

Characteristics and Antibiotic Susceptibility of Imipenem-Resistant Clinical Isolates Producing Carbapenemase

Han Na Choe¹, Chul Park^{1,2}, Hyung Rak Kim^{1,2}, Keun Sik Baik¹, Se Na Kim^{1,3} and Chi Nam Seong^{1*}

¹Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Department of Laboratory Medicine, Saint Carlo Medical Center, Suncheon 540-718, Korea

³Korea Basic Science Institute Suncheon Center, Suncheon 540-742, Korea

Received May 28, 2010 / Accepted July 20, 2010

Imipenem-resistant bacteria were isolated from clinical specimens taken from hospitalized patients in Suncheon, Korea. Fifty-four isolates were phylogenetically analyzed based on 16S rRNA gene and *gyrB* gene sequence comparisons. Isolates were affiliated with *Pseudomonas aeruginosa* (30 strains; 55.6%), *Acinetobacter baumannii* (21; 38.9%), *Enterobacter hormaechei* (2) and *Pseudomonas putida* (2). Twenty-two isolates produced metallo- β -lactamase (MBL); 12 *Acinetobacter baumannii* strains, 7 *Pseudomonas aeruginosa* strains, 2 *P. putida* strains and 1 *Enterobacter hormaechei* strain. Antibiotic susceptibility of the isolates was determined using the disc diffusion method and Vitek system. Strains producing metallo- β -lactamase (type IMP & VIM) were more resistant to antibiotics ceftazidime, aztreonam, amikacin and gentamicin than to strains producing OXA and SHV type of β -lactamase.

Key words : Imipenem-resistant, 16S rRNA gene, *Acinetobacter baumannii*, metallo- β -lactamase, antibiotic susceptibility

서 론

Carbapenem은 세포 투과성이 높아 β -lactam제에 내성인 세균에 의한 감염 치료에 유용하게 사용되어 왔다[6,18]. 그러나 최근 carbapenem 의 사용이 빈번해지면서 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* 및 *Enterobacter cloacae* 등에서 carbapenemase 를 생산하는 세균의 분리가 증가하고 있다. 이 항생제에 대한 내성 기작은 세포막의 penicillin binding protein (PBP)의 변화, 항생제의 투과성 감소 그리고 carbapenemase에 의한 항생제의 불활성화 등이 있는데, 이중에 가장 중요한 것은 미생물들이 carbapenemase를 생산하여 carbapenem을 불활성화 시키는 것이다[16].

Carbapenemase에는 class A, B, D 등이 있으며 이 중 효소 활성이 가장 높은 것은 class B이며 효소의 활성을 위해 zinc와 같은 금속 이온이 필요하기 때문에 metallo- β -lactamase (MBL)로 명명되었다[20].

현재까지 MBL은 전 세계적으로 5종류(IMP, plasmid-mediated metallo- β -lactamase; VIM, Verona integron-encoded metallo- β -lactamase; SPM, São Paulo metallo- β -lactamase; GIM, metallo- β -lactamase GIM; SIM, metallo- β -lactamase SIM)의 유전자형이 보고 되었으며[2,14,15,23] 그 중 가장 많은 변이형은 IMP와 VIM 유전자형으로 각각 17개와 10개의 변이형이 보고 되었다[4]. 그 중에서도 VIM-2형과

IMP-1형이 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter* 에서 주로 분리되고 있으며 국내 또한 분리된 대부분의 MBL 유전형은 VIM-2 형이며, IMP-1 형도 보고되고 있다[10,12].

Carbapenem계 항생제 중 가장 먼저 개발된 대표적인 항생제가 imipenem이다. Imipenem에 내성을 지닌 미생물의 출현은 1985년 영국에서 원내 감염균인 *A. baumannii*[17]가 처음으로 보고되었으며 이후 *P. aeruginosa*[19]를 비롯한 다른 종들이 출현하였으며 최근에는 전 세계적으로 내성 미생물의 분리 빈도가 증가하고 있다.

