

# Clonal Dissemination of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Harboring *bla*<sub>OXA-23</sub> at One University Hospital in Daejeon, Korea

Ji Youn Sung

Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong, Korea

## 대전지역 소재 대학병원에 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 가지고 있는 다제내성 *Acinetobacter baumannii*의 확산

성지연

극동대학교 임상병리학과

*Acinetobacter* species isolates are important opportunistic pathogens and commonly implicated in nosocomial infections. The therapeutic options for treatment of the bacterial infections are limited because the bacteria isolates are usually multidrug resistant (MDR). In the current study, we investigated various carbapenemase genes in 68 *Acinetobacter* species isolates. Antimicrobial susceptibilities were tested using the disk diffusion method. Screening of carbapenemase genes was performed via multiplex PCR. In addition, PCR and DNA sequencing were used to identify the carbapenemase genes. Repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) was also performed to assess the clonality of isolates. In our study, *A. baumannii* isolates were highly resistant to all agents tested while all non-*A. baumannii* isolates were susceptible to all agents tested, with the exception of aztreonam and cefotaxime. All 51 *A. baumannii* isolates contained the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene and 37 (72.5%) isolates also harbored the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene. In addition, 39 MDR *A. baumannii* isolates were identified in our study and 37 isolates contained the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene. The 37 MDR strains harboring *bla*<sub>OXA-23</sub> showed type I (n=22) or type II (n=15) banding patterns on their REP-PCR profiles. Our results suggest clonal relation and horizontal spreading of MDR *A. baumannii* isolates containing the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene at the hospital located in Daejeon. Continuous investigation of antimicrobial resistant determinants and monitoring emergence and dissemination of MDR isolates is required to prevent and control infection and colonization of MDR *A. baumannii* isolates.

**Keywords:** Multidrug resistant, *A. baumannii*, Carbapenemase

Corresponding author: Ji Youn Sung  
Department of Biomedical Laboratory Science,  
Far East University, Wangjang-ri,  
Gangok-myeon, Eumseong 27601, Korea  
Tel: 82-43-879-3668  
Fax: 82-43-880-3876  
E-mail: azaza72@naver.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received: April 22, 2016  
Revised: May 10, 2016  
Accepted: May 17, 2016

Copyright © 2016 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

### 서론

*Acinetobacter* 속에 속한 종들은 우리 주변환경 어디에나 존재하는 호기성 포도당 비발효 그람음성 막대균으로 현재 명명이 된

종과 아직 명명되지 않은 종을 모두 포함해 총 30여종 이상이 있다 [1]. *Acinetobacter* species는 현재까지도 표현형 분석을 바탕으로 한 생화학적 동정방법으로는 정확하게 종을 동정하기 어렵다. 특히 *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*

(ACB) complex 에 속해있는 *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomials*, 및 *A. pittii*와 최근에 추가된 *A. seifertii* 종들은 종간의 유사성이 높아 동정이 더더욱 어렵다[2]. 그래서 최근에는 RNA 중합효소의  $\beta$ -subunit (*rpoB*) 유전자의 염기서열 분석을 통한 분자생물학적인 종 동정방법을 이용해 *Acinetobacter* 속의 종들을 동정하고 있다[3].

*Acinetobacter* species는 중요한 원내감염균이면서 동시에 기회감염균으로도 작용하는데 특히 중환자실이나 신생아실 등에서 유행하며 심내막염, 폐렴, 요로감염, 및 균혈증 등 다양한 감염증을 유발한다[4]. *Acinetobacter* species 중 가장 빈번하게 원내감염 및 감염병 확산을 일으키는 종은 *A. baumannii*이다. *Acinetobacter* species에 의한 감염증을 치료하기 위해서 최근까지 carbapenem 계열의 항균제가 선택약제로 사용되어 왔는데 이는 carbapenem 계열의 항균제가 extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)을 포함한 대부분의  $\beta$ -lactamase에 저항성을 나타내고 작용 범위가 넓은 장점이 있기 때문이었다. 그러나 최근 carbapenem 계열의 항균제에도 내성을 나타내는 *Acinetobacter* 종이 출현 및 확산되어 치료의 어려움을 가중시키고 있다[5]. 특히 병원감염을 일으키는 대부분의 *Acinetobacter* 종들은 다양한 항균제에 고도내성을 나타내는 경우가 많아 환자의 생명까지 위협하는 경우가 종종 발생하고 있다.

