

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 분석에 의한 *Acinetobacter Baumannii* 균주의 유전형 분류

서남대학교 의과대학 미생물학교실
오재영 · 조재위 · 박종천 · 이제철*

=Abstract=

Molecular Typing of *Acinetobacter Baumannii* Strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Jae-Young Oh, Jae-Wee Cho, Jong-Chun Park and Je-Chul Lee*

Department of Microbiology, Seonam University College of Medicine, Namwon, Korea

Acinetobacter baumannii strains are emerging pathogens of the nosocomial infection with an increasing frequency in recent years. The therapeutic difficulty due to the wide spread of multiple resistant strains was major problem in *A. baumannii* infection. It seems likely that high frequency of *A. baumannii* infection will be increasing epidemiological importance in the future. However, the current limited understanding of the epidemiology of *A. baumannii* infections is caused by lack of a rapid and practical method for the molecular characterization of *A. baumannii* strains.

This study was undertaken to determine molecular types and genetic similarity among *A. baumannii* strains isolated from four hospitals by RAPD analysis. Eighty-five strains, including 40 from Chunnam University Hospital, 27 from Dankook University Hospital, 15 from Yonsei University Hospital, and 3 from Seonam University Hospital, were classified into three molecular types. Molecular type II was the most common pattern and included 72 strains. All strains from Dankook University Hospital and 40 strains from Chunnam University Hospital belonged to molecular type I or II. *A. baumannii* strains from Yonsei University Hospital were very distant similarity values. The range of genetic similarity values among 85 strains of *A. baumannii* was 0.26 to 1.00. Although phenotypes including biotype and antimicrobial resistance pattern of *A. baumannii* strains were same or very similar to each other, their RAPD patterns were quite different. Typing with phenotypes was found to be less reliable than molecular typing by RAPD analysis.

These results suggest that RAPD analysis provides rapid and simple typing method of *A. baumannii* strains for epidemiological studies. This work is the first epidemiological report of *A. baumannii* infections in Korea and it is hoped that results of this work may contribute to a better understanding of the clinical importance and epidemiology of *A. baumannii* strains.

Key Words: *A. baumannii*, Nosocomial infection, Epidemiology, Genetic similarity, RAPD analysis

접수 : 2000년 4월 10일, 게재결정 : 2000년 6월 9일

* 책임저자: 이제철, 590-711, 전북 남원시 광치동 720번지, 서남대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 0671) 620-0341, Fax: 0671) 620-0345, e-mail: lcejc@tiger.seonam.ac.kr

본 연구는 1998년 한국과학재단 국산연구기기 활용지원사업에 의하여 수행되었음.

서 론

Acinetobacter 균은 그람음성 비발효성 세균으로 대형병원을 중심으로 90년대 이후 분리빈도가 급격히 증가하고 있는 원내감염의 주요 원인균이다. 이 균은 호흡기 감염환자에서 가장 많이 분리되며, 면역체계가 저하된 환자에서는 치명적인 감염을 유발하기도 한다³⁾. *Acinetobacter* 균 감염의 임상적 문제점은 *Acinetobacter* 균들이 환자나 건강인의 피부와 점막에 정상세균총으로 존재하고 병원환경에서도 널리 분포하고 있으므로 감염균의 분리와 동정에 주의가 요구되며, 국내에서 분리되는 대부분의 *Acinetobacter* 균들은 현재 임상에서 사용되고 있는 항균제에 다약제 중복내성을 나타내어 감염치료에 사용할 뚜렷한 약제가 없는 것이다. 외국의 경우 *Acinetobacter* 감염의 치료제로 사용하고 있는 광범위 penicillin, aminoglycoside, 광범위 cephalosporin 및 quinolone 등의 약제에 대부분의 분리균주가 내성을 가지고 있음이 보고되었고, 1986년부터는 imipenem (Ip)에 대한 내성균주가 출현해 현재는 *Acinetobacter* 균에 항균효과를 가지는 것으로 알려진 모든 약제에 내성을 가지는 균주의 빈도가 증가하고 있다^{5,19,20)}.

Acinetobacter 균 감염의 대부분을 차지하는 *A. baumannii* 균종은 다른 *Acinetobacter* 균종에 비해 많은 종류의 항균제에 내성을 나타내고 원내감염의 유행을 일으키는 경우가 많으므로 정확한 균종 동정이 필수적이다. *A. baumannii* 균 감염은 의료진의 손이나 오염된 의료장비 등에 의해서 다른 환자에게 전파되어 유행하게 되며, 유행균주는 산발 감염균보다 더욱 더 많은 종류의 항균제에 내성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있으므로 유행균주 식별과 항균제 내성양상 조사는 중요한 의미를 가진다³⁾. 또한 병원별 또는 지역별로 감염환자에서 분리된 *A. baumannii* 균을 역학적으로 분류하여 유행균주의 식별과 확산 정도를 파악하고 항균제 내성 정도를 조사하는 것은 유행균주의 확산 방지를 위한 전과경로 차단과 환자치료에 필수적이다.

