ORIGINAL ARTICLE

Korean J Clin Lab Sci. 2013, 45(1):21-25
ISSN 1738-3544

KJCLS
KOREAN JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY SCIENCE

Errors of Antibiotic Susceptibility Testing from Automated and Manual Systems in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*

Ji Youn Sung, Ji-Eun Oh, and Eun Sun Kim

Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong 369-700, Korea

Acinetobacter baumannii is an aerobic, gram-negative and glucose-non-fermenting bacterium, which has emerged as a serious opportunistic pathogen. Many clinical microbiology laboratories use the Vitek 2 system for the routine antimicrobial susceptibility testing process, including testing on *A. baumannii* isolates. However, in case of amikacin, it is now recommended to perform additional antimicrobial susceptibility testing for *A. baumannii* strains due to the relatively lower minimum inhibitory concentration (MIC) in the Vitek 2 system compared to conventional reference methods. In our study, we assessed MIC for amikacin susceptibility testing of *A. baumannii* isolates in the Vitek 2 system, the agar dilution, Etest, and disk diffusion method. We collected 40 gentamicin-resistant, *A. baumannii* strains (amikacin MIC by Vitek 2: ≤2 μg/mL, 2 isolates; 4 μg/mL, 34 isolates; 8 μg/mL, 4 isolates) from a University hospital and compared the Vitek 2 system to other reference methods for testing susceptibility to amikacin. The Vitek 2 system showed major errors in all of the 40 isolates, yielding a low MIC. The results of our study strongly suggested that the Vitek 2 system was not a reliable method to test the MICs of gentamicin; ranging from ≥ 16 μg/mL for amikacin susceptibility. Other tests, such as agar dilution, Etest, or disk diffusion methods, should be paralleled to determine the MIC of amikacin in *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Amikacin, Agar dilution, Etest

Corresponding author: Ji Youn Sung
Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Wangjang-ri, Gamgok-myeon, Eumseong-gun, Chungbuk 369-700, Korea.
Tel: 82-43-879-3668
E-mail: azaza72@naver.com

Received: January 29, 2013
Revised: February 7, 2013
Accepted: March 13, 2013

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서 론

광범위 항균제의 사용이 늘어나면서 세균의 항균제에 대한 내성은 점차 증가하여 전세계적으로 문제가 되고 있다. 또한 다제내성을 보이는 그람음성간균의 유병률이 높아지고 있는데 그 대표적인 예가 *Acinetobacter baumannii*이다(D'Agata, 2004; Kim과 Lee, 2008; Koo 등, 2010). 이 세균은 호기성의 포도당 비발효 그람음성 구간균으로 자연과 병원 환경에 광범위하게 분포하고 있으며 외이도염, 골수염, 뇌수막염, 심내막염, 폐렴, 요로감염 및 균혈증 등 다양한 유형의 감염증을 유발한다(Srinivasan 등, 2009). 또한 *Pseudomonas aeruginosa*에 이어 두 번째로 흔한 병원감염균으로 여러 항균제에 대해 내재성 혹은 획득내성을 지니고 있기 때문에 이 세균에 의한 감염증의 치료는 쉽지 않다(Bergogne-Berezin과 Towner, 1996). 일반적으로 *A. baumannii*는 cephalosporin, aminoglycoside, fluoroquinolone 그리고 monobactam 등으로 치료를 하는데 이 중 aminoglycoside는 다소간의 신독성과 이독성이 있지만 항세균 작용이 빠르고 살균성으로 작용하여 여러 감염치료에 널리 쓰이고 있다.

국내 많은 임상 미생물 검사실에서는 배양검사가 의뢰되는 많은 수의 검체를 적은 비용과 노동력으로 검사하면서도 신속하게 균 동정 및 항균제 감수성 결과를 얻기 위해 자동화 장비를 사용하고 있다(Foxman, 2002). 가장 보편적으로 임상 미생물 검사실에 도입하여 사용하고 있는 자동화 장비는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, PA, USA)의 참고방법과 비교하였을 때 96%의 일치율을 보이고 술식이 간단한 Vitek 2 자동화 장비(bioMérieux, Durham, NC, USA)이다(Ligozzi 등, 2002). 그러나 *A. baumannii* 균종을 대상으로 Vitek 2 자동화 장비를 이용하여 얻은 amikacin에 대한 MIC 값이 다른 항균제 감수성 검사법

에 의한 MIC (minimum inhibitory concentration) 값보다 상대적으로 낮아 결과를 보고할 때 확인검사가 필요하다고 보고되고 있다(Hsieh 등, 2009). 또한 Vitek 2 자동화 장비 제조사에서도 *A. baumannii* 균종에서 amikacin 항균제에 대해서는 다른 감수성 검사법으로 추가적인 검사를 하여 결과를 확인 후 보고하도록 요구하고 있다.

