

Prevalence of Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing OXA-23-like from a University Hospital in Gangwon Province, Korea

In Ho Jang^{1,2§}, Gyusang Lee^{3§}, Il Choi¹, Young Uh², Sa-Hyun Kim³, Min Park³,
Hyun-Jun Woo³, Yeonim Choi³ and Jong Bae Kim^{3,†}

¹Department of Animal Science and Technology, College of Life Science & Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

²Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Acinetobacter infections are of great concern in clinical settings because of multi-drug resistance (MDR) and high mortality of the infected patients. The MDR *Acinetobacter baumannii* has emerged as a significant infectious agent in hospitals worldwide. The purpose of this study was to determine for molecular characterization of MDR *A. baumannii* clinical isolates obtained from the Wonju Christian Hospital in Gangwon province of Korea. A total of seventy non-duplicate *A. baumannii* isolates were collected from the Wonju Christian Hospital in Korea from March to April in 2011. All of the MDR *A. baumannii* isolates were encoded by *bla*_{OXA-23-like} gene and all isolates with the *bla*_{OXA-23-like} gene had the upstream element *ISAbal* to promote increased gene expression and subsequent resistance to carbapenem. 16S rRNA methylase gene (*armA*) was detected in 44 clinical isolates which were resistant to amikacin, and phosphotransferase genes encoding *aac(3)-Ia* and *aac(6')-Ib* were the most prevalent. A combination of 16S rRNA methylase and aminoglycoside-modifying enzyme genes (*armA*, *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib*, and *aph(3')-Ia*) were found in 31 isolates. The sequencing results for the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* revealed the presence of Ser (TCA) 83 Leu (TTA) and Ser (TCG) 80 Leu (TTG) substitutions in the respective enzymes for all MDR. Molecular typing for MDR *A. baumannii* could be helpful in confirming the identification of a common source or cross-contamination. This is an important step in enabling epidemiological tracing of these strains.

Key Words: Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, *bla*_{OXA-23-like}, *ISAbal*, 16S rRNA methylase gene, Aminoglycoside-modifying enzyme, Quinolone resistance-determining region

병원 내 감염증을 유발하는 *Acinetobacter baumannii*는 최근 carbapenem에 내성을 나타내는 분리 빈도가 국내외에서 높게 보고되고 있다. 최근에는 carbapenem 내성 *A. baumannii*의 감염치료에 사용되는 colistin을 제외한 모든 항균제에 내성을 가지는 임상분리주가 우리나라에서도 보고되고 있으며, 이러한 다약제 내성균들을 extremely-

resistant (XDR) *A. baumannii*로 부르기도 한다 (Park et al., 2010). *A. baumannii*가 보유하고 있는 carbapenem 내성유전자의 분포는 지역적으로 큰 차이가 있으므로 이들 carbapenem 내성유전자의 분포 조사는 *A. baumannii*의 역학 조사 및 carbapenem 내성의 특성연구에 필수적이다 (Pelig et al., 2008). 따라서 본 연구에서는 강원도 원주시 소재의 원주기독병원 진단검사의학과 미생물검사실에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 imipenem 내성 *A. baumannii*를 선별하여 대표적인 치료용 항균제인 β -lactam, aminoglycoside, 그리고 quinolone 계통에 대한 내성기전을 조사하였다.

2011년 3월부터 4월까지 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*를 대상으로 균주 동정과 항균제 감수성 검사

*Received: 12 March, 2012 / Revised: 30 March, 2012
Accepted: 30 March, 2012

§In Ho Jang and Gyusang Lee contributed equally to this work.

†Corresponding author: Jong Bae Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju-si, Gangwon-do 220-710, Korea.
Tel: 82-33-760-2423, Fax: 82-33-760-2561
e-mail: kimjb70@yonsei.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

결과를 바탕으로 70주의 imipenem 내성 *A. baumannii*를 선별하여 본 실험에 사용하였다. 임상검체별로는 객담 (n=62), 흡인관끝 (n=3), 혈액 (n=2), 기관지세척액 (n=1), 가슴관끝 (n=1), 카테터끝 (n=1)으로 대부분 객담이었다. 임상검체에서 분리된 세균의 동정은 microplate method (Uh et al., 2002)를 사용하였고, 혈액인 경우에는 MicroScan® (Siemens Healthcare Diagnostics, Sacramento, CA, USA) COMBO (NC44)으로 동정하였다. 균종의 유전종 (genomic species)은 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) 기법 (Dijkshoorn et al., 1998)을 사용하여 *A. baumannii*를 확인하였다. 선별된 *A. baumannii*의 imipenem 내성 및 각종 항균제에 대한 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2011)의 기준에 따라 시행하였다. 항균제 감수성 시험 결과, 70주의 imipenem 내성 *A. baumannii* 균주는 ceftazidime, levofloxacin, meropenem, piperacillin, piperacillin/tazobactam에 모두 내성을 나타내었다. 또한, gentamicin에 69주 (98%), cefepime, trimethoprim-sulfamethoxazole, tobramycin 68주 (97%), aztreonam 61주 (87%), amikacin 45주 (64%), cefoperazone-sulbactam 36주 (51%)에서 내성을 나타내었으며, colistin에는 모두 감수성이었다. 감수성 시험 결과 β -lactam계 항균제와 quinolone계 항균제에는 모든 임상분리주가 내성이었다.

