대한임상검사학회지 : 42권 제2호, 71-80, 2010
ISSN 1738-3544

Imipenem 비감수성 Carbapenemase 생성 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 항생제 내성유형과 분자생물학적인 특성

강원대학교병원 진단검사의학과[1], 연세대학교 임상병리학과[2], 나사렛대학교 임상병리학과[3], 원광보건대학 임상병리학과[4]

이 진 희[1] · 이 규 상[2] · 임 관 훈[2] · 엄 용 빈[3] · 김 신 무[4] · 김 종 배[2]

Patterns of Antimicrobial Resistance and Genotyping of Carbapenemase-producing Imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*

Jin-Hee Lee[1], Gyusang Lee[2], Kwanhun Lim[2], Yong-Bin Eom[3], Shin-Moo Kim[4], and Jong-Bae Kim[2]

Department of Clinical Pathology, Kangwon National University Hospital, Chuncheon, 200-947, Korea[1]
Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, 220-710, Korea[2]
Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan, 331-718, Korea[3]
Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, 570-750, Korea[4]

Pseudomonas aeruginosa are important nosocomial pathogens. Their resistance to carbapenem is 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, 32 strains of imipenem-nonsusceptible *P. auruginosa* were isolated from Kangwon National University Hospital. To determine the prevalence and genotypes of the carbapenemase-producing clinical isolates, the antibiotic susceptibility was determined by Microscan Walkaway 96 SI System and the carbapenem activity was detected by the modified Hodge test and the imipenem-EDTA-SMA double-disk synergy test. The metallo-β-lactamase gene and OXA-type β-lactamase gene reported in Korea were detected by PCR. As for the result of PCR, 30 isolates of *P. aeruginosa* were found to have bla_{IMP-1}-like and 1 isolate was found to have bla_{IMP-1}-like and bla_{VIM-2}. No clinical isolates were found to have bla_{SIM-1}, bla_{OXA-23}-like 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. *P. aeruginosa* were grouped into 7 clusters of up to 50% of similarity index. In the *P. aeruginosa* group, PS3 was resistant to the most antibiotics, PS1 was susceptible to the most antibiotics. PS7 was resistant to aztreonam unlike other groups. This is the first report of prevalence of carbapenemase in Chuncheon.

Received 5, JUN 2010 / Returned for modification 25, OCT 2010 / Accepted 10, DEC 2010

Key Words : *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase, bla_{IMP-1}-like, bla_{VIM-2}, RAPD-PCR

교신저자 : 김종배. (우) 220-710, 강원도 원주 흥업면 매지리 234 연세대학교 보건과학대학.
TEL : 033-760-2423, Fax : 033-760-2195
E-mail : kimjb@yonsei.ac.kr

I. 서 론

포도당 비발효 그람음성 막대균인 *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*)는 병원감염의 중요 원인균으로 그 분리빈도가 높고, 호흡기 및 요로감염, 수막염, 심내막염, 화상감염, 창상감염, 패혈증 등 다양한 유형의 감염증을 유발한다(Chastre와 Trouillet, 2000). 현재 다제내성을 보이는 경우가 증가하고 있어 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있다(Perez 등, 2007).

β-lactam 계 항생제 중 carbapenem 계 항생제는 주로 imipenem과 meropenem이 사용되는데, 이는 이들 항생제가 다제내성을 보이는 포도당 비발효 그람음성 막대균에도 효과적으로 사용할 수 있기 때문이다. 그 이유는 carbapenem 계 항생제는 penicillin binding protein과 친화도가 높으며, extended-spectrum β-lactamase와 AmpC-β-lactamase에 안정도가 상대적으로 높으며, 세균의 세포외막에 높은 투과도를 보인다. 그러나 다제내성 그람음성 막대균이 증가함에 따라서 carbapenem의 사용이 증가하였고, 결국은 carbapenem에 대해서도 내성인 균주가 보고되기 시작하였다(Livermore, 2002; Lee 등, 2003). 현재 carbapenem 내성은 주로 *Acinetobacter baumannii*와 *P. aeruginosa*에서 관찰되는데, 국내에서도 carbapenem 내성 균주가 점차 증가하고 있어 더욱 심각한 문제가 되고 있다(Jacoby와 Munoz-Price, 2005; Yong 등, 2006).