감염증을 항균제로 치료할 때 그 효과에 영향을 주는 주된 요인은 감염세균의 항균제에 대한 감수성, 항균제의 특성 및 환자의 방어력 3가지이다. 따라서 시험관 내에서 이루어지는 항균제 감수성 검사는 감염치료에 가장 유효한 항균제를 알아내기 위한 것으로 매우 중요한 검사라 할 수 있다. 그러나 환자를 치료시 항균제 감수성 시험 결과에서 감수성으로 나온 항균제를 치료제로 사용했는데도 치료에 실패한 예들이 보고되고 있어 검사결과의 정확도를 높일 필요성이 부각되고 있다(Fiebelkorn 등, 2003). 이에 저자들은 *A. baumannii* 균종을 대상으로 항균제 감수성 검사를 시행했을 때 검사법 간의 불일치율이 가장 높은 것으로 보고되고 있는 amikacin에 대하여, Vitek 2 자동화 장비에 의한 항균제 감수성 검사 결과와 한천 희석법, Etest 및 디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 검사 결과를 비교하여 신빙성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2010년 3월부터 2011년 5월까지의 기간 동안 대전에 위치한 한 개의 대학병원에서 분리된 *A. baumannii* 균주 중 Vitek 2 자동화 장비를 이용하여 항균제 감수성 검사를 한 결과 gentamicin에는 내성을 보였으나 amikacin에는 감수성을 보인 균주를 대상으로 하였다. 균주는 객담, 혈액, 농, 각종 도말 및 체액 검체에서 분리되었다. 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위 내에 있는지를 확인하였다. 대상 균주들은 -70°C에서 냉동 보관하였다가 계대배양하여 사용하였다.

2. 균의 동정

Vitek 2 자동화 장비에서 *A. baumannii* 로 동정된 균주를 대상으로 *rpoB* 유전자 분석을 시행하여 *A. baumannii* 임을 확인하였다. *rpoB* 유전자를 증폭시키기 위해 Ac1055F (5'-GTGATAARATGGCBGGTCGT-3') 및 Ac1598R (5'-CGBGCRTGCATYTTGTCRT-3')를 시발체로 하여 중합효소연쇄반응과 염기서열분석을 시행하였다(Ko 등, 2007). DNA 추출액 (5 μL), 10× Taq buffer (2.5 μL), 10 mM dNTP mix (0.5 μL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (SolGent, Daejeon, Korea) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 μL의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT., USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 20초, 52°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (SolGent)로 분리 후, BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

3. 항균제 감수성 검사

1) Vitek 2 자동화 장비에 의한 항균제 감수성 검사

혈액한천배지에서 2회 계대배양된 대상 균 집락을 Tryptic soy broth (Difco, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 0.5 McFarland 탁도로 맞추어 준비하였다. 대상 균 부유액을 포도당 비발효 그람음성 막대균을 위한 AST N132 카드에 넣고 제조사의 지침대로 검사를 수행하였다.

2) 한천 희석법을 이용한 항균제 감수성 검사

CLSI에서 제시한 한천 희석법으로 amikacin 과 gentamicin에 대한 MIC를 측정하였다(CLSI, 2010). 시험균주 10^4 colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.5-256 μg/mL 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, PA, USA)로 접종하였다. 37°C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다.

3) 디스크 확산법 및 Etest를 이용한 항균제 감수성 검사

CLSI 지침에 따라 amikacin과 gentamicin에 대한 감수성을 디스크 확산법과 Etest로 확인하였다(CLSI, 2010). Vitek 2 자동화 장비로 검사하기 위하여 제조한 균 부유액을 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 면봉을 사용하여 접종한 후 항균제 디스크(BBL, Cockeysville, MI, USA) 및 Etest strip (AB Biodisk, Solna, Sweden)을 올려놓고 35°C 항온기에 18시간 동안 배양한 후 제조사의 지침에 따라 억제대의 직경 및 대상 균주의 MIC를 측정하였다.