Carbapenem 계열의 항균제에 대한 내성은 주로 carbapenemase 생성, 항균제의 유출 및 세포막의 투과성 감소 등에 의해 나타나는데 특히 carbapenemase 유전자는 종과는 무관하게 서로 다른 세균세포에 전달 될 수 있어 내성확산의 우려를 낳고 있다. 대표적인 carbapenemase는 Ambler class B로 분류되는 metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs)와 Ambler class D로 분류되는 OXA형  $\beta$ -lactamases가 있다. 전 세계적으로 확산되어 있는 MBL에는 IMP, GIM, SIM, SPM, 및 VIM 형이 있으며 OXA형  $\beta$ -lactamases로는 OXA-23, OXA-40, OXA-58, 및 OXA-143 형이 있다. 그리고 최근에는 New Delhi MBL (NDM-1)을 생성하는 *Acinetobacter*가 보고된 바 있다[6].

본 연구에서는 대전지역의 한 대학병원에 의뢰된 임상검체로부터 분리된 *Acinetobacter* species를 대상으로 분자유전학적인 방법을 통해 종을 동정하고 항균제 감수성 검사 및 carbapenemase 유전자를 조사하여 *Acinetobacter* 속의 포함된 종간의 내성현황 및 carbapenem 내성기전을 비교 분석하였다. 또한 repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR)을 통한 clonality 분석을 통해 항균제 내성 *Acinetobacter* 균종의 확산 방지책을 마련하는데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집 및 *rpoB* 유전자의 염기서열분석

2015년 7월부터 2016년 3월까지 대전에 위치한 일개의 대학병원에 의뢰된 임상검체로부터 분리된 *Acinetobacter* species 68 균주를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주를 VITEK GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)를 이용하여 생화학적으로 동정한 후 *Acinetobacter*로 동정된 균주를 대상으로 *rpoB* 유전자 분석을 시행하여 최종적으로 균종을 동정을 하였다. *rpoB* 유전자를 증폭시키기 위해 Ac1055F (5'-GTGATAARATGGC-BGGTCGT-3') 및 Ac1598R (5'-CGBGCRITGCATYTTGTTCRT-3')를 시발체로 하여 중합효소연쇄반응과 염기서열분석을 시행하였다[7]. 먼저 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액으로부터 DNA purification kit (솔젠트, 대전, 한국)을 사용하여 염색체 DNA를 추출하였다. DNA 추출액(5 mL), 10× Taq buffer (2.5 mL), 10 mM dNTP mix (0.5 mL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 mL의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus 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 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 40 분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (솔젠트)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.

### 2. 항균제 감수성 시험

미국의 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 amikacin, gentamicin, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, meropenem, piperacillin, 및 ciprofloxacin (BBL, Cockeysville, MI, USA)에 대한 감수성을 Mueller-Hinton 한천(Difco)을 사용하여 디스크 확산법으로 확인하였다[8]. 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용 범위내에 있는지를 확인하였다.

본 연구에서는 *Acinetobacter* species가 quinolones, amino-

glycosides, 광범위 cephalosporins, 및 carbapenems 계열의 항균제 중 3계열 이상의 항균제에 내성을 나타낼 경우 다제내성 (multidrug-resistant, MDR) *Acinetobacter* species로 정하였다[4].