Acinetobacter 균의 역학조사를 위한 방법으로는 생물형, 항균제 내성형, 혈청형 및 세포막 단백질 등의 표현형에 의한 방법이 많이 보고되고 있으나^{1,3,4,16)}, 이들 표현형에 의한 분류법은 *Acinetobacter* 균속을 19개의 유전자종 (genospecies, geno-

mic species)으로 분류하는 최근의 분류법과 일치하지 않고, 균주간의 변별력이 낮으며, 균의 표현형이 항상 일정하게 발현되지 않아 재현성과 신뢰성이 낮은 단점을 가지고 있다. 특히 분리균주의 대부분을 차지하는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 유전자종 1 (*A. calcoaceticus*), 유전자종 2 (*A. baumannii*), 유전자종 3 및 유전자종 13TU (Tjernberg와 Ursing) 균들은 균종간에 유전학적 유사성이 높고 표현형이 동일한 경우가 많아서 표현형에 의한 균주분류는 불가능하므로 분자유전학적 특성을 기초로 하는 유전형 (genotype) 분류방법이 필요하다.

Acinetobacter 균의 유전형 분류를 위해서는 plasmid profile, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 및 ribotyping 등의 방법들이 소개되고 있으나, 이들 방법은 임상실험실에서 시행하기가 어렵고 많은 비용이 소요되는 단점을 가지고 있다^{6,8,13,15,17,22)}. 1990년대 초에 소개된 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석은 세균 뿐만 아니라 진핵생물의 유전형 구별에도 사용되는 기법으로 유전자 지도, 개체의 다양성, 군집분석, 계통 발생학적 분석 및 역학조사에 이르기까지 다양하게 이용되고 있다^{10,12,14)}. RAPD 분석은 10 mer의 비특이 염기 서열로 구성된 primer를 낮은 온도에서 주형 DNA에 결합시켜 균이 가진 DNA를 증폭하여 개체에 따라 다르게 증폭된 DNA를 전기영동한 후, DNA band 양상을 비교 분석하는 방법이다. RAPD 분석 방법은 실험이 간단하고 다른 유전형 분류방법들에 비해 비용이 적게 들며 빠른 시간내에 결과를 알 수 있는 장점이 있으나 실험의 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

본 연구는 지역적으로 떨어진 병원에서 분리된 *A. baumannii* 균주를 대상으로 표현형과 유전형의 특성을 비교하여 분리균주의 다양성을 조사하고 국내에서 분리되는 *A. baumannii* 균주의 역학조사를 위한 RAPD 분석의 유용성을 알아보았다.

재료 및 방법

균 주

실험에 사용한 *A. baumannii* 균주는 전남대학교 병원에서 분리한 40주, 단국대학교 병원에서 분리한 27주, 연세대학교 병원에서 분리한 15주 및 서남대학교 병원에서 분리한 3주 등 총 85주를 사용하였다. Amplified ribosomal DNA restriction

analysis (ARDRA) 방법에 의하여 *A. baumannii* 균종을 동정하였다²¹⁾.

생물형의 결정

API20NE kit (bioMerieux sa, France)를 사용하여 균을 동정함과 동시에 각종 반응을 숫자화한 code profile index를 이용하여 생물형을 결정하였다.

항균제 내성검사

항균제는 ampicillin (Ap), carbenicillin (Cb), piperacillin (Pi), ticacillin (Ti), cefocitin (Cx), ceftazidime (Cd), cefotaxime (Ct), aztreonam (Az), amikacin (Ak), kanamycin (Km), streptomycin (Sm), gentamicin (Gm), tobramycin (Tb), ciprofloxacin (Ci), norfloxacin (Nf), chloramphenicol (Cm), sulfisoxazole (Su), trimethoprim (Tp) 및 Ip의 19종을 사용하였으며, 항균제 감수성 검사는 Mueller-Hinton agar (Difco)를 사용한 한천평판 희석법에 의하여 검사하였다. 검사방법과 내성균의 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards의 기준에 따랐다¹¹⁾.

Genomic DNA의 분리

4 ml의 trypticase soy broth (Difco)에 균을 접종하여 30℃에서 20시간 진탕 배양한 배양액 1.5 ml를 원심분리하여 세포침사를 얻었다. 세포침사를 567 µl의 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시키고 30 µl의 10% sodium dodecyl sulfate와 3 µl의 proteinase K (20 mg/ml)를 넣어 37℃ 수조에서 1시간 배양하여 균체를 완전히 용해시켰다. 용해액에 100 µl의 5 M NaCl을 첨가하고 80 µl의 CTAB/NaCl 용액 (0.7 M NaCl 용액에 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide)을 넣어 65℃에서 10분간 반응시킨 후 0.8 ml의 chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1)로 핵산을 추출하였다. 위의 과정을 3~5회 반복하고 핵산을 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)로 추출하여 동량의 iso-propanol로 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 뒤 TE buffer에 녹인 다음 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

ERIC-PCR

목표 DNA를 증폭하기 위하여 추출한 염색체 DNA 1 µl 또는 3~4개의 집락을 10분간 끓인 부유액 5 µl를 1 U의 *Taq* polymerase (TaKaRa), 250 µM dNTP, 1.0 µM primer, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM

Table 1. Oligonucleotide sequences for RAPD analysis

Primer designation	DNA sequence
OPA-1	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-2	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-3	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-4	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-5	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-6	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA-7	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-8	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-9	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'

Tris (pH 8.3), 50 mM KCl로 조성된 PCR 반응액에 넣어 최종 20 µl로 만들어 증폭하였다. 5'-GTGA-ATCCCCAGGAGCTTACAT-3'의 ERIC-1 primer를 (주) 바이오니아에서 합성하여 사용하였다. PCR은 94℃에서 2분간 반응시켜 DNA를 변성시키고 94℃에서 1분, 25℃에서 1분, 72℃에서 2분간 45회를 실시하였다.