그람음성 막대균의 carbapenem 내성 기전 중 가장 중요한 것은 β-lactamase의 생성에 의한 carbapenem 제제의 불활화이며, 특히 *Pseudomonas* spp.의 carbapenem-hydrolyzing β-lactamase(carbapenemase)는 주로 molecular class B metallo-β-lactamase 또는 class D β-lactamase이다(Walsh 등, 2005; Queenan과 Bush, 2007).

Amber class B β-lactamase는 metallo-β-lactamase(MBL)로서 효소활성 시 metal ion, 주로 $zinc^{2+}$를 가져 활성을 나타낸다. 이들은 penicillin 뿐만 아니라 협범위 및 광범위의 cephalosporin 계, carbapenem 계 등 aztreonam을 제외한 β-lactam 항생제 대부분에 가수분해 활성이 있으며, metal chelator 즉, EDTA에 의해서 활성이 억제되는 특징이 있다(Livermore와 Woodford, 2000; Walsh, 2005). IMP(active on imipenem), VIM(Verona integron-encoded metallo-β-lactamasea)이 대표적인 MBL이며, SPM(Sao Paulo metallo-β-lactamase)과 GIM(German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase) 등도 보고되었다(Lee 등, 2005; Drieux 등, 2008).

IMP-1 metallo-β-lactamase는 1988년 일본에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 보고되었으며(Takahashi 등, 2000), VIM-1 metallo-β-lactamase는 1999년에 이탈리아에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 처음 보고되었으며, 2000년에 프랑스에서 VIM-2가 보고되었다(Poirel 등, 2000; Poirel 등, 2001). 현재까지 IMP는 27가지, VIM은 24가지의 변형이 보고되었다(http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1). 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 막대균에서 IMP-1과, VIM-2 그리고 SIM-1이 보고된 바 있다(Toleman 등,

Table 1. Primer sequences used to detection carbapenemase gene

Primer	Sequence (5′ to 3′)	Expected size (bp) of PCR product	Reference
IMP-F	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488	Jeon *et al.* (2005)
IMP-R	ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
VIM-F	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780	
VIM-R	TGCTACTCAACGACTGAGCG		
SIM1-F	TACAAGGGATTCGGCATCG	571	Lee *et al.* (2005)
SIM1-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG		
OXA-23F	GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	1058	Jeon *et al.* (2005)
OXA-23R	TCACAACAACTAAAAGCACTGT		
OXA-24F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825	
OXA-24R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		

2002; Castanheira 등, 2004; Lee 등, 2005).

VIM, IMP, GIM, SIM 등의 대부분의 MBL 유전자는 class I integron 내에 gene cassette로 존재한다. 항생제 내성 유전자 cassette는 한 integron에서 다른 integron으로 자유롭게 이동할 수 있으나 integron 자체가 다른 세균으로 이동하지는 못하며, plasmid나 transposon이 이동될 때 함께 이동하므로 내성유전자가 다른 균종으로 쉽게 전파되는 것으로 알려져 있다(Arakawa 등, 1995; Queenan과 Bush, 2007). 국내에서 MBL 생성으로 인한 *P. aeruginosa*가 10% 이상으로 보고되었으며, 다른 그람음성 막대균으로 imipenem 저항성이 쉽게 전파될 수 있음을 경고하였다(Lee 등, 2002; Yum 등, 2002).

Amber class D β-lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대한 강한 활성을 나타내므로 oxacillinase라고 부른다. OXA-β-lactamase 중에는 extended-spectrum cephalosporin을 가수분해하는 것과 carbapenem을 분해하는 것이 있다. 또한 clavulanic acid나 EDTA에 의해 그 활성이 억제되지 않는 특징이 있다(Naas와 Nordmann, 1999; Fluit 등, 2001; Walther-Rasmussen과 Høiby, 2006; Perez 등, 2007).