### 3. 다중 중합효소연쇄반응을 이용한 carbapenemase 유전자 검출

MBLs 및 OXA형  $\beta$ -lactamases를 검출하기 위해 기존의 시발체 (Table 1)를 사용하여 다중 중합효소연쇄반응(multi-1, multi-2, multi-3, 및 multi-4)을 수행하였다[9-11]. *ipob* 유전자를 분석할 때와 동일한 방법 준비한 DNA 추출액(5  $\mu$ L), 10 $\times$  Taq buffer (2.5  $\mu$ L), 10 mM dNTP mix (0.5  $\mu$ L), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25  $\mu$ L의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp.)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide

가 포함된 1.5% agarose gel에서 40 분간 전기영동하여 band를 확인하였다. 다중 중합효소연쇄반응에서 양성반응을 보인 균주들은 carbapenemase 유전형을 확인하기 위해 유전자에 특이적인 시발체를 사용하여 *ipob* 유전자를 분석하는 방법과 동일한 방법으로 PCR 및 염기서열분석을 실시하였다[12].

### 4. REP-PCR을 이용한 다제내성 *A. baumannii*의 역학적 연관성 조사

시발체로는 REP1 (5'- IIIGCGCCGICATCAGGC-3')와 REP2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3')로 명명된 장내세균의 반복 서열을 이용하였다[13]. 증폭반응은 DNA 추출액(5.0  $\mu$ L), 10 $\times$  Taq buffer (5.0  $\mu$ L), 10 mM dNTP mix (1.0  $\mu$ L), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 50  $\mu$ L의 혼합액으로 시행하였다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고,

**Table 1.** Oligonucleotides used in this study for detection of carbapenemases

Reaction number	Primer	Sequence (5'-3')	Gene	Product size (bp)	Reference
Multi-1	OXA-23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	501	[9]
	OXA-23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT			
	OXA-24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	246	[9]
	OXA-24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
	OXA-51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	353	[9]
	OXA-51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			
	OXA-58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	599	[9]
OXA-58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC				
Multi-2	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	232	[10]
	IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC			
	VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	390	[10]
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG			
	SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	271	[10]
SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG				
Multi-3	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	621	[11]
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
	KPC-Fm	CGTCTAGTCTGCTGTCTTG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	798	[11]
	KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTAGGCG			
	BIC-F	TATGCAGCTCCTTTAAGGGC	<i>bla</i> <sub>BIC</sub>	537	[11]
	BIC-R	TCATTGGCGGTGCCGTACAC			
	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	438	[11]
OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG				
Multi-4	AIM-F	CTGAAGGTGTACGAAACAC	<i>bla</i> <sub>AIM</sub>	322	[11]
	AIM-R	GTTCCGGCCACCTCGAATTG			
	DIM-F	GCTTGTCTCGCTTGCTAACG	<i>bla</i> <sub>DIM</sub>	699	[11]
	DIM-R	CGTTCGGCTGGATTGATTG			
	GIM-F	TCGACACACCTTGGTCTGAA	<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	477	[10]
	GIM-R	AACTTCCAACCTTGCCATGC			
	SIM-F	TACAAGGGATTCCGGCATCG	<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	570	[10]
	SIM-R	TAATGGCTGTCCCATGTG			

Abbreviation: F, sense primer; R, antisense primer; Y, C/T.

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility patterns and characteristics of 68 *Acinetobacter* spp. isolates