본 연구는 2007년 3월부터 2008년 2월까지 순천 S병원의 환자 검체로부터 imipenem에 내성을 지닌 세균을 분리하여 동정을 하였다. 그리고, 분리균의 β -lactamase유전형의 분석과 항생제에 대한 내성 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

Imipenem 내성 균주 분리

2007년 3월부터 2008년 2월까지 병원 환자 검체로부터 우점하는 그람음성 간균들을 분리하였다. 분리된 균주들은 디스크 확산법으로 imipenem에 내성인 균주를 일차선별하고 다시 Vitek 32 (bioMerieux, France)를 이용하여 imipenem의 MIC가 16 μ g/ml 이상임을 확인 한 후 동일 환자로부터 반복 분리된 균주를 제외한 54 균주를 실험에 사용하였다. 미생물 분리와 디스크 확산법의 실시는 Mueller Hinton II 한천(MHA; Becton Dickinson) 배지를 이용하여 37°C 에서 16-18시간 배양하여 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3613, Fax : +82-61-750-5459

E-mail : scnu@scnu.ac.kr

생화학적 특성을 이용한 세균 동정

순수 분리된 세균의 동정은 TSI (triple sugar iron) 시험과, 황화수소 생성능, indol생성능, 운동성 유무와, MR (methyl red) 반응, VP (Voges-Proskauer) 반응, citrate 이용능과 oxidase 시험을 실시하였다[11,22]. 그리고 Vitek 32 GNI kit를 이용하여 동정을 실시하였다. MHA 배지에 자란 세균 집락을 0.45% (w/v) 식염수에 혼탁하여 GNI 카드에 접종한 후 배양시켰다. 1시간 간격으로 균의 증식을 확인 하며 반응 결과를 Vitek 32의 database를 이용하여 세균을 동정 하였다.

DNA 추출

MHA배지에 자란 세균집락 1 loop를 Lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS] 100 µl와 2 small spoon의 glass bead (size: 0.4 mm) 혼합체에 넣고 10분간 TOMY mixer (TOMY, USA)에 혼합하였으며, 1× TE buffer 200 µl와 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 300 µl를 넣고, 3분간 TOMY mixer에 다시 혼합 한 후 원심분리 (12,000 rpm, 4 min)하였다. 상등액을 새로운 tube 에 옮긴 후 RNase A (20 mg/ml) 3 µl을 넣고 37°C에 30분간 배양하였고, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2 volume의 100% ice ethanol을 넣고 DNA를 침전 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C) 하였다. 차가운 70% ethanol로 세척 한 후 건조하여 멸균된 증류수에 녹여 실험에 사용할 때까지 -20°C에 냉동 보관하였다.

계통분류학적 연구

16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 27F (5'-AG AGTTT GATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGYTACCT TGTTA CGACTT-3') primer를 사용하였다[4]. PCR 반응액의 조성 및 증폭조건은 Baik [1]의 방법을 이용하였다. DNA gyrase (*gyrB*) 유전자를 증폭하기 위해 UP-1 (5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY-3')와 UP-2r (5'-AGC AGG GTA CGG ATG TGC GCC RTC NAC RTC NGC RTC NGT CAT-3') primer 를 사용하였다[25]. PCR 반응

액의 조성 및 증폭 조건은 Yamamoto 등[25]의 방법으로 PCR thermal cycler TP600 (TAKARA Bio Inc., Japan)을 이용하여 증폭하였다. 염기서열 분석은 제노텍(Korea)에 의뢰하였다.

결정된 16S rRNA 유전자와 *gyrB* 유전자 염기서열의 중간 유사도는 BLAST을 이용하여 GenBank 데이터베이스와 비교 · 검색하였다. 계통수 작성은 neighbor-joining[21]방법을 이용하였으며 진화거리는 Jukes와 Cantor [9]의 식을 이용하였다. 계통수의 신뢰도는1000 회 반복을 통한 bootstrap 분석[7]을 실시하여 확인하였다.

항생제 감수성 검사

분리균의 항생제 감수성 조사는 각각의 항생제가 함유된 디스크(Table 4)를 사용하여 실시하였다. McFarland 0.5관에 맞춘 세균현탁액을 MHA배지에 접종한 후 항생제 디스크를 올려놓고 37°C 에서 16-18시간 배양한 후 억제대의 직경을 측정하였다. 감수성, 중간내성, 저항성 기준은 CLSI [3] 기준으로 하였으며 매 시험마다 대조 균주로 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853를 사용하였다. 항생제의 최소억제 농도 측정은 Vitek GNS-433 card (bioMeriex, France)로 측정 하였다.