국내에 carbapenem 내성균이 보고된 것은 비교적 근년이며, 이에 대한 연구가 아직 많지 않다. *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 계 항생제에 대한 내성률이 높을 것으로 생각된다. 그러나 포도당 비발효 그람음성 막대균의 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 다제내성균에 대한 치료 시 유효한 약제가 적어서 병원내 내성균 확산이 임상적으로 중요한 문제로 대두되고 있다. Lee 등은 modified Hodge test로 cabapenemase 생성 그람음성 막대균을 선별하고, imipenem(IPM)-EDTA double-disk synergy test로 MBL 생성균과 비생성균을 감별할 수 있다고 보고하였다(Lee 등, 2001; Lee 등, 2003).

이에 본 연구에서는 강원도의 한 대학병원에서 분리된 imipenem 비감수성 *P. aeruginosa*를 대상으로 Amber Class B와 D의 carbapenemase 생성현황을 조사하고 유전형을 분석하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 임상검체에서 세균의 분리 동정

2007년 7월부터 2008년 4월까지 강원도 춘천시에 소재한 강원대학교병원 진단검사의학과에 의뢰된 가검물에서 분리된 *P. aeruginosa* 56주 중 중복검체를 제외한 imipenem 비감수성 *P. aeruginosa* 32주를 실험에 사용하였다. 균종의 동정은 Microscan Walkaway 96 SI System의 Dried Neg Combo panel type 44(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., West Sacramento, USA)를 사용하여 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 System을 사용하여 항균제의 최소억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다. 항생제 감수성의 판단은 CLSI M100-S16(formerly NCCLS, 2006)의 breakpoint에 따랐다.

3. Carbapenemase 생성균주 선별

Lee 등(2001, 2003)의 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 μg/mL의 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, 배지 중앙에 10 μg imipenem 디스크 (Becton Dickinson, BBL, Sparks, USA)을 놓은 후 시험균주를 백금이로 디스크 가장자리 가까운 쪽에서 시작하여 바깥쪽으로 굵게 접종한 후 실온에서 15분 동안 방치하고, 37℃에서 산소성 환경에서

하룻밤 배양 후 뒤틀린 억제대 확장현상이 관찰되거나, 접종선 중앙 쪽 말단 부위가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되면 carbapenem 가수분해 양성으로 판독하였다.

4. Metallo-β-lactamase 생성 선별시험

Lee 등(2001, 2003)의 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 McFarland로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton agar에 고르게 접종한 후, 0.5 M EDTA와 SMA 용액(디스크 당 EDTA 750 μg과 SMA 2 mg)이 첨가된 6 mm diameter blank disk(Becton Dickinson, BBL, Sparks, USA)와 10 μg imipenem 디스크를 가장자리 간격이 10 mm가 되도록 부착한 후 실온에서 15분 동안 방치하였다. 세균이 접종된 배지는 37℃의 호기성 조건에서 하룻밤 배양 후 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

5. DNA의 추출

PCR에 사용할 template DNA를 추출하기 위하여 시험세균을 brain heart infusion(Difco, Detroit, MI, USA) broth 4 mL에 접종하여 37℃의 산소성 조건에서 하룻밤 배양하였다. 배양액 1 mL을 1.5 mL conical tube에 취하여 12,000 rpm에서 10분간 원침 후, 상층액을 제거하고 멸균 증류수 1 mL에 부유시켜 다시 12,000 rpm에서 7분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물을 증류수 200 μL에 부유시키고, 이를 10분간 끓인 후 12,000 rpm에서 7분간 원심분리하여, 상청액을 취하고 template DNA로 사용하였다.

6. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응

Cabapenemase 생성시험과 MBL 생성시험 양성인 균주의 MBL 형을 확인하기 위하여 사용된 primer는 Table 1과 같다. IMP-1, VIM-2 및 OXA-23, 24 β-lactamase의 검출을 위한 PCR 반응은 Jeon 등(2005)이 사용한 방법에 따라 시행하였으며, SIM-1 유전자의 검출을 위한 PCR은 Lee 등(2005)이 사용한 방법에 따라 시행하였다.

7. RAPD에 의한 유전자 지문 분석법

RAPD-PCR은 Kalpoe 등(2007)이 사용한 방법에 따라 시행하였다. Primer는 M13, DAF4, RTG2, RTG3, RTG4, RTG6를 주문제작(Bioneer Co., Daejeon, Korea)하여 사용하였다.