RAPD 분석

RAPD 분석은 Ready-To-Go-RAPD Analysis Beads (Pharmacia Biotech)를 사용하였다. *AmpliTaq* DNA polymerase와 Stoffel fragment, dNTP, bovine serum albumin, 3 mM MgCl₂, 30 mM KCl 및 10 mM Tris (pH 8.3)가 함유되어 있는 반응액에 25 pmol의 10 mer primer와 10 ng의 추출한 염색체 DNA 또는 세균을 끓여서 얻은 상층액 5 µl를 첨가하여 최종 25 µl가 되게 하여 반응시켰다. 사용한 primer (Operon technologies)는 모두 10종으로 염기서열은 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 DNA를 변성시키고 95℃에서 1분, 36℃에서 1분, 72℃에서 2분간 45회 반응을 실시하였다⁷⁾.

전기영동상의 자료 분석

ERIC-PCR과 RAPD 분석으로 얻은 DNA 증폭산물 5 µl를 3% agarose gel에서 전기영동하여 비교 분석하였다. 전기영동상의 분석은 유전자 이미지 분석장치 (Imager™, 바이오니아)를 이용하여 이동

거리에 따른 각 band의 분자량을 측정하고 균주별 band의 수와 분자량에 따라서 유사도 (similarity value)를 계산하였다. 유사도를 나타내는 dendrogram은 NTSYS-pc program (numerical taxonomy system and multivariate analysis system, version 1.50, Applied Biostatistics)을 이용하였다. 균주의 유사도는 다음의 공식에 따라 distance value (D)를 얻은 다음 측정하였으며, D의 범위는 0에서 1로 0은 균주간 band의 수와 분자량이 동일함을 의미한다.

$$D = 1 - 2Cxy / (Ux + Uy + 2Cxy)$$

Cxy: X와 Y 균주에서 동일한 band의 숫자
 Ux: X 균주에서만 볼 수 있는 band의 숫자
 Uy: Y 균주에서만 볼 수 있는 band의 숫자

결 과

생물형에 의한 분류

ARDRA 방법으로 *A. baumannii* 균종으로 동정된 85주의 API20NE에 의한 생물형은 모두 16개로 나타났으며, 4개의 생물형은 *A. baumannii* 균종이 아닌 다른 균종이었다 (Table 2). 4041473의 code를 가진 균주가 전남대학교 병원에서 31주, 연세대학교 병원에서 9주 및 단국대학교 병원에서 1주 분리되어 41주로 가장 많았다. 연세대학교 병원 분리주 15주 중 9주 (60%)와 단국대학교 병원 분리주 27주 중 15주 (55.6%) 및 전남대학교 병원에서 분리한 43주 중 31주 (72.1%)는 분리된 병원에 따라 동일한 생물형으로 나타나 특정 생물형을 가진 균주가 병원에 따라 많이 분리되었다.

항균제 내성양상

19종의 항균제를 사용하여 항균제 감수성 검사를 실시한 결과 모든 균주가 한가지 이상의 항균제에 내성을 가지고 있었다 (Table 3). Ip의 MIC는 0.5 µg/ml 이하에서부터 4 µg/ml까지 나타나 Ip에 대한 내성균주는 없었다. Quinolone 제제에는 60주가 내성을 나타내어 70.6%의 높은 내성율을 나타내었다. 내성형은 Ap 하나의 항균제 내성부터 18종의 항균제에 중복내성을 나타내는 것까지 모두 31가지의 다양한 내성형을 나타내었고 내성양상은 분리지역에 따라서 차이가 있었다. ApCbPi-TiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfCmSu 내성형의 전남대학교 병원 분리주 9주와 연세대학교 병원 분리주 7주는 생물형이 4041473으로 동일하여 분리병

Table 2. Biotypes of *A. baumannii* strains by API 20NE code profiles

Biotype	No. of strains				Total (%)
	Yon-sei	Dan-kook	Chun-nam	Seo-nam	
0001073		1		1	2 (2.4)
0040053		1			1 (1.2)
0041073		15		1	16 (18.8)
0041473		4	1		5 (5.9)
1041473*		1			1 (1.2)
4001071	1				1 (1.2)
4001073		1	2		3 (3.5)
4001473			1		1 (1.2)
4041051	2				2 (2.4)
4041073		3	1	1	5 (5.9)
4041453	2				2 (2.4)
4041471	1				1 (1.2)
4041473	9	1	31		41 (48.2)
4141473*			1		1 (1.2)
4241473*			2		2 (2.4)
5041473*			1		1 (1.2)
Total	15	27	40	3	85 (100)

*According to the API20NE profile index, these strains were not identified as genus *Acinetobacter*, but confirmed to *A. baumannii* species by ARDRA.

원은 다르지만 생물형과 항균제 내성양상이 동일하였다.

