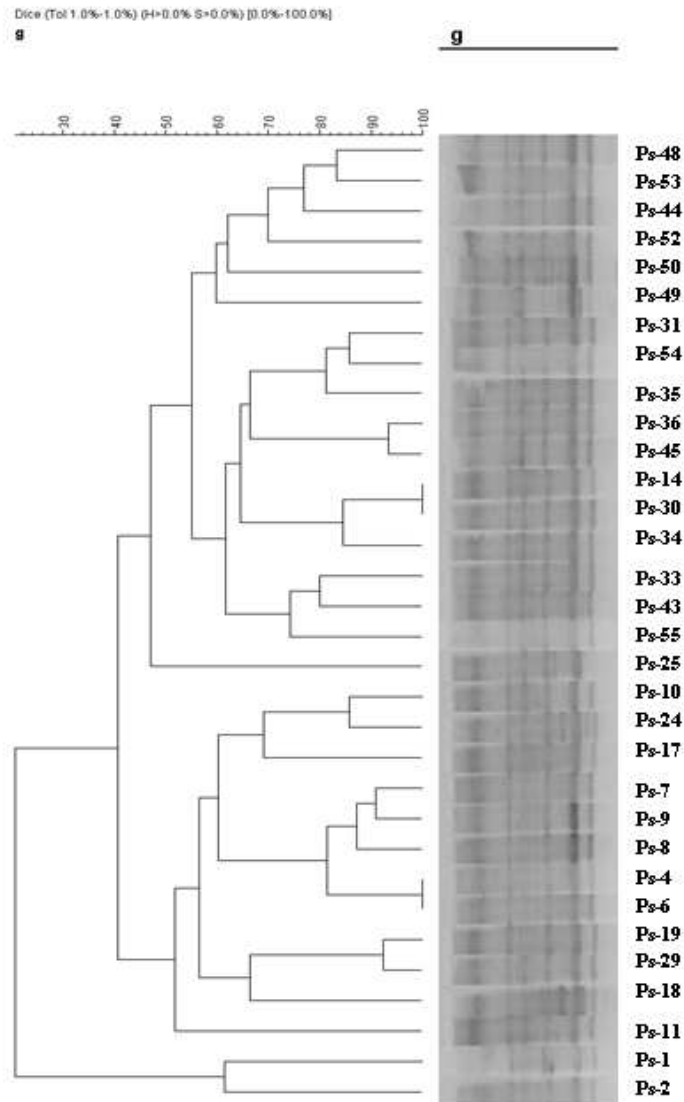


Figure 6. Dendrogram of the similarity index among isolates of *P. aeruginosa* by RAPD with M13 primers.

Table 5. Resistance patterns of imipenem–nonsusceptible isolates

Isolated bacteria	Group	Antimicrobial resistance
<i>A. baumannii</i>	AC1	AK, CAX, CAZ, CFT, CP, GM, MER, T/S, TIM
	AC2	A/S, AK, AZT, CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, IMP, LVX, MER, T/S, TIM, TO
	AC3	CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, LVX, MER, T/S, TIM
	AC4	CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, LVX, MER, T/S, TIM, TO
	AC5	AK, AZT, CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, LVX, MER, T/S, TIM, TO
	AC6	A/S, AK, AZT, CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, IMP, LVX, MER, T/S, TIM, TO
<i>P. aeruginosa</i>	PS1	CAX, CFT, CP, MER
	PS2	CAX, CAZ, CFT, CP, LVX, TIM
	PS3	AK, CAX, CAZ, CFT, CP, CPE, GM, IMP, MER, P/T, TIM, TO
	PS4	CAX, CAZ, CFT, CP, GM, LVX, TO
	PS5	CAX, CAZ, CFT, CP, GM, IMP, LVX, TIM, TO
	PS6	CAX, CAZ, CFT, CP, IMP, LVX, P/T, TIM
	PS7	AK, AZT, CAX, CAZ, CFT, CP, GM, LVX, MER, TIM, TO

Abbreviations. A/S: ampicillin/sulbactam, AK: amikacin, AZT: aztreonam, CAX: Ceftriaxone, CAZ: ceftazidime, CFT: cefotaxime, CP: ciprofloxacin, CPE: cefepime, GM: gentamicin, IMP: imipenem, LVX: levofloxacin, MER: meropenem, P/T: trimethoprim/sulfamethoxazole, T/S: piperacillin/tazobactam, TIM: ticarcillin/K clavulante, TO: tobramycin.