III. 결 과

1. 임상검체에서 분리된 *P. aeruginosa*

강원대학교병원 진단검사의학과의 가검물에서 분리된 임상 분리 균주를 Microscan Walkaway 96 SI System을 사용하여 검사를 시행한 결과 객담 검체에서 8주, 소변 검체에서 8주, 카테터 끝 검체에서 7주, 상처 검체에서 4주, 농양, 혈액, 배출액, hemovac, 발진 검체에서 각각 1주, 총 32주가 *P. aeruginosa*로 동정되었다.

2. 항생제 감수성 시험 결과

MIC 측정을 위해 Microscan Walkaway 96 SI System을 사용한 결과는 Table 3과 같았다. 시험된 32주 모두는 imipenem과 meropenem에 중증도 감수성 이상을 나타내었으며, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin에 대해 모든 균주들이 내성을 나타내었다. 나머지 항생제에 대한 내성률은 piperacillin/tazobactam 44%, ticarcillin/K clavulanate 94%, ceftazidime 94%, cefepime 31%, aztreonam 66%, imipenem 81%, meropenem 78%, amikacin 78%, gentamicin 91%, tobramycin 91%, levofloxacin 91% 이었다. 각 항생제에 대한 감수성 결과는 Table 2에서와 같이 분류하였다.

3. Carbapenemase 생성균주 선별 시험 결과

Carbapenemase 선별을 위한 modified Hodge test 결과 32주 모두에서 접종선 중앙 쪽 말단 부위가 다른 부위에 비해서 더 넓게 증식되어 carbapenem 가수분해 양성으로 판독하였다(Fig. 1).

MBL 생성 균주를 선별하기 위한 IMP-EDTA-SMA double-disk synergy test에는 32주 모두에서 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되어 양성으로 판정하였다(Fig. 2).

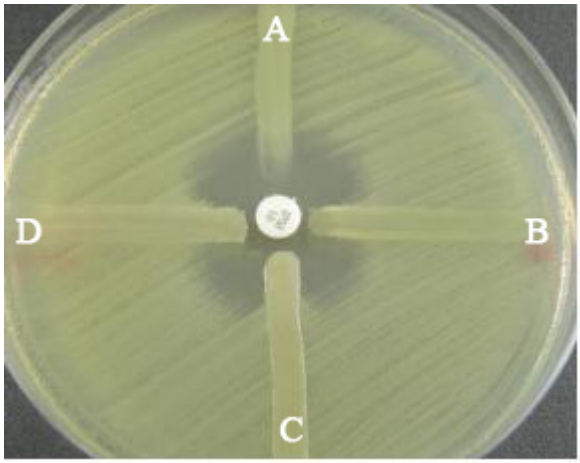


Fig. 1. Screening of carbapenemase-producing clinical isolates using modified Hodge tests. Positive result shows distorted inhibition zone of background. Line (A) is negative control (*E. coli* ATCC 25922), Line (B) and (C), (D) are imipenem-hydrolyzing strains which distorted the inhibition zone.

4. Carbapenemase 유전자의 중합효소 연쇄반응 결과

PCR 결과 bla_{IMP-1}-like 형은 총 32균주 중 30주에서 검출되었으며, 1주에서는 bla_{IMP-1}-like과 bla_{VIM-2} 형이 동시에 검출되었다. bla_{OXA-23}-like 형과 bla_{OXA-24}-like 형은 모든 균주에서 검출되지 않았다. 또한 1주에서는 carbapenemase 유전자가 검출되지 않았다.