Isolates	Specimens	OXA type β-lactamases	Identification results		Antimicrobial susceptibility									
			VITEK	<i>rpoB</i> gene	AMK	AZT	FEP	CTX	CAZ	CIP	GEN	IPM	MEM	PIP
1609	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. seifertii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1615	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. seifertii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1521	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. soli</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1503	Bron_Asp		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1510	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1520	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1522	R_Urine		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1523	R_Urine		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1528	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1603	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1516	Sputum		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1517	Bron_Asp		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1601	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1604	Bile		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1627	R_Urine		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	I	S	R	R	S	S	I
1628	R_Urine		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1629	Bron_Asp		<i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1502	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1506	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R
1508	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1514	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1517	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	I	I	R	R	R	S	S	S	R
1518	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1519	Bron_Asp	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1525	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
1526	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R
1527	R_Urine	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
1530	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1532	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1540	R_Urine	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
1541	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1542	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1543	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
1605	Bron_Asp	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	I	I	R
1606	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	R	I	S	S	S	S	I
1608	R_Urine	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1610	Wound	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1611	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
1612	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1613	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1617	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1618	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1619	R_Urine	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1621	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1622	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1623	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1624	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1625	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1626	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1630	Bron_Asp	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1631	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1632	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1633	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	I	R	R	R	S	S	I	R
1635	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1637	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1638	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Table 2. Continued

Isolates	Specimens	OXA type β-lactamases	Identification results		Antimicrobial susceptibility										
			VITEK	<i>rpoB</i> gene	AMK	AZT	FEP	CTX	CAZ	CIP	GEN	IPM	MEM	PIP	
1502	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1506	Bron_Asp	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1508	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1514	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S
1517	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1518	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1519	Bron_Asp	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1525	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1526	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1527	Sputum	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R
1530	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1532	Sputum	OXA-51, OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Abbreviation: AMK, amikacin; GEN, gentamicin; AZT, aztreonam; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacin; PIP, Piperacillin; S, susceptible; I, intermediate resistant; R, resistant.

Table 3. Antimicrobial susceptibilities of 68 *Acinetobacter* spp. isolates

Antimicrobial agent	Numbers (%) of isolates					
	<i>A. baumannii</i> (n=51)			Non- <i>A. baumannii</i> (n=17)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	20 (39.2)	0 (0)	31 (60.1)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Gentamicin	15 (29.4)	2 (3.9)	34 (66.7)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Aztreonam	0 (0)	1 (2.0)	50 (98.0)	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Cefepime	7 (13.7)	2 (3.9)	42 (82.4)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Cefotaxime	4 (7.8)	2 (3.9)	45 (88.2)	9 (52.9)	8 (47.1)	0 (0)
Ceftazidime	6 (11.8)	1 (2.0)	44 (86.3)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Imipenem	10 (19.6)	2 (3.9)	39 (76.5)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Meropenem	10 (19.6)	2 (3.9)	39 (76.5)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Ciprofloxacin	7 (13.7)	0 (0)	44 (86.3)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Piperacillin	6 (11.8)	1 (2.0)	44 (86.3)	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)

68°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10 μL)은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동 한 후 BioDoc-14 Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. Band의 강도와 상관없이 band의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 밴드 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다[13].

## 결 과

### 1. 항균제 감수성 양상

수집기간 동안 총 68 균주의 *Acinetobacter* species가 분리되었는데 *A. baumannii* (n=51)가 가장 많았고 *A. nosocomialis* (n=7) 및 *A. pittii* (n=7)가 그 다음으로 많았으며 *A. seifertii* (n=2)와 *A. soli* (n=1)도 분리되었다(Table 2). 이들 68 균주를 대상으로 항균제 감수성 시험을 한 결과 amikacin (72.5%)에 대한 감수성이

가장 높았으며 그 다음으로 gentamicin (62.7%)에 대한 감수성이 높았다. 한편, *A. baumannii* 균주들은 시험한 모든 항균제에 대해 약 40% 미만의 낮은 감수성을 보인 반면 non-*A. baumannii* (*A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii*, 및 *A. soli*)에 속한 균주들은 aztreonam과 cefotaxime을 제외한 모든 항균제에 대해 100%의 감수성을 보였다(Table 3). 한편 시험기간 동안 분리된 총 68 균주의 *Acinetobacter* species 중 *A. baumannii* 39균주가 다제내성을 보였다.