Imipenem 내성 *A. baumannii*에 대한 carbapenemase의 활성을 검사하기 위하여 modified Hodge test (Lee et al., 2007)와 imipenem-EDTA disk synergy test를 시행한 결과 모든 시험대상 세균이 modified Hodge test에 양성을 나타내었으나 imipenem-EDTA disk synergy test에 음성을 나타내어 class D형의 β -lactamase인 oxacilinase를 생성하는 것을 확인되었다.

Class D type의 β -lactamase를 확인하기 위하여 *bla*_{OXA-23-like},

*bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, 그리고 *bla*_{OXA-58-like}을 동시에 검출할 수 있는 다중중합효소연쇄반응 (Woodford et al., 2006)을 실시한 결과 모든 임상분리 균주에서 *bla*_{OXA-23-like}과 *bla*_{OXA-51-like}가 검출되었다 (Table 1). Carbapenemase 유전자의 발현을 조절하는 촉진자 (promotor)가 존재하는 IS*Aba1*의 유무를 PCR (Turton et al., 2006)로 확인한 결과 모든 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 IS*Aba1*이 확인되었다. IS*Aba1* 양성 균주는 IS*Aba1* 증폭용 upstream primer와 각각의 내성유전자의 downstream primer를 사용하여 증폭한 결과 *bla*_{OXA-23-like} 유전자를 가지고 있는 모든 imipenem 내성 *A. baumannii*에서 *bla*_{OXA-23-like} 유전자의 upstream에 IS*Aba1*이 존재하는 것으로 확인되었다 (Table 1).

Acinetobacter spp.의 quinolone계 항균제에 대한 내성은 DNA gyrase (GyrA)와 topoisomerase IV (ParC)의 subunit A의 돌연변이에 의하여 야기된다. 가장 대표적인 돌연변이는 quinolone resistance-determining region (QRDR)의 GyrA의 83번째와 ParC의 80번째 codon으로 알려져 있다 (Peleg et al., 2008). QRDR 부분을 PCR로 증폭하여 PCR 산물을 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰한 결과 GyrA의 경우 83번 코돈인 serine (TCA)이 leucine (TTA)으로 치환된 것을 확인할 수 있었고, ParC의 경우 80번 코돈인 serine (TCG)이 leucine (TTG)으로 치환된 것을 확인할 수 있었다 (Table 1). 이상의 결과를 통하여 본 실험에 사용된 quinolone계 항균제인 levofloxacin에 대한 내성은 *gyrA*와 *parC* 유전자의 점 돌연변이로 인하여 내성이 야기되는 것을 확인할 수 있었다. 충청지역의 대학병원에서 분리된 *A. baumannii*의 경우 GyrA의 83번째 코돈인 Ser과 ParC의 80번과 84번 코돈의 변화가 보고된 바 있다 (Koo et al., 2010). ParC의 경우는 본 연구에서 확인된 80번 코돈의 치환과 동일하지만, 84번 코돈

Table 1. Distribution of resistance patterns in imipenem resistant *A. baumannii* (n=70)

Resistance pattern according to antimicrobial agents					
β -lactam		Aminoglycoside		Quinolone	
Genotype	No. (%)	Genotype	No. (%)	Genotype	No. (%)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	70 (100.0)	<i>armA</i>	44 (62.8)	<i>gyrA</i> Ser 83 to Leu	70 (100.0)
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	70 (100.0)	<i>aac(3)-Ia</i>	31 (44.3)		
<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	70 (100.0)	<i>aac(6')-Ib</i>	31 (44.3)		
IS <i>Aba1</i> / <i>bla</i> _{OXA-23-like}	70 (100.0)	<i>aph(3')-Ia</i>	14 (20.0)	<i>parC</i> Ser 80 to Leu	70 (100.0)
		<i>aac(3)-Ia/aac(6')-Ib</i>	31 (44.3)		
		<i>aac(3)-Ia/aac(6')-Ib/aph(3')-Ia</i>	14 (20.0)		
		<i>armA/aac(3)-Ia/aac(6')-Ib/aph(3')-Ia</i>	14 (20.0)		

의 치환은 확인되지 않은 것으로 보아 국내에서도 내성 유전자를 통한 유전자 치환이 지역적인 차이가 있는 것으로 여겨진다.