Metallo-β-lactamase (MBL) 검증

분리균이 MBL을 생성하는지 여부는 Hodge 변법과 imipenem-EDTA 디스크 상승 효과 시험을 통해 확인하였다. Hodge 변법의 시험은 다음과 같다. *E. coli* ATCC 2592를 생리 식염수에 희석하여 McFarland 0.5관 탁도로 맞추어 MHA 평판배지에 접종하였다. 물기가 마른 후 배지 중앙에imipenem 디스크를 올려놓은 후 중앙으로부터 배지 접시 가장 자리를 향해 시험 세균을 희선 접종 하였다. 37°C에서 16-20시간 배양 하여 시험 균주 접종 선 중앙쪽 말단부가 다른 부위에 비해 더 넓게 증식 되면 양성으로 판정 하였다[12] (Fig. 2a).

Imipenem-EDTA 디스크 상승 효과 시험에서는 시험 균주를 생리식염수에 McFarland 0.5관 탁도로 맞추어 MHA배지에 접종한 후 10 µg imipenem 디스크와 0.5 mM EDTA 10 µl가 함유된 디스크를 10 mm 거리가 되게 올려놓고 16-18시간

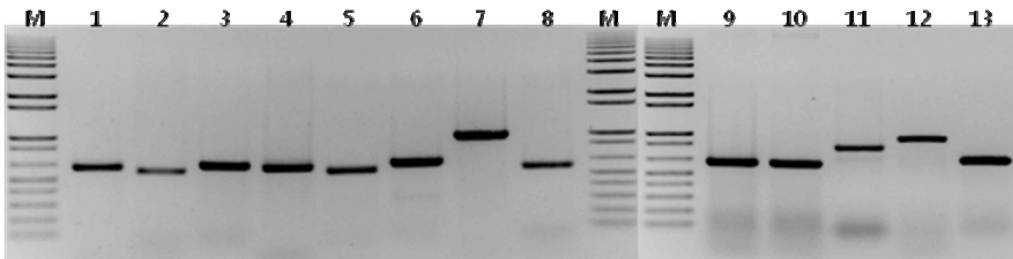


Fig. 1. Detection of β-lactamase genotype from clinical isolates. M, 1 kb plus DNA ladder; Lanes 1, *A. baumannii* IR128 (IMP); 2, *A. baumannii* IR127 (VIM); 3, *A. baumannii* IR144 (IMP); 4, *A. baumannii* IR146 (IMP); 5, *P. monteilii* IR105 (VIM); 6, *A. baumannii* IR151 (IMP); 7, *A. baumannii* IR125 (OXA-23); 8, *P. putida* IR111 (VIM); 9, *P. aeruginosa* IR139 (IMP); 10, *A. baumannii* IR153 (IMP); 11, *P. aeruginosa* IR108 (SHV); 12, *E. hormaechei* IR156 (OXA-1); 13, *E. hormaechei* IR156 (IMP).

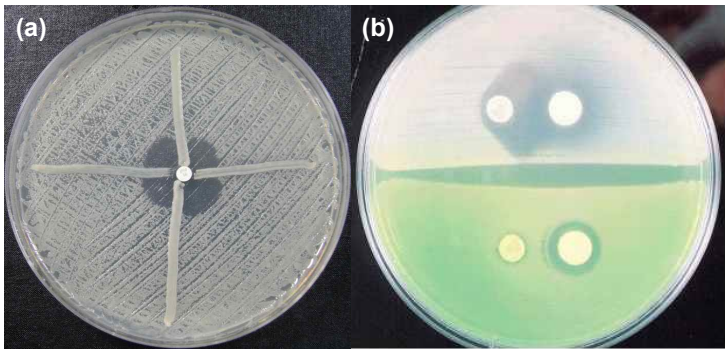


Fig. 2. Modified Hodge test (a) and EDTA double disk synergy test (b). (a): Upper and right are imipenem-hydrolyzing strains which distorted the inhibition zone. Left and low are imipenem-non-hydrolyzing strains with no effect on the zone (negative control). (b): The right disc contains 5 mM EDTA and the left disc contains 10 µg imipenem. Upper is MBL producing strain. Lower is non-MBL producing strain.

동안 배양한 후 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다[12] (Fig. 2b).