### 2. Carbapenemase 유전자 검출 및 유전형 확인

Carbapenemase 유전자를 검출하기 위해 다중 중합효소연쇄 반응을 수행한 결과 multi-1 반응에서 68 균주 중 52 균주가 *bla*<sub>OXA-51-like</sub>에 해당하는 PCR 산물을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었는데 52균주 중 51균주는 *A. baumannii*이었고 나머지 한 균주는 *A. nosocomialis*이었다. 게다가 *A. baumannii* 51균주 중 37

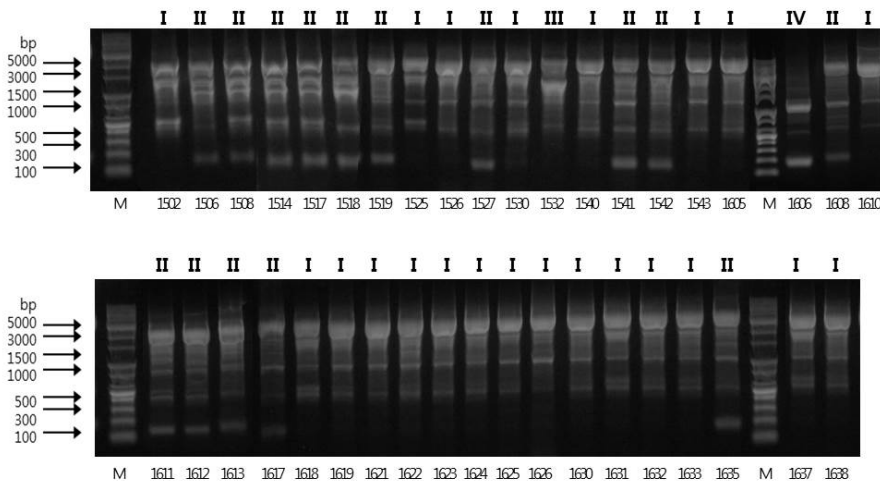


Fig. 1. Repetitive element sequence-based (REP)-PCR patterns of genomic DNA from thirty-nine MDR *Acinetobacter baumannii* isolates. Lane M is 1 kb DNA size marker.

균주는 *bla*<sub>OXA-23-like</sub>에 해당하는 PCR 산물도 동시에 가지고 있는 것으로 나타났다. 한편 multi-1을 제외한 나머지 multi-2, multi-3, 및 multi-4 반응에서는 PCR 산물이 하나도 검출되지 않았다.

다중 중합효소연쇄반응에서 *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 또는 *bla*<sub>OXA-23-like</sub>의 크기에 해당하는 PCR 산물이 얻어졌던 균주를 대상으로 carbapenemase 유전자의 유전형형을 확인하기 위해 PCR과 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과 *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 및 *bla*<sub>OXA-23-like</sub>의 유전형은 각각 *bla*<sub>OXA-51</sub> 및 *bla*<sub>OXA-23</sub>인 것으로 확인되었다.

### 3. 다제내성 *A. baumannii*의 유전형 분석

시험기간 중 분리된 39균주의 다제내성 *A. baumannii*가 같은 클론에서 유래되었는지를 확인하기 위하여 REP-PCR을 수행한 결과 총 4개의 band 패턴(I, II, III, 및 IV형)이 확인되었다(Fig. 1). 분석대상이 되었던 39 균주 중 단 2균주를 제외한 37균주는 I형(22균주) 또는 II형(15균주)의 band 패턴을 보였는데 이들은 모두 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있었다. III형(1균주)과 IV(1균주)형의 band 패턴을 보인 균주들은 I형 또는 II형의 band 패턴을 보인 균주들과는 달리 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하지 않고 있었다.