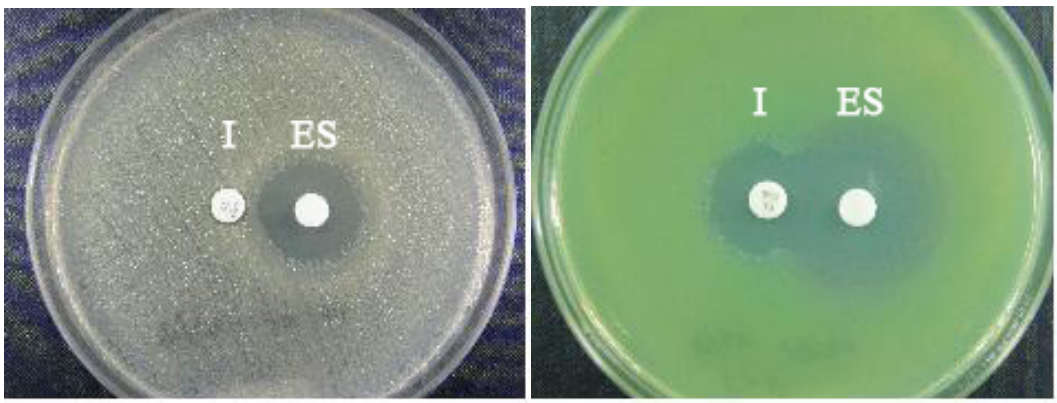
5. RAPD에 의한 유전자 지문 분석

RAPD-PCR을 시행한 결과 DAF-4, RTG-2, 4, 6 primer에서는 DNA 절편이 형성되지 않거나, 3개미만의 band를 형성하였다. M13 primer를 사용하여 RAPD-PCR을 시행한 결과 100 bp~2 kb 사이에서 10개 이내의 유전자 절편을 나타내었다.

6. 균주간 유전적 유연성 분석

RAPD-PCR을 시행한 결과를 바탕으로 각각의 균주간의 유전적 유연관계를 알아보았다. Bio-Rad Fingerprinting^{TM} II software version 3.0을 사용하여 관찰된 DNA band들의 유전자형 양상을 분석하였으며, UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다. Imipenem 비감수성 *P. aeruginosa*는 유사도 50% 이상의 수준에서 크게 7개의 군으로 분류가 가능하였다(Fig. 3).

항생제의 내성유형은 Table 3과 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.



(A) (B)

Fig. 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. Plate (B) is positive. I, imipenem disk; ES, EDTA+SMA disk.

Table 2. Antimicrobial resistance of carbapenemase-producing clinical isolates of *P. aeruginosa* by Microscan Walkaway 96 SI System

Antimicrobial agents		Number (%) of isolates		
		S	I	R
β-lactam/ β-lactamse inhibitor combinations	Piperacillin/ Tazobactam	18 (56)	0 (0)	14 (44)
	Ticarcillin/ K clavulanate	2 (6)	0 (0)	30 (94)
Cephems	Cefotaxime	0 (0)	0 (0)	32 (100)
	Ceftazidime	1 (3)	1 (3)	30 (94)
	Ceftriaxone	0 (0)	0 (0)	32 (100)
	Cefepime	1 (3)	21 (66)	10 (31)
Monobactam	Aztreonam	3 (9)	8 (25)	21 (66)
Carbapenems	Imipenem	0 (0)	6 (19)	26 (81)
	Meropenem	0 (0)	7 (22)	25 (78)
Aminoglycosides	Amikacin	7 (22)	0 (0)	25 (78)
	Gentamicin	2 (6)	1 (3)	29 (91)
	Tobramycin	3 (9)	0 (0)	29 (91)
Quinolones	Ciprofloxacin	0 (0)	0 (0)	32 (100)
	Levofloxacin	0 (0)	3 (9)	29 (91)

Abbreviations. R; Resistant, I; intermediate, S; susceptible.

Table 3. Resistance patterns of imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* isolates

Isolated bacteria	Group	Antimicrobial resistance
P. aeruginosa	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. AK, amikacin; AZT, aztreonam; CAX, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CFT, cefotaxime; CP, ciprofloxacin; CPE, cefepime; GM, gentamicin; IMP, imipenem; LVX, levofloxacin; MER, meropenem; P/T, piperacillin/tazobactam; TIM, ticarcillin/K clavulante; TO, tobramycin

IV. 고 찰

*P. aeruginosa*는 원내 감염의 주요 원인균으로 현재 이들 균주에 가장 널리 쓰이는 치료제인 carbapenem 계 항생제에 내성인 균주가 점차 증가하고 있어 심각한 문제가 되고 있다. 이들 균주가 면역이 저하된 중증의 장기 입원환자가 많은 병원에서 더 높은 빈도로 분리되고, 또 이에 따라 carbapenem을 많이 사용하는 병원에서 carbapenem 계 항생제에 대한 내성률이 높을 것으로 생각된다. 그러나 현재 이에 대한 검출지침이 CLSI 권장에 포함되어 있지 않아 정확한 검출이 어렵고, 이런 다제내성균에 대한 치료 시 감수성 약제의 제한으로 병원내 내성균 확산이 임상적으로 중요한 문제로 대두되고 있다.