PCR을 이용한 β-lactamase 유전자형 분석

β-Lactamase 유전자형을 검사하기 위해 기존에 알려진 primer를 이용(Table 1)하여 PCR로 증폭하였다[13]. PCR 반응액은 dNTP (각 2.5mM), MgCl₂ 2 mM, primer 각 20 pmol, Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea) 0.5 U, genomic DNA 100 ng 및 반응완충용액(10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)에 총 부피가 50 µl가 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR 반응은 PCR thermal cycler TP 600를 이용하였으며 PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시키고, 95°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 40초의 cycle을 30회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 10분 동안 반응 시켰다. PCR 산물은 2.5% agarose gel에 전기영동한 후 확인하였다.

결 과

균주의 분리

Imipenem에 내성을 지닌 총 54균주는 중환자실 환자 35명(64.8%)과 병동환자 19명(35.2%)의 임상검체로부터 분리되었다. 분리된 별로는 객담으로부터 35균주로 가장 높게 분리되었으며, 그 다음으로는 소변, 창상감염 및 농으로부터 각각 6균주, 4균주 그리고 3균주가 분리되었다. 담즙, 혈액 그리고 기관지 세척액으로부터는 각각 2균주가 분리되었다.

분리균의 특성 및 동정

전통적인 생화학적 검사 방법과 Vitek 32를 이용한 균주 동정결과는 *Pseudomonas aeruginosa* 2균주, *Acinetobacter baumannii* 21균주, *Pseudomonas* spp. 2균주 그리고 *Enterobacter cloacae* 2균주로 동정되었으며 생리적 특성은 Table 2에 나타

Table 1. Primers used for sequencing of the β-lactamase gene and for detection of MBL genes

Class	Primer	Sequence (5'→3')	Target β-lactamase	Amplicon size (bp)
A	SHV-F	CCG GGT TAT TCT TAT TTG TCG CT	SHV-1 & derivative	831
	SHV-R	TAG CGT TGC CAG TGC TCG		
B	IMP-F	GCT ACC GCA GCA GAG TCT TTG	IMP	657
	IMP-R	CCT TTA ACC GCC TGC TCT AAT G		
	VIM-F	GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC	VIM	581
	VIM-R	AGA CCG CCC GGT AGA CC		
D	OXA-1F	AGC CGT TAA AAT TAA GCC C	OXA-1	908
	OXA-1R	CTT GAT TGA AGG GTT GGG CG		
	OXA-2F	GCC AAA GGC ACG ATA GTT GT	OXA-2	700
	OXA-2R	GCG TCC GAG TTG ACT GCC GG		
	OXA-10F	TCT TTC GAG TAC GGC ATT AGC	OXA-10	760
	OXA-10R	CCA ATG ATG CCC TCA CTT TCC		
	OXA-23F	GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG	OXA-23, 27, 49	1058
	OXA-23R	TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG		
	OXA-24F	GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA	OXA-24, 25, 26, 40, 72	825
	OXA-24R	TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT		
OXA-58F	CGA TCA GAA TGT TCA AGC GC	OXA 58	528	
OXA-58R	ACG ATT CTC CCC TCT GCG C			

Abbreviation: F, forward; R, reverse.

Table 2. Biochemical characteristics of the isolates identified by Vitek kit

Characteristic	<i>P. aeruginosa</i> (n=29)	<i>P. putida</i> (n=2)	<i>A. baumannii</i> (n=21)	<i>E. hormaechei</i> (n=2)
TSI (Slant/Bottom)	K/K	K/K	K/K	A/AG
Sulfide production	-	-	-	-
Indol production	-	-	-	-
Motility	+	+	-	+
MR	-	-	-	-
VP	-	-	-	+
Citrate utilization	+	+	v ^a	+
Oxidase	+	+	-	-

Abbreviation : TSI, triple sugar iron; SIM, sulfide indol motility; MR, methyl red; VP, Vogas-Proskauer; K, alkaline; A, acidic; AG acidic and gas.

+, Positive; -, negative; v, variable (10-90% positive).

^aThree strains are positive.

나 있다. *Pseudomonas* spp. 2균주는 16S rRNA 유전자와 *gyrB* 유전자의 염기서열 분석을 이용한 계통분류학적 분석에 의해 *P. putida*으로 동정 되었다(Fig. 3). 그러나 *Enterobacter cloacae* 2균주는 유전자 염기서열 분석 결과 *E. hormaechei*으로 동정되었다. 나머지 균주는 전통적인 생화학적 검사 및 Vitek 32 검사와 16S rRNA 및 *gyrB* 유전자 염기서열 분석과 동일하게 동정되었다.