제 4 장 고 찰

*A. baumannii*와 *P. aeruginosa*는 원내 감염의 주요 원인균으로 현재 이들 균주에 가장 널리 쓰이는 치료제인 carbapenem 항생제에 내성인 균주가 점차 증가하고 있어 심각한 문제가 되고 있다. 이들 균주가 면역이 저하된 중증의 장기 입원 환자가 많은 병원에서 더 많이 분리되고, 또 이에 따라 carbapenem을 많이 사용하는 병원에서 carbapenem 항생제에 대한 내성률이 높을 것으로 생각된다. 그러나 현재 이에 대한 검출지침이 CLSI 권장에 포함되어 있지 않아 정확한 검출이 어렵고, 이런 다약제 내성균에 대한 치료시 감수성 약제의 제한으로 병원내 내성균 확산이 임상적으로 중요한 문제로 대두되고 있다. 이에 본 연구에서는 강원도의 한 대학병원에서 분리된 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 Amber Class B와 D의 carbapenemase 생성현황을 조사하고 유전형질을 분석하고자 하였다.

2007년 7월부터 2008년 4월까지 강원도 춘천시에 소재하고 있는 강원대학교병원 진단검사의학과 의 가검물에서 분리된 임상분리주 중 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa* 각각 34주와 32주를 대상으로 본 연구를 시행하였다. Microscan Walkaway 96 SI System으로 sputum, urine, wound 등의 검체에서 분리된 세균을 동정하고 항생제 내성 여부를 조사하였다. Carbapenemase 생성 균주를 선별하기 위해 modified Hodge test와 imipenem(IMP)-EDTA-SMA double-disk synergy test를 시행하였다. 이 결과를 바탕으로 국내에서 대표적으로 분리되는 carbapenemase 유전자인 *bla*_{IMP-1}-like, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like를 검출하기 위하여, 유전학적인 분석 방법인 PCR을 실시하여 이들 유전자를 확인하였다. 또한 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 내성 유형을 유전적으로 분석하기 위해서 PCR을 기반으로 한 fingerprinting 방법인 RAPD-PCR을 시행하여 유전형을 분석하였다.

본 연구에서 사용된 imipenem-nonsuceptible *A. baumannii*의 항생제 내성률은 carbapenem계인 imipenem과 meropenem의 경우 76.5%와 100.0%로 높았고 감수성인 균주는 없었으며, ampicillin/sulbactam을 제외하고 대부분의 항생제 90% 이상의 고도 내성을 보였다. 또한 기존의 연구에서 carbapenem 내성 균주가 aztreonam에 가수분해 활성이 적어 감수성을 지니는 것으로 보고되었으나(37), 본 연구에서는 각각 9.4% 0.0%의 낮은 감수성을 나타내었다. carbapenemase 생성 *A. baumannii*에 비교적 활성이 있는 것으로 보고되었던 sulbactam 또한 67.7%의 높은 내성률을 보였다(7). 이는 carbapenem 항생제에 내성을 보이는 포도당 비발효 그람음성 간균이 다른 계열 항생제에도 다제 내성을 보이기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 aztreonam 내성은 carbapenemase에 의한 것뿐만 아니라 porin mutation이나, 염색체성 AmpC chepholosporinase의 과생성과 다른 기전에 의한 것일 수 있다는 보고가 있다(26).

Imipenem-nonsuceptible *P. aeruginosa*의 항생제 내성률은 carbapenem계인 imipenem과 meropenem의 경우 81.2%와 78.1%로 높았으며, 감수성인 균주는 없었다. 또한 cephem계인 cefotaxime과 ceftazidime, quinolone계 항생제인 ciprofloxacin, levofloxacin, 그리고 aminoglycoside계 항생제인 gentamicin과 tobramycin 그리고 β -lactam계 항생제인 ticarcillin/K clavulanate 항생제에 각각 100.0%, 93.8%, 100.0%, 90.6%, 90.6%, 90.6%, 93.7%의 고도내성을 보였다.