대표적인 metallo-β-lactamase인 IMP와 VIM은 약 30% 정도로 낮은 아미노산 동일성으로 보이지만, monobactam을 제외한 모든 β-lactam 계 항생제에 내성을 나타내는 가수분해 성질이 유사하다고 알려져 있다 (Poirel과 Nordmann, 2002). 일본에서는 bla_{IMP-1}을 생성하

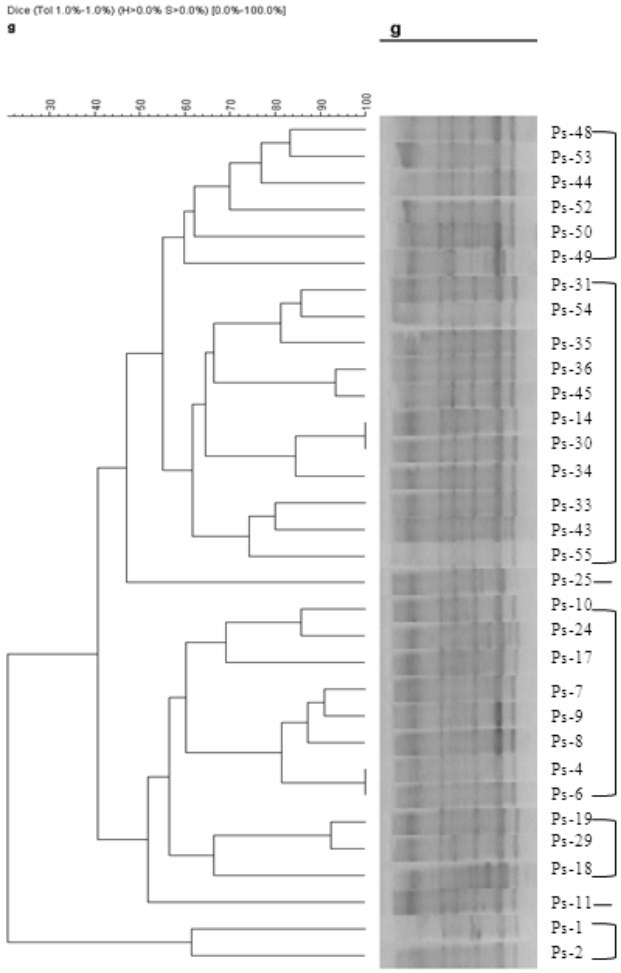


Fig. 3. Dendrogram of the similarity index among carbapenemase-producing imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* by RAPD with M13 primers.

는 그람음성 막대균의 보고가 흔하나(Hirakata 등, 2003), 국내에서의 보고는 흔하지 않다. Oh 등(2003)은 국내의 MBL 생성 *P. aeruginosa*에서 VIM-2가 가장 흔하다고 보고하였다. 또한 Yong 등(2006)의 보고에 의하면 MBL 생성 *P. aeruginosa*에서 bla_{VIM-2}-like 유전자와 bla_{IMP-1}-like 유전자가 각각 90%와 10%로 검출되었음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 *P. aeruginosa* 32주 중 30주에서 bla_{IMP-1}, 1주에서 bla_{IMP-1}와 bla_{VIM-2}가 동시에 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 춘천지역에서 분리되는 *P. aeruginosa*에 MBL 유전자인 bla_{IMP-1}이 이미 확산돼 있음에 반해 bla_{VIM-2}는 확산되는 초기임을 추측할 수 있었다.

bla_{SIM-1}은 Lee 등(2005)에 의해 국내의 *Acinetobacter* spp. 균종에서 분리된 바 있어 검출을 시도하였으나 검출되지 않았다. 또한 imipenem 비감수성 *P. aeruginosa*의 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 필요할 것으로 생각된다. 또한 carbapenem 내성이 carbapenemase 생성 외에도 염색체성 AmpC 효소의 돌연변이에 의한 기능소실이나, OprD porin의 소실에 의한 세포외막의 투과성의 감소, 그리고 세균의 세포막에 존재하는 efflux pump system의 과조절이 원인일 수 있다고 보고되었다(Livermore, 1995; Köhler 등, 1999; Livermore와 Woodford, 2000).