MBL생성 검증

Imipenem 내성 균주가 MBL을 생성하는지 여부를 알아보는 Hodge 변법 시험결과 29균주(53.7%)가 양성반응을 보였다.

고, imipenem-EDTA 상승효과시험에서는 22균주(40.7%)가 양성반응을 보였다. Imipenem-EDTA 상승효과시험에 양성인 균주는 모두 Hodge 변법 시험결과에서 양성 반응을 나타냈다 (Table 3). 따라서 MBL 를 생성하는 균주는 22균주로 *A. baumannii* 12균주와, *P. aeruginosa* 7균주, *P. putida* 2균주 그리고 *E. hormaechei* 1균주가 속했다.

PCR을 통한 β -lactamase 유형 분석

Class A β -lactamase 인 SHV-1 와 유도체 유전자는 *P. aeruginosa* 2균주에서 검출되었다. Class B β -lactamase (MBL) 중 IMP 유전자는 *A. baumannii* 11균주와 *Enterobacter hormaechei*

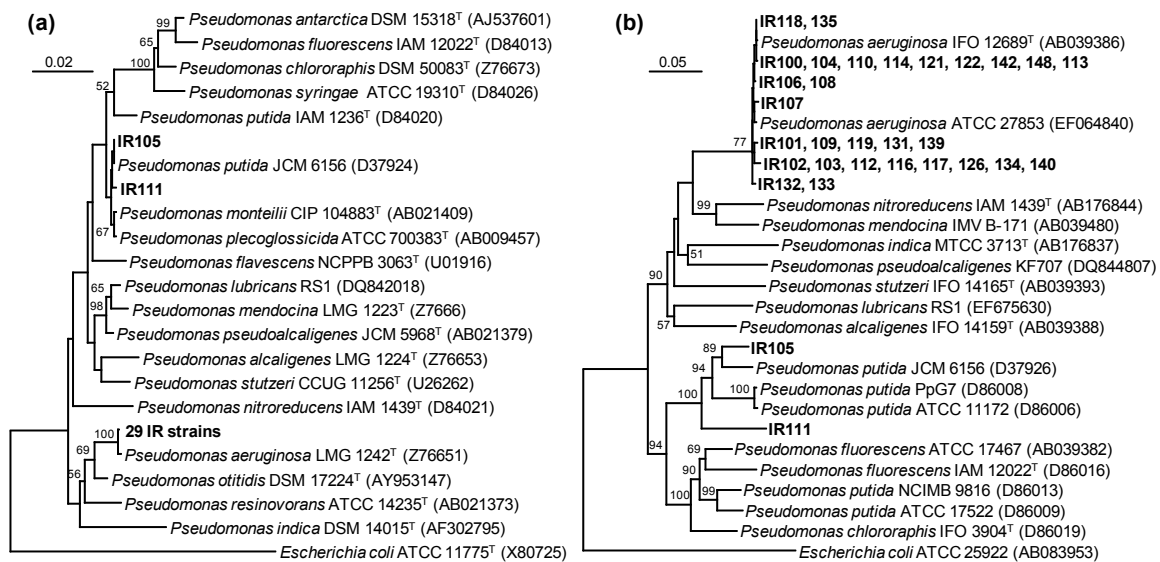


Fig. 3. Neighbor-joining trees based on partial 16S rRNA gene (a) and *gyrB* gene (b) sequences showing relationships between clinical isolates and genus of the *Pseudomonas*. The percentage at the nodes are the levels of bootstrap support >50% based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets. The sequence of *Escherichia coli* ATCC 11775^T (X80725) was used as an outgroup. Bar, 0.02 and 0.05 nucleotide substitution per position.