RAPD 분석의 표준화

A. baumannii 균주의 유전형을 분류하기 위해 먼저 RAPD 분석을 표준화하였다. 제품화된 Ready-To-Go-RAPD Analysis Beads를 사용하여 PCR 반응에서 올 수 있는 오차를 줄였고, 10종의 primer를 사용하여 최적의 결과를 얻을 수 있는 primer를 선정하였다. 10종의 primer를 사용한 PCR에서 모두 증폭된 DNA band를 얻을 수 있었다. OPA-4 primer를 사용한 결과에서 분자량이 300 bp에서 3 kb까지의 band가 4개에서 8개까지 고루 분포하였고 균주간의 변별력에서도 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1). OPA-4 primer를 제외한 9종의 primer를 사용한 PCR에서는 증폭된 DNA band

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *A. baumannii* strains

Type	Resistant pattern*	Ip MIC	No. of strains
A	ApCbPiTiCxCdCtAzAkKmSmGmTbCiNfCmSuTp	4	1
	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfCmSuTp	4	21
	ApCbTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfCmSuTp	1	1
	ApCbPiTiCxCtAzKmSmGmTbCiNfCmSuTp	4	2
B	ApPiCxCtAzAkKmSmGmTbCiNfCmTp	4	3
	ApPiCxCtAkKmSmGmTbCiNfCmSuTp	2	1
	ApPiCxCdCtAzAkKmSmGmTbCiNfTp	4	1
	ApPiCxCtKmSmGmTbCiNfCmSuTp	4	1
	ApPiCxCdCtKmSmGmTbCiNfSuTp	2	3
C	ApCbPiTiCxCdCtAzAkKmSmGmTbCiNfCmSu	4	1
	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfCmSu	4	16
D	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCmSuTp	4	3
	ApCbPiTiCxCdCtAzAkKmSmGmTbCmSu	4	8
	ApCbPiTiCxCdCtAzAkKmSmGmTbSu	4	1
	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCmSu	1	2
E	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfCm	4	1
	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNfSu	4	1
	ApCbPiTiCxCdCtAzKmSmGmTbCiNf	4	3
F	ApPiCxCtAzAkKmSmGmTbCmTp	2	2
	ApCbPiTiCxAkKmSmGmTbCmTp	4	1
	ApCbPiTiCxCtAkKmSmGmTbCm	4	1
G	ApPiCxCdCtKmSmGmTbCiNfTp	4	1
	ApPiCxCtKmSmGmTbCiNfSuTp	1	1
	ApCxCdCtKmSmGmTbCiNfTp	2	1
	ApPiCxAzKmSmGmCiNfCmSu	2	1
H	ApPiCxCtAzAkKmSmGmTbTp	2	1
	ApCxAzAkKmSmGmTbTp	4	1
I	ApCxSmCm	1	1
J	ApCbPiCd	< 0.5	1
	ApCx	1	1
	Ap	1	2

*Abbreviations; See the materials and methods.

가 2개에서 5개까지 나와 균주간의 변별력이 떨어지거나, 증폭된 DNA band의 수가 8개 이상되어 band가 너무 조밀하게 나타나 분석에서의 오차

가 많이 발생하였다 (Fig. 2B, 2C). ERIC-PCR에서는 대부분의 균주에서 진하게 염색되는 band가 1~2개 나타나고 희미하게 염색되는 band가 없거

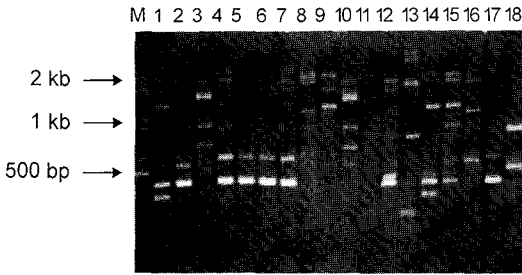


Figure 1. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of *A. baumannii* strains by using OPA-4 primer. Lanes: 1 to 3, molecular type I; 4 to 9, molecular type IIa; 10 and 11, molecular type IIb; 12 and 13, molecular type IIc; 14 and 15, molecular type IId; 16 to 18, molecular type III; M, 100 bp DNA ladder.

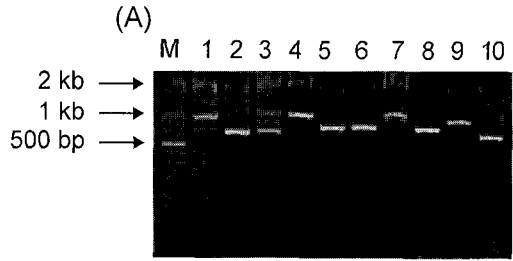
나 최고 3개까지 나타났다 (Fig. 2A). 진하게 염색되는 band의 분자량은 500 bp에서 1 kb까지 균주마다 조금씩 다르게 나타나지만 희미하게 나타나는 band의 분자량 측정이 힘들고 전체적인 band의 수가 적어 균주간의 변별력은 낮았다.

A. baumannii 균주의 RAPD 분석

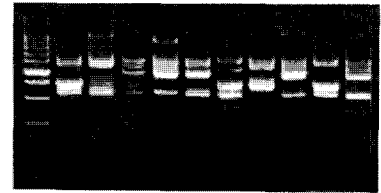
85주의 균주는 OPA-4 primer를 사용한 결과에 따라 distance value 0.74에서 3개의 군으로 나눌 수 있었으며, II 군은 다시 4개의 소그룹 (IIa-IId)으로 나누었다 (Fig. 3). I 군이 7주 (8.2%), II 군이 72주 (84.7%), III 군이 6주 (7.1%)로 II 군에 속하는 균주가 가장 많았다. II 군에서는 전남대학교 병원 분리주 34주와 단국대학교 병원 분리주 8주 및 7주의 연세대학교 병원 분리주가 속하는 IIa 군이 49주 (57.6%)로 가장 많았고, IIb 군에 속하는 15주 (17.6%)는 모두 단국대학교 병원에서 분리한 균주로 나타났다. 전남대학교 병원 분리주 40주는 I 군이 5주, IIa 군이 34주, III 군이 1주로 3개의 군에 분포하였고, 단국대학교 병원 분리주 27주는 I 군에 2주, IIa 군에 8주, IIb 군에 15주, IIc 군에 2주가 분포하였다. 연세대학교 병원 분리주 15주는 IIa 군에 7주, IIc 군에 1주, IId 군에 1주, III 군에 2주가 분포하여 균주간의 유사도는 다른 병원에서 분리한 균주들보다 낮았다. 서남대학교 병원 분리주 3주는 RAPD 양상이 모두 동일한 III 군에 속하였다.