Carbapenemase의 선별을 위한 modified-Hodge test는 carbapenemase 생성 그람음성간균을 선별하기 위한 검사법으로 metallo- β -lactamase 뿐만 아니라 class D OXA- β -lactamase도 이 시험에서 선별할 수 있다(22). IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test는 다른 β -lactamase와 달리 metallo- β -lactamase의 활성이 EDTA와 같은 metal chealator에 의해 억제되는 원리를 이용한 것으로 여기에 SMA를 첨가하여 비 특이적으로 억제반응을 증가시킨 것이다(19,22). *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주 모두 modified Hodge test에서 접종선 중앙 쪽 말단 부위가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되어 carbapenem 가수분해 양성으로 판독하였으며, IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test에는 *A. baumannii* 10주를 제외한 모든 균주에서 두 disk 사이에서 상승효과에 의한 억제

대의 확장현상이 관찰되어 MBL 생성 양성으로 판정하였다.

Carbapenemase 선별 시험을 바탕으로 본 연구에서는 국내 포도당 비발효 그람 음성 간균에서 보고된 IMP-1과, VIM, SIM-1 그리고 OXA-23-like cluster와 OXA-24-like cluster 유전자의 검출을 시도하였다. 총 34주의 *A. baumannii*중 10주에서 *bla*_{IMP-1}-like 유전자, 5주에서 *bla*_{VIM} 유전자, 20주에서 *bla*_{OXA-23}-like 유전자가 각각 검출되었다. 그리고 13주에서는 유전자가 검출되지 않았다. *A. baumannii*중 6주에서는 *bla*_{IMP-1}-like 유전자와 *bla*_{OXA-23}-like 유전자를 동시에 지니고 있었으며, 4주에서는 *bla*_{IMP-1}-like 유전자와 *bla*_{VIM} 유전자 그리고 *bla*_{OXA-23}-like 유전자를 동시에 지니고 있어 항생제 고도내성의 원인을 추측할 수 있었다. 총 32주의 *P. aeruginosa*중 31주에서 *bla*_{IMP-1}-like 유전자, 1주에서 *bla*_{VIM} 유전자가 각각 검출되었으며, 이 중 *bla*_{IMP-1}-like 유전자와 *bla*_{VIM} 유전자를 같이 지닌 균주가 1주 있었다. 그리고 1주에서는 유전자가 검출되지 않았다.

대표적인 metallo- β -lactamase인 IMP와 VIM은 약 30% 정도로 낮은 아미노산 동질성으로 보이지만, monobactam을 제외한 모든 β -lactam계 항생제에 내성을 나타내는 가수분해 성질이 유사하다고 알려져 있다(35). 일본에서는 *bla*_{IMP-1}을 생성하는 그람음성간균의 보고가 흔하나(13), 국내에서의 보고는 흔하지 않다. Oh(2003년) 등은 국내의 MBL 생성 *A. baumannii* 및 *P. aeruginosa*에서 VIM-2가 가장 흔하며, *A. baumannii*에서는 IMP-1이 발견되지 않았음을 보고하였다(29). 또한 Yong(2004년) 등의 보고에 의하면 MBL 생성 *P. aeruginosa*에서 *bla*_{VIM-2}-like 유전자와 *bla*_{IMP-1}-like 유전자가 각각 90%와 10%로 검출되었으며, *Acinetobacter* spp.에서도 *bla*_{VIM-2}-like 유전자와 *bla*_{IMP-1}-like 유전자가 각각 64%와 29% 검출되었음을 보고하였다(41). 그러나 본 연구에서는 *A. baumannii* 34주중 *bla*_{IMP-1}와 *bla*_{VIM} 유전자가 각각 10주와 5주, *P. aeruginosa* 32주 중 각각 31주와 1주가 검출되어 기존의 보고와 차이가 있었다. 이는 기존의 연구가 서울과 3차 병원에서 이루어진데 반해, 본 연구는 강원도의 춘천지역과 2차 병원에서 이루어져 지역적인 차이가 있는 것으로 사료된다. 또한 강원도의 춘천지역의 MBL 유전자중 *bla*_{IMP-1}이 이미 확산돼 있음에 반해 *bla*_{VIM}은 확산되는 초기임을 추측할 수 있었다. *bla*_{SIM-1}은 Lee(2005년) 등에 의해 국내의 *Acinetobacter* spp. 균종에서 분리된 바

있어 검출을 시도하였으나 두 균종 모두에서 검출되지 않았다(21).