Aminoglycoside계 항균제에 대한 내성기전 중 16S rRNA methylase에 의한 post-transcriptional rRNA methylation과 aminoglycoside-modifying enzyme (AME)의 존재는 중요한 내성기전 중 하나이다 (Peleg et al., 2008). PCR로 aminoglycoside계 항균제에 대한 내성유전자를 조사한 결과, amikacin 내성을 나타내는 45주 중 44주에서 *armA* 유전자가 검출되었으나 (Table 1), *rmtA*, *rmtB* 그리고 *rmtC* 유전자는 검출되지 않았다. AME 유전자들에 대한 다중 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 총 31주에서 *aac(3)-Ia*와 *aac(6)-Ib*가 확인되었고, 이 중 14주에서 *aac(3)-Ia*, *aac(6)-Ib*와 *aph(3)-Ia* 유전자가 확인되었다. 이들 AME 유전자를 가지는 31주들은 모두 16S rRNA methylase인 *armA* 유전자들을 동시에 보유하고 있는 것으로 확인되었다 (Table 1). 2005년 국내의 보고 (Cho et al., 2009)에 따르면 *aac(3)-Ia*, *aac(6)-Ib*, *ant(3)-Ia*, *aph(3)-Ia* 그리고 *aph(3)-VI* 등의 유전자가 *A. baumannii*에서 검출되었다. 또한 nucleotidyltransferase [*ant(2)-Ia*와 *ant(3)-Ia*]가 보고되었으나, 본 연구에서는 검출되지 않은 것으로 보아 강원도 원주지역에서는 아직 nucleotidyltransferase를 생성하는 *A. baumannii*가 만연하지 않은 것으로 여겨진다.

2004년 국내 항균제 내성에 관한 조사에 따르면 imipenem에 내성을 나타내는 *Acinetobacter* spp.는 7번째로 높은 비율을 보였다 (Lee et al., 2009). 특히 내성률은 2001년 5%에서 2004년 17%로 높은 비율로 증가하였으며, 이러한 내성률의 증가는 19%에서 24%의 증가율을 보이는 *Pseudomonas aeruginosa*보다 더 극적인 증가율을 보였다. 또한 최근 충청지역의 대학병원에서 분리된 다약제 내성 *A. baumannii*는 OXA-23 carbapenemase 유전자를 가지는 것으로 보고되었다 (Park et al., 2010). 본 연구에서 확인된 imipenem 내성 *A. baumannii* 역시 OXA-23 carbapenemase를 생산하며, β -lactam계 뿐만 아니라 quinolone계 항균제에도 모두 내성을 나타내었다. 이렇듯 국내에서 분리되는 *A. baumannii*의 carbapenem 내성은 대부분 OXA-23 β -lactamase의 생산에 의한 것이다. 그러나 *bla*_{OXA-23} 유전자의 발현에 의한 carbapenem 내성의 확산이 *bla*_{OXA-23} 유전자의 수평적 전달 (horizontal transfer)에 의한 것인지 *bla*_{OXA-23} 유전자를 보유한 세균의 클론 확산 (clonal spread)에 의한 것인지는 불분명하다. 따라서 *bla*_{OXA-23} 유전자의 확산기전을 규명하기 위해서는 각 지

역별로 분리되는 imipenem 내성 *A. baumannii*를 대상으로 pulse field gel electrophoresis나 multilocus sequence typing 등의 분자생물학적 방법을 이용한 역학 조사 등의 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (PJ907017042012)의 지원을 받아 수행하였습니다.

REFERENCES

- Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009. 64: 185-190.
- Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol*. 1998. 21: 33-39.
- Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. *Korean J Lab Med*. 2010. 30: 498-506.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2007. 7: 88-91.
- Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH, Yong D, Chong Y, Woodford N, Livermore DM, KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2009. 33: 520-524.
- Park YS, Lee H, Lee KS, Hwang SS, Cho YK, Kim HY, Uh Y, Chin BS, Han SH, Jeong SH, Lee K, Kim JM. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multi-centre study. *Int J Antimicrob Agents*. 2010. 36: 430-435.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008. 21: 538-582.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*.

FEMS Microbiol Lett. 2006. 258: 72-77.

Uh Y, Cho HM, Jang IH, Yoon KJ, Seo DM. Identification system of nonfermentative gram negative bacilli using microplate.

Korean J Clin Microbiol. 2002. 5: 26-34.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME,

Brown S, Amyes SG, Livermoore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents. 2006. 27: 351-353.