Table 3. Detection of metallo β -lactamase and genotypes of β -lactamases in clinical isolates

Scientific name	Numbers	Genotype of β -lactamase				Hodge & IPM-EDTA synergy	
		Class A		Class B			Class D ^a OXA
		SHV-1 & derivative		IMP	VIM		
<i>A. baumannii</i>	21			11 (5) ^b	1	14 (5) ^b	12 (12) ^c
<i>E. hormaechei</i>	2			1 (1) ^b		2 (1) ^b	1 (1) ^c
<i>P. aeruginosa</i>	29	2 (1) ^b		1	6 (6) ^b	27 (7) ^b	14 (7) ^c
<i>P. putida</i>	2				2		2 (2) ^c
Total	54	2 (1) ^b		13 (6) ^b	9 (6) ^b	40 (13) ^b	29 (22) ^c

^aClass D : OXA- 1, 2, 10, 23, 24, 25, 26, 40, 72, 58.

^bNumbers of combined genotypes were expressed in parentheses.

^cNumbers of positive results both in two tests were expressed in parentheses.

및 *P. aeruginosa* 각각 1균주씩에서 검출되었다. VIM 유전자는 *P. aeruginosa* 6균주와 *P. putida* 2균주 그리고 *A. baumannii* 1균주에서 검출되었다. Class D β -lactamase인 OXA-1, OXA-2, OXA-10과 OXA-23 유전자는 각각 25균주, 20균주, 5균주 그리고 2균주에서 검출되었다. 6개 균주에서는 2종류 이상의 OXA 유전자형이 검출 되었으며, 13개의 균주에서는 class A나 class B 유전자형과 OXA 유전자가 동시에 검출되었다(Table 3).

항생제 감수성

Ampicillin, cefmetazole, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam 등 광범위한 β -lactam 항생제에 대한 내성을 지닌 분리 균주의 비율이 각각 100%, 100%, 92.6%, 92.6%, 66.7%, 74.0% 및 59.3% 였다. β -Lactamase 억제제가 혼합된 ticarcillin/clavulanic acid에 대한 내성 균주의 비율도 85.2%로 높았다. Quinolone 계열의 ciprofloxacin에 대해서도 85.2%의 균주가 내성을 보였으며, amikacin, gentamicin 등 aminoglycoside 계열의 항생제에 대한 내성 균주 비율은 44.4% 및 77.8%로 나타났다. 그러나 colistin에 대해서는 모든

균주가 감수성을 나타냈다(Table 4). *A. baumannii* 균주들은 *P. aeruginosa* 균주들에는 비해 cefepime, ceftazidime, aztreonam 과 gentamicin에 대한 내성 비율이 높았다. *A. baumannii* 균주들은 MBL 유전자 보유 여부가 amikacin에 대한 내성율에서만 차이가 나타났을 뿐 다른 항생제에 대해서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 그러나 *P. aeruginosa* 의 경우 MBL 유전자 보유 균주들이 다른 class 의 유전자 보유 균주들에 비해 ceftazidime, cefepime, aztreonam 등 광범위한 β -lactam 항생제에 대한 내성율이 높았다. 특히 MBL 유전자를 보유한 *P. putida* 2균주는 amikacin과 colistin을 제외한 모든 시험 항생제에 대해 내성을 나타냈다.

고 찰

지금까지 보고된 β -lactamase 생성과 항생제 내성에 관한 연구는 대부분 단일 균종에 대한 연구가 주로 많이 있었다. 본 연구에서는 비교적 다양한 균종을 대상으로 연구를 진행 하였으며 carbapenem의 대표적 제제인 imipenem에 내성을

Table 4. Rate of antibiotic resistant clinical isolates

Antibiotic/Species	<i>A. baumannii</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>P. putida</i>	<i>E. hormaechei</i>			Total (n=54)	
	MBL (n=12)	D ^a (n=9)	Total	A ^b (n=2)	MBL (n=7)	D (n=20)	Total	MBL (n=2)	MBL (n=1)	D (n=1)		
Ampicillin	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Ceftriaxone	100.0	100.0	100.0	100.0	85.7	85.0	86.2	100.0	100.0	100.0	100.0	92.6
Cefmetazole	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Cefotaxime	100.0	100.0	100.0	50.0	100.0	85.0	86.2	100.0	100.0	100.0	100.0	92.6
Ceftazidime	100.0	100.0	100.0	0.0	85.7	25.0	37.9	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7
Cefepime	100.0	100.0	100.0	50.0	85.7	45.0	55.2	100.0	100.0	0.0	50.0	74.0
Aztreonam	83.3	77.8	81.0	0.0	71.4	30.0	37.9	100.0	100.0	100.0	100.0	59.3
Ticarcillin/clavulanic acid	100.0	100.0	100.0	50.0	85.7	75.0	75.9	100.0	100.0	100.0	100.0	87.0
Ciprofloxacin	83.3	100.0	100.0	50.0	85.7	75.0	75.9	100.0	100.0	0.0	50.0	85.2
Amikacin	58.3	33.3	47.6	50.0	85.7	30.0	44.8	50.0	0.0	0.0	0.0	44.4
Gentamicin	83.3	100.0	90.5	100.0	85.7	60.0	69.0	100.0	100.0	0.0	50.0	77.8
Colistin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^aD: OXA-1, 2, 10, 23, 24, 25, 26, 40, 72, 58.