### 고 찰

*Acinetobacter* 속에 속한 종들은 자연에서 흔하게 분리되지만 병원감염 및 기회감염을 일으키는 주된 원인균이기도 하다. *Acinetobacter* species로 인한 감염병 치료에는 carbapenem 계열의 항균제가 선택약제로 사용되어 왔으나 carbapenem 내성 *Acinetobacter* species가 전세계적으로 광범위하게 확산되어 치료에 어려움을 가중시키고 있다. 본 연구에서는 환자로부터 분리되

는 모든 *Acinetobacter* species를 대상으로 *Acinetobacter* 속에 속한 종간의 항균제 감수성 양상과 carbapenem 내성기전을 비교 분석하였다.

연구기간 동안 총 68균주의 *Acinetobacter* species가 임상검체로부터 분리되었는데 그 중 51균주가 *A. baumannii*로 17균주의 non-*A. baumannii* 보다 3배나 많은 빈도로 분리되었다. 특히 *A. baumannii*는 다른 *Acinetobacter* 종에 비해 항균제에 대한 내성율이 현저하게 높았으며 총 51 균주의 *A. baumannii* 중 39균주(76.5%)가 다제내성을 보였다[14]. 반면 non-*A. baumannii*에 속한 균종들은 aztreonam과 cefotaxime을 제외한 모든 항균제에 감수성을 보였다. *A. nosocomialis*, *A. pittii*, 및 *A. seifertii*는 표현형적으로 *A. baumannii*와 매우 밀접한 연관성이 있으나 최근까지도 *A. baumannii*가 non-*A. baumannii*에 비해 훨씬 높은 빈도로 분리되고 있으며 다제내성을 보이는 비율도 높다고 Lin 등[15]도 보고하고 있다.

수집된 *Acinetobacter* species 68균주를 대상으로 carbapenemase 유전자를 검출한 결과 본 연구에서 검출된 carbapenemase 유전자는 *bla*<sub>OXA-51</sub>과 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자 단 두 종류뿐이었다. *A. baumannii* 51균주는 모두 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자를 포함하고 있었으며 non-*A. baumannii* 균주 중 *A. nosocomialis* 한 균주에서도 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자가 검출되었다. *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자는 carbapenem 계열의 항균제에 대한 내성에 관여한다고 알려져 있으나 본 연구에서는 carbapenem 항균제에 대한 내성에 관계없이 감수성인 균주도 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자를 포함하고 있는 것으로 나타났다. *A. baumannii* 균주들의 경우 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자는 그 유전자의 upstream에 IS*Aba1*를 동시에 가지고 있어서 IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51-like</sub> 상태로 존재할 경우 carbapenem 계열의 항균제에 내성을 보일 수 있다고 보고되고 있으나 IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51-like</sub>를 가지고 있더라도

carbapenem 계열의 항균제에 감수성을 보이는 경우가 있다고 Hu 등[16]은 보고하였다. 본 연구결과에서도 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자는 *Acinetobacter* species가 carbapenem 계열의 항균제에 대해 내성을 갖게 하는데 중요한 역할을 하지는 않는 것으로 나타났다. 한편 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자는 모두 *A. baumannii* 균주에서만 확인되었는데 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있는 *A. baumannii* 균주는 모두 다제내성을 나타냈다(Table 2). 이전의 국내외의 많은 연구자들은 이미 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하는 다제내성 *A. baumannii* 균주가 병원감염 및 기회감염을 일으키는 주된 원인균임을 보고한 바 있다 [12,17]. 본 연구에서도 총 39균주의 다제내성 세균이 검출되었는데 그 중 2균주를 제외한 37균주가 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있는 *A. baumannii*이었다. 게다가 서로 같은 clone에서 유래했는지 여부를 알아보기 위해 REP-PCR을 수행한 결과 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있는 37균주는 I형 또는 II형의 band 패턴만을 나타냈다. 이러한 결과는 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 다제내성 *A. baumannii* 균주들이 병원내에서 수평확산 되었음을 의미한다.