OXA carbapenemase는 대부분이 그람음성균종 *A. baumannii*에서 확인되었음이 보고되었다(36). 본 연구에서도 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii* 34주중 20주, 즉 58.8%에서 OXA-23-like cluster 유전자를 검출하였으며, OXA-24-like cluster는 두 균종 모두에서 검출되지 않았다. Jeon(2005년) 등은 부산의 고신대학교병원에서 분리한 imipenem-resistant *A. baumannii* 52주중 36주(69.2%)에서 OXA-23 carbapenemase의 생성을 확인하였고 OXA-24 carbapenemase는 검출되지 않았음을 보고하여(15), 본 결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

Imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 각각 13주와 1주에서 carbapenemase 유전자가 검출되지 않았다. 이는 국내에서 대표적으로 보고된 carbapenemase 유전자에 대한 primer를 사용한 PCR로 검출되지 않아 다른 형의 carbapenemase 유전자에 의한 것일 수 있어 추가적인 연구가 필요하다. 또한 carbapenem 내성이 carbapenemase 생성 외에도 염색체성 AmpC enzyme의 mutational depression이나, OprD porin의 소실에 의한 세포외막의 impermeability의 증가, 그리고 세균의 세포막에 존재하는 efflux pump system의 과조절이 원인일수 있다는 보고가 있다(17,23,24). Jeong(2007년)에 의하면 efflux pump의 inhibitor인 reserpine이 존재하는 *A. baumannii* 균주가 그렇지 않은 균주보다 높은 carbapenem 내성률을 보였으며, outer membrane proteins(OMPs)가 소실된 균주에서 imipenem MIC가 높았음을 보고하였다(47).

Genomic DNA fingerprinting은 유전자 염기서열 분석법으로 얻을 수 없는 각 균주의 염색체상에 존재하는 미세한 유전자 차이를 구별할 수 있어 분별능이 뛰어나며, 실험의 재현성과 경제적인 측면에서도 많은 장점을 가지고 있다고 알려져 있다(30). 따라서 본 연구에서는 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 균주간의 유전자에서의 근연관계를 확인하기 위해서 RAPD-PCR을 시행하였다. RAPD-PCR은 짧은 random primer를 사용하여 균주마다 서로 다른 primer binding sequence 차이점을 이용하여, 낮은 온도에서 primer가 다른 위치에 붙어서 증폭된 DNA의 길이가 다름을 이용한 방법이다(43).

본 연구에서는 RAPD-PCR에서 서로 유사한 유형의 band를 형성하였으며, 40

~90%의 근연도를 갖는 다양한 양상이 나타났다. 또한 각각의 근연도를 기반으로 조사해본 결과 유사도를 기반으로 한 분류가 가능하였다.

Imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*는 유사도 40% 이상의 수준에서 크게 6개의 군으로 분류가 가능하였으며 각 군의 항생제 내성유형은 Table 5와 같이 분류되었다. 50% 이상의 수준에서 유사성을 보이는 AC1 군은 ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefepime, levofloxacin, tobramycin을 제외한 항생제에 내성을 나타내었고, 세 군주 모두 *bla*_{AMP-1}-like와 *bla*_{OXA-23}-like 유전자를 지니고 있었으며, AC2 군은 검사에 사용한 모든 항생제에 내성을 보였으며 carbapenemase gene은 검출되지 않았다. AC3 군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem, tobramycin을 제외한 항생제에 내성을 나타내었으며, *bla*_{OXA-23}-like 유전자를 지닌 군과 carbapenemase gene이 검출되지 않은 두 가지 유형이 섞여있었다. AC4군은 ampicillin/sulbactam과 amikacin, aztreonam, imipenem을 제외한 항생제에 내성을 나타내었으며, 일곱 군주 모두 *bla*_{OXA-23}-like 유전자가 검출되었다. 또한, AC5 군은 ampicillin/sulbactam과 imipenem을 제외한 항생제에 모두 내성을 나타내었고, *bla*_{AMP-1}-like와 *bla*_{VIM} 그리고 *bla*_{OXA-23}-like 유전자가 검출되었으며, AC6 군은 검사에 사용한 모든 항생제에 내성을 보였으며, *bla*_{VIM} 유전자만이 검출되었다. 이상의 결과에서 보면 AC2와 AC3 군에서 carbapenemase 유전자가 검출되지 않았지만, 모든 항생제에 내성을 보이는 군주가 13주였다. 이는 carbapenem 내성이 β -lactamase뿐만 아니라 다른 기전에 의해서도 유발될 수 있음을 증명한다. 또한 다른 유전형을 지닌 군주도 비슷한 항생제 내성 표현형을 가질 수 있으므로 분자유전학적인 검사가 필요함을 시사한다(27).

Imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa*는 유사도 50% 이상의 수준에서 크게 7개의 군으로 분류가 가능하였다. PS3 군이 가장 많은 항생제에 내성을 지니고 있었으며, PS1 군은 대부분의 항생제에 감수성을 보였다. PC7 군은 다른 군과 다르게 aztreonam에 내성을 지니고 있었으며, PS4, 5, 6군은 각 군간 두 개의 항생제에 차이를 보이며 유사한 양상을 보였다. 7개의 군 모두에서 *bla*_{AMP-1}-like 유전자가 검출되었으며, 각 군의 항생제 내성유형은 Table 5와 같이 분류되었다. *P. aeruginosa* 또한 *A. baumannii*와 같이 PS6 군에서 carbapenemase 유전자가 검출

되지 않았지만, 모든 항생제에 내성을 보이는 균주가 1주 있었다.

본 연구에서는 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 Microscan System을 통하여 측정된 최소발육억제농도와 중합효소 연쇄반응을 통하여 확인한 carbapenemase 유전자를 바탕으로 RAPD-PCR을 시행하여 균주간의 유사성으로 근연도 분석이 가능하였다. 또한 본 실험 결과는 강원도 춘천에서 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 한 carbapenemase 유전자의 첫 보고서로서, 이 지역에서 이들 균주의 항생제 내성 유형과 carbapenemase 유전자의 분포도를 알아볼 수 있는 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 carbapenemase 생성 균주는 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*에서 다약제내성을 일으켜 치료가 어렵고 높은 사망률로 이어지게 되므로 적절한 치료를 위하여 검출지침이 필요할 것으로 사료된다(36).

제 5 장 결 론

2007년 7월부터 2008년 4월까지 강원도 춘천시에 소재하고 있는 강원대학교병원 진단검사의학과에서 분리된 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii* 34주와 *P. aeruginosa* 32주를 대상으로 Microscan System과 modified Hodge test, IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test를 통하여 여러 항생제에 대한 최소 억제농도를 측정하고 carbapenemase 생성 균주를 선별하였다. 또한 중합효소연쇄 반응을 이용하여 국내에서 보고된 carbapenemase 유전자의 대표적인 유전형인 *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}를 검출하고자 하였다. *A. baumannii*에서는 *bla*_{OXA-23-like}가 20주로 가장 많이 검출되었으며, *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM}이 각각 10주, 5주 검출되었다. 반면 *P. aeruginosa*에서는 한 균주를 제외하고는 모든 균에서 *bla*_{IMP-1-like} 유전자가 검출되었으며, *bla*_{IMP-1-like} 유전자와 *bla*_{VIM} 유전자를 같이 지닌 균주도 한 주 있었다.

분자 역학적인 검사법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR을 시행하여 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*의 fingerprinting을 실시하였고, 이를 대상으로 dendrogram을 작성하여 균주들 간의 유사성으로 근연도를 분석하였다. 그 결과 *A. baumannii*는 6개의 군으로 나뉘어졌고, *P. aeruginosa*는 7개의 군으로 나누어졌다. 각각의 군들은 항생제 내성 유형과 carbapenemase 유전자와 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

본 실험 결과는 강원도 춘천에서 imipenem-nonsusceptible *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 한 carbapenemase 유전자의 첫 보고서로서, 이 지역에서 이들 균주의 항생제 내성 유형과 carbapenemase 유전자의 분포도를 알아볼 수 있는 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Afzal-Shah M, Woodford N, and Livermore DM (2001) : Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27 molecular class D β -lactamase associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 583-588.
2. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, and Ohta M (1995) : A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*, *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1612-1615.
3. Bou G, Oliver A, and Martinez-Beltran J (2000) : OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain, *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 1556-1561.
4. Brown S, and Amyes S (2006) : OXA(beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far, *J Antimicrob Chemother*, 57: 1-3.
5. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, and Walsh TR (2004) : Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 4654-4661.
6. Chastre J, and Trouillet JL. (2000) : Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*). *Semin Respir Infect*, 15: 287-298.
7. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN,

Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, and Woodford N (2003) : Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil, *J Clin Microbiol*, 41: 3403-3406.