표현형과 RAPD 분석의 비교

4041473의 생물형을 가지는 41주의 균주는 RA-



(A)



(B)

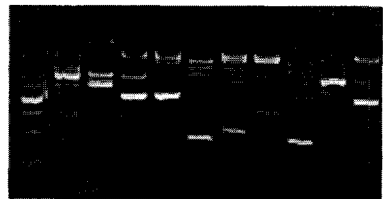


Figure 2. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of *A. baumannii* strains by using primer ERIC-1 (A), OPA-3 (B), and OPA-9 (C). Lanes: 1 and 2, molecular type I; 3 to 6, molecular type IIa; 7, molecular type IIb; 8, molecular type IIc; 9, molecular type IId; 10, molecular type III; M, 100 bp DNA ladder.

PD 분석에서 I 군에 5주, IIa 군에 34주, IId 군에 1주, III 군에 1주가 분포하였고, 생물형 0041073의 16주는 I 군에 1주, IIa 군에 4주, IIb 군에 10주, III 군에 1주가 분포하였다 (Table 4). 이러한 결과는 같은 병원에서 분리된 동일한 표현형을 가진 균주는 RAPD 분석에서 대부분 같은 군으로 분류되지만 표현형이 동일하더라도 분리병원이 다른 균주들은 RAPD 분석에서 다른 군으로 분류되었다. 같은 병원에서 분리된 균주는 항균제 내성형이 동일한 경우 RAPD 분석에서 유사도가 높았으나, 분리병원이 다른 균주는 내성형이 동일하더라도 유사도는 낮게 나타났다. 항균제 내성양상이 A형이고 생물형이 4041473으로 나타난 전남대학교 병원 분리주 9주와 연세대학교 병원 분리주 7주는 RAPD 분석에서도 IIa 군에 속하여 분