^bA: SHV-1 & derivative.

가진 54균주를 실험에 사용했다.

Class A와 D에 속하는 carbapenemase는 serine carbapenemase로서 carbapenem의 가수분해 능력이 미약하다고 알려져 있다[24]. 본 실험에서 2개의 *Pseudomonas aeruginosa* 균주만이 class A에 속한 SHV 유전자형을 갖고 있었다. 이 중 1개 균주는 class D에 속한 OXA 유전자형을 동시에 가지고 있었으며 SHV 유전자형만 보유한 1개의 균주(IR108)는 aztreonam, cefepime, ciprofloxacin, cefotaxime, ceftazidime, ticarcillin/clavulanic acid, amikacin, colistin에 대해 감수성을 보였다. 한편 40균주는 class D에 속한 OXA 유전자형을 가지고 있었으며 이 중 13균주는 class B 유전자를, 1개 균주는 class A 유전자를 동시에 가지고 있었다. 따라서 OXA 형 유전자만을 보유한 균주는 27개였다.

MBL 유전자 보유 여부가 항생제에 대한 내성빈도와 연관성은 *A. baumannii* 균주에서는 aminoglycoside 계통의 항생제인 amikacin에서만 나타났을 뿐 β -lactam 항생제에서는 차이가 나타나지 않았다. *A. baumannii* 균주에 비해 항생제에 대한 내성율이 낮은 *P. aeruginosa*에서는 MBL 생성 균주들이 다른 class의 유전자를 보유한 균주들에 비해 광범위한 β -lactam 항생제에 대한 내성율이 높았다. *P. putida*와 *E. hormaechei*의 경우 시험 균주 수가 적어 비교하기 어려웠다.

Imipenem 내성 균주 중 22균주가 Hodge 변법, imipenem-EDTA 상승효과 시험 그리고 유전자형 검사에 의해 MBL 유전자(VIM 또는 IMP)를 보유하고 있음을 확인하였다. 한편 국내 병원에서 분리한 imipenem 내성 균주의 β -lactamase 유전형의 출현빈도는 다음과 같다. 2000-2001년 까지 분리된 *A. baumannii*는 267균주 중 38(1.2%), 그리고 *Pseudomonas* 속 387균주 중 44(11.4%; *P. aeruginosa* 42균주, *P. putida* 2균주)만이 MBL을 보유하고 있었다[13]. 2004년에 분리된 *A. baumannii*의 경우 9균주 중 2(22.2%) 균주만이 MBL을 보유하고 있으며 7개는 OXA 형을 보유하고 있었다[8]. 한편 MBL 생성 균주에서도 IMP형을 보유하고 있는 균주는 2000년까지는 1개의 *P. aeruginosa*와 *A. baumannii* 3균주만이 분리되었으며 대부분 VIM 형이 분리된다고 하였다[13]. 본 실험에서 사용한 균주는 2007년 3월부터 1년간 분리된 균주를 사용하였다. Imipenem에 내성 균주 중 MBL 생성균의 비율이 40.7%에 이르며 특히 *A. baumannii* 균주는 54.6%에 달했다. 특히 1개 균주를 제외한 11개 균주는 IMP 형의 MBL을 생성하고 있음을 확인하였다. 기존의 결과와 비교할 경우 MBL을 생성하는 imipenem 내성 *P. aeruginosa*와 *A. baumannii* 균주의 분리 빈도가 높아지는 현상 외에 점차 MBL생성 균주 또한 분리율이 높아지고 있으며 점차 IMP 형 MBL 생성 균주의 출현이 증가하고 있음을 확인하였다.