8. Donal HM, Scaife W, Amyes SGB and Young H (2000) : Sequence analysis of ARI-1, A novel OXA- β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92, *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 196-199.

9. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, and Jarlier V (2008) : Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide, *Clin Microbiol Infect*, 14(Suppl. 1): 90-103.

10. Fluit AC, Visser MR, and Schmitz FJ (2001) : Molecular detection of antimicrobial resistance, *Clin Microbiol, Rev*, 14: 836-871.

11. Fluit AC, and Schmitz FJ (2004) : Resistance integrons and super-integrons, *Clin Microbiol Infect*, 10: 272-288.

12. Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P (2003) : Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 268-273.

13. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayama M, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihira S, and Kohno S (2003) : Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect*

Dis, 37: 26-32.

14. Jacoby GA, and Munoz-Price LS (2005) : The new β -lactamase, *N Engl J Med*, 352: 380-391.

15. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee KW, Young D, Lee JH, Song JS, and Lee SH (2005) : Investigation of a nosocomial outbreak imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*, 43: 2241-2245.

16. Kalpoe JS, Templeton KE, Horrevorts AM, Endtz HP, Kuijper EJ (2007) : Molecular Typing of a Suspected Cluster of *Nocardia farcinica* Infections by Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses. *J Clin Microbiol*, 45: 4048-4050

17. Kohler TM, Michea-Hamzehpour SFE, and Pechere JC (1999) : Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems, *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 424-427.

18. Lauretti L, Riccio ML, Amzzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, and Rossolini GM (1990) : Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate, *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1584-1590

19. Lee, K, Chong Y, Shim HB, Kim YA, Yong D, and Yum JH (2001) : Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, *Clin*

Microbiol Infect, 7: 88-91.

20. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, KIm JM, and Livermoer DM (2002) : *Bla*_{VIM-2} cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital, *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1053-1058.

21. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, KIm HD, Docquier JD, Rossolini GM, and Chong Y (2005) : Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea, *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 4485-4491.

22. Lee Y, Lim YS, Yong D, Yum JH, and Chong Y (2003) : Evaluation of the Hodge test and imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp, *J Clin Microbiol*, 41: 4623-4629.

23. Livermore DM (1995) : Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiolo Rev*, 8: 557-584.

24. Livermore DM, and Woodford N (2000) : Carbapenemase a problem in waiting?, *Curr Opin Microbiol*, 3: 489-495.

25. Livermore DM (2002) : The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Cur. Opin Investig. Drugs*, 3: 218-224.

26. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, and Quinn JP (2005) : First

nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo- β -lactamase (VIM-2) in the United States, *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3538-3540.

27. Mathai E, Kaufmann ME, Richard VS, John G, and Brahmadathan KN (2001) : Typing of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired respiratory infections in a tertiary care centre in southern India, *J Hosp Infect*, 47: 159-162.

28. Nass T, and Nordmann P (1999) : OXA-type β -lactamases, *Curr Pharm Des*, 5: 865-879.

29. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, and Kim BK (2003) : Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase, *J microbiol Meth*, 54: 411-418.

30. Olive DM and Bean P (1999): Minireview: Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism. *J Clin Microbiol*, 37: 1661-1669.

31. Paton R, Miles RS, Hood J, and et al (1993) : β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Int J Antimicrob Agents*, 2: 81-88.

32. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, and Bonomo RA (2007) : Global Challenger of Multidrug-Rsistant *Acinetobacter baumannii*.

Antimicrob Agents Chemother, 51: 3471-3484

33. Poirel L, Nass T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, and Nordmann P (2000) : Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and intergron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 891-897.

34. Poirel L, Lambert T, Tuerkoglue E, Ronco E, Gaillard JL, and Nordmann P (2001) : Characterization of class 1 integron from *Psuedomonas aeruginosa* the contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and two novel aminoglycoside resistance gene cassettes, *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 546-552.

35. Poirel L, and Nordmann P (2002) : Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support, *Curr Phram Biotechnol*, 3: 117-127.

36. Queenan AM, and Bush K (2007) : Carbapenemase: the versatile β -lactamase, *Clin Microbiol Rev*, 20: 440-458.

37. Rasmussen B, and Bush K (1997) : Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 223-232.

38. Takahashi A, Yomoda S, Kovayashi I, Okubo T, Tsunoda M, and Iyobe S (2000) : Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital, *J clin Microbiol*, 38: 526-529.

39. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones

RN, and Walsh RT (2002) : Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial programme, *J Antimicrob Chemother*, 50: 673-679.

40. Yong D, Shin SH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Cheong Y, And Buernfeind A (2003) : High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 1749-1751.

41. Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, Lee K, Chong Y (2006) : Increasing Prevalence and Diversity of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea, *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1884-1886.

42. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, and Chong Y (2002) : Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two novel integrons carrying *bla*_{VIM-2} gene cassettes, *J Antimicrob Chemother*, 49: 837-840.

43. Wang G, Whittam TS, Berg CM and Berg DE (1993) : RAPD(arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains, *Nucleic Acids Res*, 21: 5930-5933.

44. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, and Nordmann P (2005) : Metallo-beta lactamases: the quiet before storm?, *Clin Microbiol Rev*, 18: 306-325.

45. Walsh TR (2005) : The emergence and implications of

metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol Infect*, 11ISuppl. 6: 2-9.

46. Walther-Rasmussen J, and Hoiby N (2006) : OXA-type carbapenemases, *J Antimicrob Chemother*, 57: 373-383.

47. Jeong HW (2007) : The patterns and mechanisms of carbapenem resistance in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Thesis for the degree of doctor of philosophy.

Abstract

Patterns of antimicrobial resistance and genotyping of carbapenemase-producing imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*

Lee, Jin Hee

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

A. baumannii and *P. aeruginosa* are important nosocomial pathogens. Their resistances to carbapenem are increasing and causing concerns in Korea. An increasing prevalence of carbapenem resistance mediated by acquired carbapenemase is being reported.

Over a 10 month-period from July 2007 to April 2008, 66 strains of imipenem-nonsusceptible *A. baumannii* and *P. aeruginosa* (34 *A. baumannii* and 32 *P. aeruginosa*) were isolated from Kang-won National University Hospital. To determine the prevalence and genotypes of the carbapenemase-producing clinical isolates, antibiotic susceptibility was determined by Microscan Walkaway 96 SI System and carbapenem activity was detected by the modified Hodge test and the imipenem-EDTA-SMA double-disk synergy test. Metallo- β -lactamase gene and OXA-type β -lactamase gene reported in Korea were detected by PCR.

The result of PCR, 20(59%) isolates of *A. baumannii* with *bla*_{OXA-23}-like,

10(29%) isolates with *bla*_{IMP-1}-like and 5(15%) isolates with *bla*_{VIM} were identified. Thirty one(97%) isolates of *P. aeruginosa* were found to have *bla*_{IMP-1}-like and 1(3%) isolates were found to have *bla*_{VIM}. The prevalence of both *bla*_{IMP-1}-like and *bla*_{VIM} were different from previous reports in the other region of Korea(High prevalence of *bla*_{VIM} has been reported.). No clinical isolates were found to have *bla*_{SIM-1} and *bla*_{OXA-24}-like.

Random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR and dendrogram for genetical similarity to band patterns of each clinical isolates were examined. *A. baumannii* were grouped into 6 clusters up to 40% of similarity index. The group of AC2, AC6 were all-resistant to any antibiotics and AC5 was resistant except for ampicillin/sulbactam & imipenem. The AC4 was also except for ampicillin/sulbactam, amikacin, aztreonam & imipenem. AC3 except for ampicillin/sulbactam, amikacin, aztreonam , imipenem & tobramycin, AC1 except for ampicillin/sulbactam, aztreonam , cefepime, levofloxacin & tobramycin. *P. aeruginosa* were grouped into 7 clusters up to 50% of similarity index. In *P. aeruginosa* group, PS3 was resistant for the most antibiotics, PS1 was susceptible for the most antibiotics. PS7 was resistant to aztreonam unlike another group. PS4, PS5, and PS6 were alike in antibiotic resistance having a difference of two antibiotics among them.

To my knowledge, this is the first report of prevalence of carbapenemase in Chuncheon. Imipenem non-susceptible *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were characterized with the results from antimicrobial resistance pattern and genetical similarity using RAPD-PCR.

Key words : *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Carbapenemase, *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{IMP-1}-like, *bla*_{VIM}, RAPD-PCR