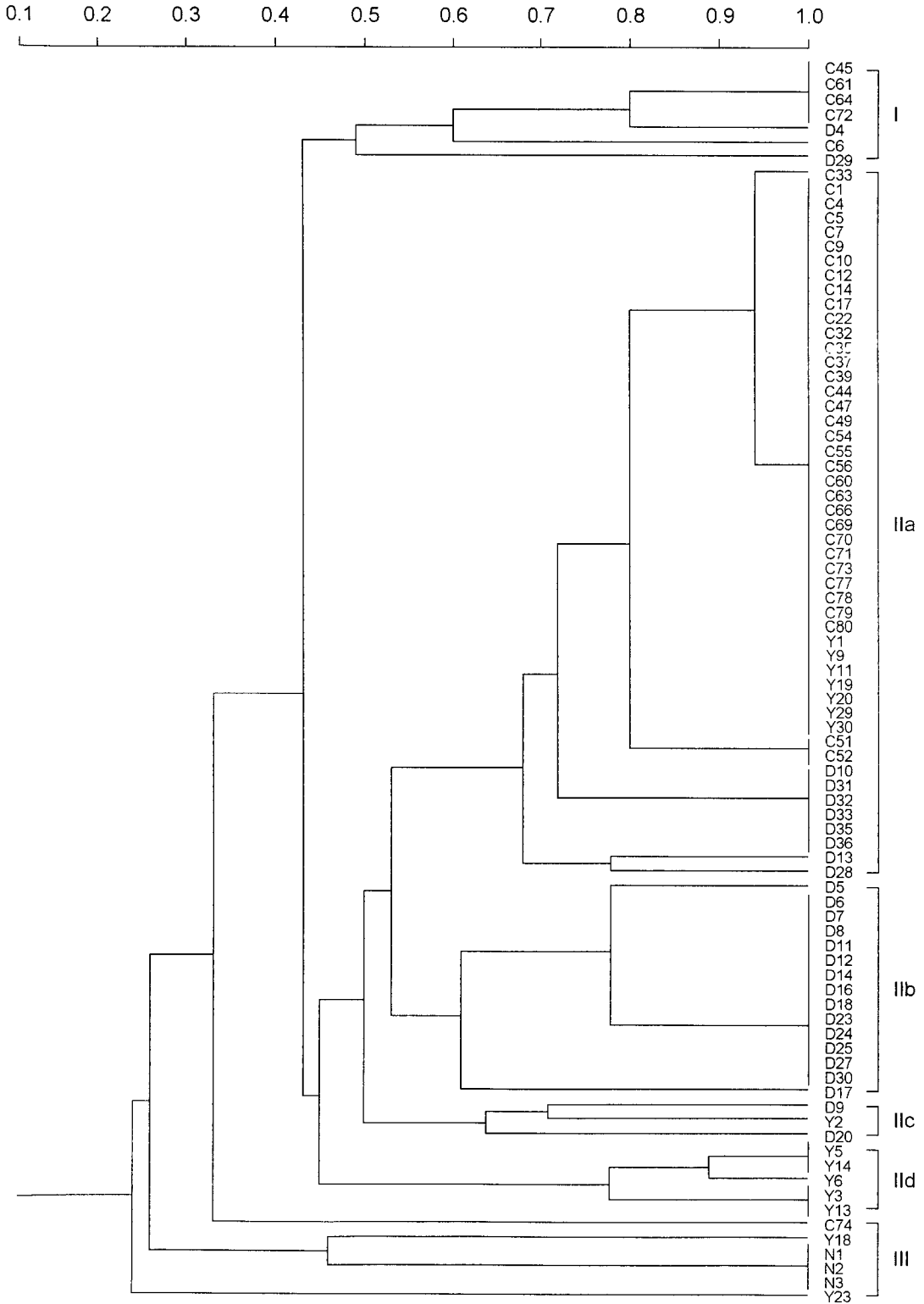


Figure 3. Dendrogram showing the cluster analysis results for 85 strains of *A. baumannii* by using RAPD analysis with primer OPA-4.

Table 4. Comparison of RAPD types and biotype results for *A. baumannii* strains

Biotype	Molecular type						Total
	I	IIa	IIb	IIc	IId	III	
0001073		1				1	2
0040053				1			1
0041073	1	4	10			1	16
0041473		1	4				5
1041473*			1				1
4001071					1		1
4001073		2				1	3
4001473		1					1
4041051					2		2
4041073	1	2		1		1	5
4041453					2		2
4041471				1			1
4041473	5	34			1	1	41
4141473*		1					1
4241473*		2					2
5041473*		1					1
Total	7	49	15	3	5	6	85

*According to the API20NE profile index, these strains were not identified as genus *Acinetobacter*, but confirmed to *A. baumannii* by ARDRA.

리병원은 다르지만 모든 역학조사 방법에서 동일한 결과로 나타나 16주의 균주는 동일 유래 균주임을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구는 임상검체에서 분리된 *A. baumannii* 균주를 생물형과 항균제 내성양상의 표현형과 ERIC-PCR과 RAPD 분석의 유전형에 의한 방법으로 분리균주를 분류하여 세균학적 다양성을 조사하였다. 표현형에 의한 두가지 방법은 균주 분리시 균종 동정과 환자의 치료를 위한 항균제 감수성 검사를 실시하면서 알 수 있는 것으로 시행하기가 용이하다. 19종의 항균제를 사용하여 검사한 결과 31가지의 다양한 내성양상을 얻을 수 있었으며 분리지역이 다른 균주에서도 동일한 내

Table 5. Comparison of RAPD types and antimicrobial resistance patterns of *A. baumannii* strains

Anti-biogram type	Molecular type						Total
	I	IIa	IIb	IIc	IId	III	
A		24			1		25
B	3	2	2	1		1	9
C		15	1			1	17
D	1	2	11				14
E		2				3	5
F		2	2				4
G	2				2		4
H		1	1				2
I		1					1
J	1			2		1	4
Total	7	49	17	3	3	6	85

성양상이 나타나 결과 해석에 어려움이 있었다. 생물형에 의한 분류는 85주를 16가지 생물형으로 분류할 수 있었으나, 이중 4가지는 *A. baumannii* 균종이 아닌 것으로 나타나 균종 동정에서부터 한계가 있었다. 생물형과 항균제 내성양상의 두가지 방법을 비교하면 0041073을 가진 16주 중 항균제 내성양상 D군에 속하는 9주와 4041473을 가진 41주 중 항균제 내성양상 A군의 17주와 C군의 16주처럼 두가지 표현형의 조합에 의해 하나의 군이 형성되어 동일 유래에 의한 원내감염을 짐작할 수 있었다.

항균제 내성양상은 분리균주에 따라 내성양상에 큰 차이가 나타난다면 훌륭한 역학조사의 표식자가 될 수 있다. 그러나 *A. baumannii* 균종은 대부분의 분리균주가 다약제 내성균주이기 때문에 많은 수의 항균제를 사용하여 검사하여야만 높은 변별력을 가질 수 있다. 항균제 내성양상은 유전자종 3, *A. johnsonii*, *A. junii* 및 *A. lwoffii* 등의 균종에서는 변별력이 떨어지지만, *A. baumannii* 균종에서는 높은 변별력을 가지는 역학조사의 표식자로 이용될 수 있다고 보고하였다^{3,9)}. 본 연구에서도 19종의 항균제에 의해 31가지의 내성형이 나타났고 분리지역에 따라서 동일한 항균제 내성양상을 가지는 균주가 많아 *A. baumannii* 균주의 역학조사에서 일차적인 스크린용으로는 적합함을 알 수 있었다. Bouvet 등⁹⁾에 의해서 개발된 생

물형에 따른 분류방법은 *A. baumannii* 균종을 19개의 생물형으로 나누고, 유전자종 3은 3개의 생물형으로 구분할 수 있는 방법으로 주로 유행균주에 의한 원내감염의 역학조사에 이용되고 있으나, 최근의 분류방법인 *Acinetobacter* 유전자종 분류방법과는 전혀 일치하지 않는 단점을 가지고 있다.