References

- Baik, K. S. 2005. Prokaryotic Diversity of Woopo Wetland Estimated by Phylogenetic Analysis. Ph. D. Thesis. Sunchon National University. Korea.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt, and T. R. Walsh. 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{CIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4654-4661.
- CLSI. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th edn. Approved Standard M2-A8. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R- factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 2110-2114.
- Crespo, M. P., N. Woodford, A. Sinclair, M. E. Kaufmann, J. Turton, J. Glover, J. D. Velez, C. R. Castaneda, M. Recalde, and D. M. Livermore. 2004. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*s Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamas, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5094-5101.
- Edwards, J. R., P. J. Turner, and C. Wannop. 1989. *In vitro* antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotics with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 215-222.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Jeong, S. H., K. Lee, Y. Chong, J. H. Yum, S. H. Lee, H. J. Choi, Y. M. Kim, K. H. Park, B. H. Han, S. W. Lee, and T. S. Jeong. 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassettes, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 397-400.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kim, I. S., W. I. Oh, J. H. Song, and N. Y. Lee. 2004. Screening and identification of metallo- β -lactamase gene in clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J. Lab. Med.* **24**, 177-182.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)* **178**, 703.
- Lauretto, L., M. I. Ricco, A. Mazzriol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and M. Rossolini. 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene form a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1584-1590.
- Lee, K., W. G. Lee, Y. Uh, G. Y. Ha, J. Cho, Y. Chong, and the Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. 2003. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 868-871.
- Lee, K., J. H. Yum, D. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and Y. Chong. 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4485-4491.
- Lee, S., Y. J. Park, M. Kim, H. K. Lee, K. Han, C. S. Kang,

- and M. W. Kang. 2005. Prevalence of Ambler class A and D β -lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 122-127.
16. Livingstone, D., M. J. Gill, R. Wise. 1995. Mechanism of resistance to the carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 1-5.
 17. Paton, R., R. S. Miles, J. Hood, S. G. Amyes, R. S. Miles, and S. G. Amyes. 1993. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2**, 81-87.
 18. Pourmaras, S., A. Tsakris, M. Maniati, L. S. Tzouveleakis, and A. N. Maniatis. 2002. Novel variant (*bla*_{VIM-4}) of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 4026-4028.
 19. Quinn, J. P., E. J. Dudek, C. A. DiVincenzo, D. A. Lucks, and S. A. Lerner. 1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **154**, 289-294.
 20. Rasmussen, B. A., Y. Gluzman, and E. P. Tally. 1990. Cloning and sequencing of the class B β -lactamases gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1590-1592.
 21. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
 22. Smibert, R. M. and N. R. Krieg. 1994. General characterization. *In Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gebhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
 23. Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 673-679.
 24. Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 306-325.
 25. Yamamoto, S. and S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1104-1109.

초록 : Carbapenemase를 생산하는 imipenem 내성 세균의 특성 및 항생제 감수성

최한나¹ · 박 철^{1,2} · 김형락^{1,2} · 백근식¹ · 김세나^{1,3} · 성치남^{1*}

(¹순천대학교 생물학과, ²성가롤로병원 진단검사의학과, ³한국기초과학지원연구원 순천센터)

대한민국 순천의 병원 입원 환자의 검체로부터 imipenem 내성 세균을 분리하였다. 54개의 분리균을 16S rRNA 유전자와 *gyrB* 유전자 염기서열 비교를 기초로 하여 계통분류학적으로 동정하였다. 분리균들은 *Pseudomonas aeruginosa* (30균주; 55.6%), *Acinetobacter baumannii* (21; 38.9%), *Enterobacter hormaechei* (2)와 *Pseudomonas putida* (2)에 속했다. 22개의 균주가 metallo- β -lactamase (MBL)를 생산하였으며 종별 구성은 다음과 같다; *Acinetobacter baumannii* 12균주, *Pseudomonas aeruginosa* 7균주, *P. putida* 2균주 그리고 *Enterobacter hormaechei* 1균주. 분리균들의 항생제 감수성은 디스크 확산법과 Vitek 을 이용하여 조사하였다. IMP 와 VIM 형의 metallo- β -lactamase를 생산하는 균주들은 OXA 와 SHV 형 β -lactamase를 생산하는 균주들에 비해 ceftazidime, aztreonam, amikacin과 gentamicin에 대한 내성율이 높았다.