결 과

1. 균의 동정

Vitek 2 자동화 장비에서 *A. baumannii*로 동정되고 gentamicin

에 내성 그리고 amikacin에 감수성을 보인 63균주를 대상으로 *rpoB* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 40주가 *A. baumannii*로 확인되었다.

2. 항균제 감수성 검사법간의 비교

1) Amikacin에 대한 항균제 감수성 검사 결과

Vitek 2 자동화 장비에 의한 항균제 감수성 검사 결과 40균주 모두 amikacin에 대해 감수성인 것으로 나타났으며 MIC가 4 μg/mL인 균주가 34주로 가장 많았다(Table 1). 그러나 이들 40균주는 한천 희석법, Etest 및 디스크 확산법에서 모두 내성으로 판정되었다. 대상 균주 모두 한천 희석법에서는 MIC가 512 μg/mL 이상이었으며, Etest에서는 MIC가 256 μg/mL 이상인 것으로 확인되었다. 디스크 확산법 결과 40균주 중 한 균주를 제외한 39균주가 7 mm 이하의 억제대를 보였으며 나머지 한 균주도 10 mm의 억제대를 나타내 모두 내성으로 판정되었다.

2) Gentamicin에 대한 항균제 감수성 검사 결과

Gentamicin에 대한 항균제 감수성 검사 결과는 Vitek 2 자동화

Table 1. Comparison of four antibiotic susceptibility testing method for amikacin susceptibility testing of 40 gentamicin resistant *A. baumannii* isolates

Isolates	Category			
	Etest (MIC, μg/mL)	Vitek 2 (MIC, μg/mL)	Disk diffusion (mm)	Agar dilution (MIC, μg/mL)
08-4	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-14	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-15	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-16	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-20	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-22	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
08-23	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-1	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-2	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-3	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-4	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-6	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-7	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-11	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-13	R (≥256)	S (≤2)	R (≤6)	R (≥512)
09-14	R (≥256)	S (8)	R (≤6)	R (≥512)
09-16	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-17	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-18	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-21	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-25	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-26	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-29	R (≥256)	S (≤2)	R (≤6)	R (≥512)
09-30	R (≥256)	S (8)	R (≤6)	R (≥512)
09-32	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
09-33	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-1	R (≥256)	S (4)	R (7)	R (≥512)
10-2	R (≥256)	S (8)	R (10)	R (≥512)
10-3	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-4	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-5	R (≥256)	S (8)	R (≤6)	R (≥512)
10-6	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-7	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-8	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-12	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
10-13	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
11-4	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
11-16	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
11-21	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)
11-22	R (≥256)	S (4)	R (≤6)	R (≥512)

장비, 한천 희석법, Etest 및 디스크 확산법에서 모두 내성으로 판정되어 동일한 결과를 보였다. Vitek 2 자동화 장비에 의한 항균제 감수성 검사 결과 40균주 모두가 16 μg/mL 이상의 MIC 결과를 보였으며 한천 희석법과 Etest에서도 각각 512 μg/mL 이상과 256 μg/mL이상의 MIC 결과를 나타냈다. 디스크 확산법 결과 40균주 모두가 7 mm 이하의 억제대를 보여 모두 내성으로 판정되었다.