PCR을 이용한 DNA fingerprinting 법은 비용이 저렴하고 단시간 내에 손쉽게 시행할 수 있으며, 세균을 표현형이 아닌 유전형으로 분류할 수 있는 실험기법으로 세균의 분류와 역학조사에 많이 이용되고 있다. PCR을 이용한 방법은 세균이 가지고 있는 반복되는 DNA 염기서열을 대상으로한 primer를 사용하여 비교적 낮은 annealing 온도에서 primer의 비특이 부착을 이용하는 방법으로 증폭된 DNA 산물을 분석하는 방법이다. 박테리오파아지 M13의 core region, ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence), REP (repetitive extragenic palindromic repeated DNA element) 등의 특이 primer를 이용하여 유전자의 반복 염기서열을 증폭하는 방법은 표현형에 의한 방법들에 비해 여러 종의 세균들을 대상으로 적용할 수 있고, 실험이 간단하여 빠른 시간내에 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 유행균주와 산발적으로 발생하는 감염균주를 완전히 변별할 수 없고 반복 실험시 재현성이 낮은 단점을 가지고 있다.^{7,10,12,18)}

현재까지 methicillin 내성 포도구균 감염과 장내 세균 감염 등 여러 세균들의 역학조사에 이용되고 있는 RAPD 분석방법은 PFGE와 동일하거나 그 이상의 변별력이 있다고 보고되고 있으며²⁾, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 속하는 균주를 대상으로한 Grundmann 등⁷⁾의 연구에 의하면 사용되는 시약과 DNA의 추출 방법 및 PCR 증폭조건 등을 표준화한 결과 실험실간에 큰 차이가 없이 높은 재현성을 갖는다고 보고하였다. 10 mer의 비특이 primer와 낮은 annealing 온도를 이용하는 RAPD 분석은 사용하는 primer의 염기서열과 온도에 따라서 결과가 많이 달라질 수 있는 방법이다. 임상검체에서 분리빈도가 가장 높은 *A. baumannii* 단일 균종을 대상으로 하는 RAPD 분석을 이용한 역학조사 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이므로 사용하는 primer의 종류와 PCR 조건을 표준화할 필요성이 있다. 본 연구에서는 실험의 오차를 줄이고 실험의 표준화를 위하여 시판

되는 RAPD용 PCR 반응액을 사용하고 annealing 온도를 36℃로 동일하게 하여 primer 종류만을 달리 하였다. 10종의 primer를 사용한 실험에서 모두 band가 나타났으나 RAPD 분석에서 가장 중요한 증폭된 band의 수는 사용한 primer에 따라서 모두 다르게 나타났다. OPA-3 primer를 사용한 실험에서는 3~6개의 band가 나타나고 band의 선명도가 떨어져 변별력이 낮았으며, OPA-1, OPA-2, OPA-9 및 OPA-10 primer를 사용한 실험에서는 모두 300 bp에서 1 kb의 산물만이 증폭되고 band가 너무 조밀하게 나타나 변별력과 분석이 힘들었다. OPA-4 primer를 사용한 RAPD 분석에서는 실험에 사용한 85주에서 300 bp에서 3 kb까지의 분자량을 가진 DNA band가 4~8개 나타나 균주간 변별력이 가장 높았고 분석에 있어서도 가장 용이하였다. OPA-4 primer를 사용한 RAPD 분석에서 85주의 균주는 23개의 다른 형으로 나타나 16개의 균으로 분류된 생물형보다는 많았고 31개의 균으로 분류된 항균제 내성양상에 의한 결과보다는 적었다. 그러나 항균제 내성양상이 동일하게 나타난 균주들에서도 RAPD 양상은 다르게 나타나는 것으로 보아 항균제 내성양상을 역학조사의 표식자로 이용하기 위해서는 보다 많은 수의 항균제가 필요함을 알 수 있었다. ERIC-1 primer를 사용한 결과에서는 낮은 annealing 온도 때문에 primer의 비특이 부착이 많아져 1~2개의 band만이 선명하게 나타나고 그외의 band들은 희미하게 나타나 분석이 힘들고 재현성 또한 낮게 나타나 역학조사의 표식자로는 부적합하였다. 본 연구에서도 여러 가지 역학조사 방법 중 RAPD 분석이 시행하기가 가장 쉽고 빠른 시간내에 결과를 얻을 수 있었으며 균주간 변별력 또한 높음을 알 수 있었다. 9주의 전남대학교 병원에서 분리된 균주와 7주의 연세대학교 병원에서 분리된 균주는 검사한 표현형과 유전자형이 모두 동일하게 나타나 다약제 내성균주의 확산이 확인되었다.

이상의 결과로 보아 *A. baumannii* 균주는 표현형에 의한 하나의 역학조사 방법으로는 분리균주의 특성과 그 유래를 파악하는 것은 불가능하였고, OPA-4 primer를 이용한 RAPD 분석에 의한 유전형 분류방법은 *A. baumannii* 균주의 역학조사에 적합함을 알 수 있었다. *A. baumannii* 균주는 분리병원에 따라서 많은 수의 균주가 각각 동일한 생물형, 항균제 내성양상, 및 유전형을 나타내는 것으로 보아 동일한 유래를 가진 균주의 전파에 의

한 원내감염이 많이 발생하고 있는 것을 확인할 수 있었고, 8주 이상이 동일한 항균제 내성양상을 나타내는 군은 15종 이상의 항균제에 내성을 가지고 있어서 원내감염의 유행균주가 산발 감염균에 비해 다약제 내성균임을 알 수 있었다. 또한 일부의 분리균주는 지역적으로 멀리 떨어져 있는 병원에서 분리된 균주임에도 불구하고 조사한 모든 방법에서 동일한 특성을 가지는 다약제 내성균으로 확인되어 특정균주의 전국적 확산을 의심할 수 있었다. 다약제 중복내성 *A. baumannii* 균주의 원내감염의 전파와 전국적 확산을 예방하기 위해서는 감염환자의 적극적 치료와 원내감염의 전파를 차단할 수 있는 대책이 수립되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

A. baumannii 균주를 생물형과 항균제 내성양상 등의 표현형과 RAPD 분석에 의한 유전형의 특성을 비교하여 분리균주의 다양성을 조사하고 국내에서 분리되는 *A. baumannii* 균주의 역학조사를 위한 RAPD 분석의 유용성을 알아보았다.