Genomic DNA fingerprinting은 유전자 염기서열 분석법으로 얻을 수 없는 각 균주의 염색체 상에 존재하는 미세한 유전자 차이를 구별할 수 있어 분별능이 뛰어나며, 실험의 재현성과 경제적인 측면에서도 많은 장점을 가지고 있다고 알려져 있다(Olive와 Bean, 1999). 따라서 본 연구에서는 imipenem 비감수성 *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(Wang 등, 1993). 실험 결과 유사도 50% 이상의 수준에서 크게 7개의 군으로 분류가 가능하였으나, 항생제 내성형 분류와는 특별한 연관성을 찾지 못하였다. 이는 RAPD-PCR 결과는 항균제 내성과 연관성을 찾아볼 수 없음을 시사한다. 따라서 PFGE(pulse-field gel electrophoresis)나 AFLP(amplified fragment length polymorpism)와 같은 추가적인 DNA fingerprinting 방법을 시행하여 항생제 내성형에 따른 분류와 비교할 필요가 있다.

본 연구에서는 imipenem 비감수성 *P. aeruginosa*를 대

상으로 Microscan System을 통하여 측정한 최소발육억제농도와 중합효소 연쇄반응을 통하여 확인한 carbapenemase 유전자를 바탕으로 RAPD-PCR을 시행하여 균주간의 유사성으로 근연도 분석이 가능하였다. 또한 본 실험 결과는 강원도 춘천에서 imipenem 비감수성 *P. aeruginosa*를 대상으로 한 carbapenemase 유전자의 첫 보고로서, 이 지역에서 이들 균종의 항생제 내성 유형과 carbapnemase 유전자의 분포도를 알아볼 수 있는 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 carbapenemase 생성 균주는 *P. aeruginosa*에서 다제내성을 일으켜 치료가 어렵고 높은 사망률로 이어지게 되므로 적절한 치료를 위하여 검출지침이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1612-1615, 1995.
2. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, bla_{GIM}-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4654-4661, 2004.
3. Chastre J, Trouillet JL. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*). *Semin Respir Infect* 15:287-298, 2000.
4. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14(Suppl. 1):90-103, 2008.
5. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 14:836-871, 2001.
6. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayama M, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Psuedomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 37:26-32, 2003.
7. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β-lactamase. *N Engl J Med* 352:380-391, 2005.
8. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in korea. *J Clin Microbiol* 43:2241- 2245, 2005.
9. Kalpoe JS, Templeton KE, Horrevorts AM, Endtz HP, Kuijper EJ, Bernards AT, Klaassen CH. 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, 2007.
10. Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activies against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemothe*r 43:424-427, 1999.
11. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 7:88-91, 2001.
12. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM. 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, 2002.
13. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomona*s spp.

and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 41:4623-4629, 2003.

14. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. 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, 2005.
15. Livermore DM. Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557-584, 1995.
16. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 3:218-224, 2002.
17. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemase: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 3:489-495, 2000.
18. Naas T, Nordmann P. OXA-type β-lactamases. *Curr Pharm Des* 5:865-879, 1999.
19. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BK. 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 Methods* 54:411-418, 2003.
20. Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism. *J Clin Microbiol* 37:1661-1669, 1999.
21. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenger of Multidrug-Rsistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3471-3484, 2007.
22. Poirel L, Lambert T, Türkoglü S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of class 1 integron form *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, 2001.
23. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. 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, 2000.
24. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 3:117-127, 2002.
25. Queenan AM, Bush K. Carbapenemase: the versatile β-lactamase. *Clin Microbiol Rev* 20:440-458, 2007.
26. Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M, Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 38:526-529, 2000.
27. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. 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, 2002.
28. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 11(Suppl 6):2-9, 2005.
29. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta lactamases: the quiet before storm? *Clin Microbiol Rev* 18:306-325, 2005.
30. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57:373-383, 2006.
31. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res* 21:5930-5933, 1993.
32. Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, Lee K, Chong Y. Increasing Prevalence and Diversity of metallo-β-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacte*r spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1884-1886,

2006.

33. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, Chong Y. 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, 2002.