고 찰

항균제 감수성 검사는 감염균의 치료효과가 높은 항균제를 선택하는 데 도움이 되며, 주로 한천 희석법 혹은 액체배지 희석법 등으로 시행하도록 권장하고 있다. 해석기준은 균종의 MIC를 기초로 breakpoint (임계점)를 설정하여 감수성, 중간내성 혹은 내성으로 보고하고 있다. 국내에서는 미국 기준인 CLSI 기준을 이용하여 판독하고 있다(CLSI, 2010). 그러나 시간이 많이 걸리고 검사과정이 복잡한 한천 희석법이나 액체배지 희석법을 이용하여 항균제 감수성 검사를 하기는 쉽지 않다. 국내에서도 인건비 등의 이유로 자동화 장비만으로 항균제 감수성 검사를 실시하는 병원이 많을 것으로 보고 있다. 따라서 보편적으로 사용되고 있는 자동화 장비의 MIC 결과와 다른 항균제 감수성 검사법을 통해 얻은 MIC 결과의 일치율을 비교 분석하여 자동화 장비의 신뢰도를 파악하는 것은 매우 중요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 Vitek 2 자동화 장비에서 검출된 gentamicin 내성이면서 amikacin 감수성인 *A. baumannii*를 대상으로 amikacin에 대한 MIC를 한천 희석법, Etest 및 디스크 확산법으로 측정하여 그 결과를 비교하였다. 자동화 장비인 Vitek 2 자동화 장비에서 amikacin 감수성으로 판정되었던 *A. baumannii* 40균주 모두 한천 희석법과 Etest에서 각각 512 μg/mL와 256 μg/mL 이상의 MIC 값을 보였다. 디스크 확산법에서도 모두 내성으로 판정되었다. 이렇게 내성 균주를 감수성으로 보고하는 것을 very major error (VME)라고 하는데 임상 미생물 검사실에서는 절대로 범해서는 안 될 오류이다(Woo 등, 2001). 이 오류는 특정 항균제에 내성인 균주의 감염증 치료에 임상의사가 그 항균제를 사용하는 결과를 유발할 수 있으며, 이는 감염증 치료의 실패와 직결되므로 특히 주의해야 한다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 대상 균주 모두가 VME를 나타냈다. Vitek 2 자동화 장비 결과의 신빙성에 문제가 발생된 것은 여러 문헌에서도 밝혀진 바 있으며 특히 amikacin의 경우 Vitek 2 자동화 장비의 결과가 다른 항균제 감수성 검사 방법에 의한 결과보다 높은 감수성률을 보여 신뢰하기 어렵다는 보고들이 있어 왔다 (Park 등, 2009). 본 연구에서는 이전의 연구결과보다 VME의 검출율이 월등하게 높았는데 이는 균주를 선별하는 과정에서 gentamicin에 내성인 균주를 대상으로 하였기 때문으로 사료된다. 이는 gentamicin에 대한 항균제 감수성 검사 결과가 amikacin에 대한 항균제 감수성 검사 결과를 판정하는데 중요한 인자로 작용할 수 있음을 시사한다. 따라서 *A. baumannii*를 Vitek 2 자동화 장비로 항균제 감수성 검사를 했을 때 aminoglycoside 계열의 항균제인 getamicin에 내성을 보이면서 amikacin에 감수성을 보인다면 이는 VME를 의심해 보아야 한다. 그리고 반드시 다른 항균제 감수성 검사법으로 MIC 결과를 확인하고 보고해야 할 것이다.

본 연구에서는 보편적으로 사용하고 있는 Vitek 2 자동화 장비의 amikacin에 대한 MIC 결과와 다른 항균제 감수성 검사법을 통해 얻은 amikacin에 대한 MIC 결과의 일치율을 비교 분석하였다. Vitek 2 자동화 장비로 항균제 감수성 검사를 시행했을 때 gentamicin 내성이면서 amikacin 감수성인 *A. baumannii* 균주는 한천 희석법으로 다시한번 항균제의 MIC를 확인하여 보고해야 할 것이다. 그러나 한천 희석법이 복잡하고 시간이 많이 걸려 시행하기가 어렵다면, 한천 희석법의 감수성 결과와 높은 일치도를 보여주고, 검사방법이 간편한 디스크 확산법이 유용하게 사용될 수 있다고 사료된다.

참고문헌

Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996, 9:148-165.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S20. 2010, p52-53. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

D'Agata EM. Rapidly rising prevalence of nosocomial multidrug-resistant, Gram-negative bacilli: a 9-year surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004, 25:842-846.

Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2003, 41:4740-4744.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 2002, 113:5-13.

Hsieh WS, Sung LL, Tsai KC, Ho HT. Evaluation of the VITEK 2 cards for identification and antimicrobial susceptibility testing of non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli. *APMIS*. 2009, 117:241-247.

Kim SJ, Lee JS. Antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from a hospital in Daegu city area. *Korean J Clin Lab Sci*. 2008, 40:75-79.

Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, *et al*. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2007, 60:1163-1167.

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.

Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol*. 2002, 40:1681-1686.

Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, *et al*. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009, 8:21-30.

Park DJ, Song W, Kim TK, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Evaluation of the Vitek 2 AST-N055 card for the susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii* isolates to amikacin. *Korean J Clin Microbiol*. 2009, 12:144-145.

Woo HY, Nam MH, Lee NY. Evaluation of VITEK-2 system for antibiotic susceptibility test of Streptococcus pneumoniae. *Korean J Clin Pathol*. 2001, 21:129-134.