다제내성 *Acinetobacter* species 균주의 분리빈도가 지속적으로 증가하고 있음에도 불구하고 대전지역에서 분리된 *Acinetobacter* species 균주의 항균제 감수성 양상 및 내성기전에 대한 연구는 상대적으로 많지 않았다. 본 연구에서는 대전지역에서 분리된 *Acinetobacter* species 균주를 대상으로 하였는데 *A. baumannii* 균주가 다른 *Acinetobacter* 종들에 비해 항균제 감수성율이 낮고 특히 다제내성을 나타낼 확률이 월등하게 높음을 확인하였다. 또한 대부분의 다제내성 *A. baumannii* 균주는 플라스미드나 integron 등의 운반체를 통해 전파될 수 있는 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있었으며 병원 내에 이미 광범위하게 확산되었음을 확인하였다. 따라서 다제내성 *A. baumannii* 균주의 출현 및 확산을 방지하기 위해서는 지속적으로 내성세균의 검출 빈도와 분포, 유전형의 변화 양상을 감시해야 할 것으로 사료된다.

## 요약

*Acinetobacter* species는 중요한 기회감염균으로 빈번하게 원내감염을 일으킨다. 뿐만 아니라 다제내성을 보이는 경우가 많아 치료를 위한 항균제 선택이 매우 제한적이다. 본 연구에서는 *Acinetobacter* species 68균주를 대상으로 하여 다양한 carbapenemase 유전자를 조사했다. 디스크확산법으로 항균제 감수성 양상을 조사했으며 다중 중합효소연쇄반응을 통해 carbapenemase 유전자를 포함하고 있는 균주를 선별하였고 PCR과 염기서열분석을 통해 최종적으로 carbapenemase 유전형을 확인했다. 한편 REP-PCR 방법으로 균주간의 clonality를 분석했다. 본 연

구에서 *A. baumannii* 균주는 분석된 모든 항균제에 대해 높은 내성을 나타냈으나 non-*A. baumannii* 균주는 분석된 항균제 중 aztreonam과 cefotaxime을 제외한 항균제에 모두 감수성을 보였다. *A. baumannii* 51 균주는 *bla*<sub>OXA-51</sub> 유전자를 가지고 있었으며 그 중 37(72.5%)균주는 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자도 동시에 가지고 있었다. 본 연구에서 39 균주의 다제내성 *A. baumannii* 가 분리되었는데 그 중 37균주가 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 가지고 있었다. *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있는 균주들은 I (n=22) 형 또는 II (n=15) 형의 REP-PCR band 패턴을 보였는데 이는 대전에 위치한 일개의 대학 병원에 *bla*<sub>OXA-23</sub> 유전자를 포함하고 있는 다제내성 균주들이 수평 확산 되어 있음을 의미한다. 다제내성 *A. baumannii* 균주에 의한 감염 및 집락화를 막기 위해서는 지속적으로 내성을 유발하는 인자를 조사하고 MDR균주의 출현 및 확산을 감시할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

## References

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5:939-951.
2. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65:934-942.
3. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *tpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 2006;44:827-832.
4. 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;8:21-22.
5. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006;12:826-836.
6. Nordmann P. Gram-negative bacteria with resistance to carbapenems. Med Sci (Paris). 2010;26:950-959.
7. 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.
8. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards

- Institute; 2010, p52-53.
9. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:351-353.
  10. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:321-322.
  11. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:119-123.
  12. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong province, Korea. *Korean J Lab Med*. 2010;30:501-506.
  13. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:635-643.
  14. 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.
  15. Lin YC, Hsia KC, Chen YC, Sheng WH, Chang SC, Liao MH, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter* clinical isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:2078-2084.
  16. Hu WS, Yao SM, Fung CP, Hsieh YP, Liu CP, Lin JF. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3844-3852.
  17. Jia W, Li C, Zhang H, Li G, Liu X, Wei J. Prevalence of Genes of OXA-23 Carbapenemase and AdeABC efflux pump associated with multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates in the ICU of a comprehensive hospital of northwestern China. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12:10079-10092.