85주의 *A. baumannii*는 API20NE에 의한 code profile을 이용한 표현형에서 16개의 다른 생물형이 나왔으며, 그중 4개는 *A. baumannii* 균종이 아니었다. 분리병원에 따라 각각 다른 생물형을 가진 균주가 많았다. Ip에 대한 내성균주는 없었으며, 모든 균주는 한가지 이상의 항균제에 내성을 나타내어 31가지의 내성형이 나왔고 분리병원에 따라 내성양상은 차이가 있었다.

염기서열이 5'-AATCGGGCTG-3'으로 구성된 primer를 사용한 RAPD 분석 결과에서 분자량이 300 bp에서 3 kb까지의 band가 4~8개 분포하여 균주간의 변별력에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 85주의 균주는 유사도 0.26에서 3개의 군으로 나눌 수 있었으며, I 군이 7주 (8.2%), II 군이 72주 (84.7%), III 군이 6주 (7.1%) 속하였다. II 군에서는 전남대학교 병원에서 분리한 34주와 단국대학교 병원에서 분리한 8주 및 7주의 연세대학교 병원 분리균주가 속하는 IIa 군이 49주 (57.6%)로 가장 많았다. IIa 군의 전남대학교 병원 분리주 9주와 연세대학교 병원 분리주 7주는 항균제 내성양상, 생물형, 및 RAPD 양상이 모두 동일하여 동일 유행균주임을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 국내에서 분리되는 다약제

내성 *A. baumannii* 균주의 역학조사 방법으로 표현형에 의한 방법은 변별력이 낮으며 RAPD 분석에 의한 유전형 분류가 적합함을 알 수 있었다. *A. baumannii* 균주는 분리병원에 따라서 많은 수의 균주가 동일한 특성을 나타내어 동일한 유행을 가진 유행균주의 전파에 의한 원내감염의 발생과 특정균주의 전국적 확산을 의심할 수 있었다. 또한 이러한 원내감염의 유행균주는 산발 감염균에 비해 다약제 내성균임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Alexander M, Ismail F, Jackman PJH, Noble WC: Fingerprinting *Acinetobacter* strains from clinical sources by numerical analysis of electrophoresis protein patterns. *J Med Microbiol* **10**: 55-64, 1993.
- 2) Belkum A, Kluytmans J, Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A, Vandenbroucke-Grauls C, Brule A, Koeleman H, Melchers W, Meis J, Elaichouni A, Vaneechoutte M, Moonens F, Maes N, Struelens M, Tenover F, Verbrugh H: Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* **33**: 1537-1547, 1995.
- 3) Bergogne-Berezin E, Tower K: *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **9**: 148-165, 1996.
- 4) Bouvet P, Jeanjean S, Vieu J, Dijkshroon L: Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* **28**: 170-176, 1990.
- 5) Ferreira M, Vieu J, Klein B: Phage-types and susceptibility to 26 antibiotics of nosocomial strains of *Acinetobacter* isolated in Portugal. *J Int Med Res* **12**: 364-368, 1984.
- 6) Gerner-Smidt P: Ribotyping of the *Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* **30**: 2680-2685, 1992.
- 7) Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshroon L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M: Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility

- of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* **35**: 3071-3077, 1997.
- 8) Hartstein I, Morthland V, Rourke J, Freeman J, Garber S, Sykes R, Rashad A: Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* from incubated and mechanically ventilated patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **11**: 531-538, 1990.
 - 9) Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L: Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **33**: 1567-1572, 1995.
 - 10) Kersulyte D, Struelens M, Deplano A, Berg D: Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **33**: 2216-2219, 1995.
 - 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards M7-A Villanova, Pa., 1992.
 - 12) Reboli A, Houston E, Monteforte J, Wood C, Hamill G: Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* **32**: 2635-2640, 1994.
 - 13) Renders N, Romling U, Verbrugh H, van Belkum A: Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol* **34**: 3190-3195, 1996.
 - 14) Ryang DW, Cho SW, Shin MG, Dhin JH, Shu SP: Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Jpn J Med Sci Biol* **50**: 113-121, 1997.
 - 15) Seifert H, Germer-Smidt P: Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* **33**: 1402-1407, 1995.
 - 16) Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G: Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **32**: 1816-1819, 1994.
 - 17) Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G: Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **32**: 82-86, 1994.
 - 18) Snelling A, Germer-Smidt P, Hawkey P, Heritage J, Parnell P, Porter C, Bodenham A, Inglis T: Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* **34**: 1193-1202, 1996.
 - 19) Tankovic J, Legrand P, de Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C: Duval Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* **32**: 2677-2681, 1994.
 - 20) Tjernberg I: Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* strains identified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **98**: 320-326, 1990.
 - 21) Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaihoui A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G: Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **33**: 11-15, 1995.