

# Distribution of Antimicrobial Resistant Genes in *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* Complex Isolated from Clinical Specimens in Chungcheong, Korea

Ji Youn Sung

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

## 충청지역의 임상검체로부터 분리된 *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* Complex를 대상으로 항균제 내성 유전자 비교분석

성지연

극동대학교 임상병리학과

Species that belong to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii*(Acb) complex are major causes of hospital-acquired infections. They are important opportunistic pathogens. These species are usually multidrug resistant (MDR), and the therapeutic options to treat the infections caused by these species are limited. In the present study, we investigated fluoroquinolone resistance mechanisms in 53 ciprofloxacin resistant *Acinetobacter* species isolates in Chungcheong, Korea. Antimicrobial susceptibilities were determined using the disk-diffusion method. Detections of genes and identification of mutations associated with fluoroquinolone resistance were carried out using PCR and DNA sequencing. In our study, 47 out of 53 ciprofloxacin resistant *Acinetobacter* isolates harbored sense mutations at the 83rd residue (serine to leucine) in the *gyrA* gene as well as at the 80th residue (serine to leucine) in the *parC* gene. Among the 47 isolates harboring sense mutations in *gyrA* and *parC* gene, 44 isolates were *A. baumannii* and 3 isolates were *A. pittii*. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants were detected in isolates in our study. Among the 46 ciprofloxacin resistant *A. baumannii* isolates, 41 showed type A, B, or F banding patterns on their REP-PCR profiles. This result suggests that clonal relation and horizontal spreading of the bacterial isolates have been around hospitals in Chungcheong area. To prevent colonization and disseminations of fluoroquinolone resistance Acb complex isolates, continuous investigation and monitoring of antimicrobial resistant determinants of MDR isolates are needed.

**Key words:** *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* complex, *A. baumannii*, Fluoroquinolone, Multidrug resistant

Corresponding author: Ji Youn Sung  
Department of Biomedical Laboratory Science,  
Far East University, 76-32 Daehak-gil,  
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.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: September 6, 2017  
Revised 1<sup>st</sup>: September 29, 2017  
Revised 2<sup>nd</sup>: September 29, 2017  
Revised 3<sup>rd</sup>: October 11, 2017  
Accepted: October 11, 2017

## 서론

*Acinetobacter*속에 속한 균종들은 토양과 담수 등 자연환경에 널리 서식하는 그람음성 막대균으로 이 속에 속한 일부 종들은 병원감염 및 기회감염의 원인균으로 작용한다. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) complex에 속하는 *A. baumannii*, *A. pittii*, 그리고 *A. nosocomialis*는 병원환경 및 입원환자에서 가장 빈번하게 분리되고 있는 균종으로, 특히 신생아실이나 중환자실 등에서 유행하며 폐렴, 요로감염, 균혈증 및 심내막염 등 다양한 감염병을 일으키고 있다[1-3]. 이 세균들에 의한 감염병은 유병율과 치사율이 높은 것으로 알려져 있는데 최근 여러 계열의 항균제에 내성을 동시에 나타내는 다제내성 *Acinetobacter* 균주의 출현이 빈번해 지고 있어 이 세균들에 의한 감염병 치료가 더욱 어려워지고 있다[1-3].

Fluoroquinolones는 일반적으로 그람양성 세균과 그람음성 세균에 모두 효과적인 광범위 항균제로 cephalosporins 및 aminoglycosides 계열 항균제와 비교해 우수한 항균력을 가지고 있어 *Acinetobacter* 종들에 의한 감염병 치료를 위해 오래동안 사용되어왔다. 그러나 최근 fluoroquinolone에 내성을 보이는 *Acinetobacter* 종들의 출현 및 확산이 세계 여러 나라에서 보고되어 문제가 되고 있다[4]. *Acinetobacter* 속에 속한 종들은 다양한 기전으로 fluoroquinolones에 내성을 나타내는데 이러한 내성은 세균세포의 염색체 DNA에 돌연변이가 생기거나 plasmid를 통해 운반되는 내성유전자를 획득함으로써 나타난다. 세균세포의 염색체 DNA에 돌연변이가 발생하는 경우 중 대표적인 것이 항균제가 작용하는 효소를 암호화하는 유전자의 돌연변이이다. 가장 빈번하게 돌연변이가 발생하는 유전자는 DNA gyrase 효소를 암호화 하는 *gyrA* 및 *gyrB* 유전자와 topoisomerase IV 효소를 암호화 하는 *parC* 및 *parE* 유전자이다. 이 유전자들은 quinolone resistance determining regions (QRDRs)라고 불리는 영역에 위치하고 있는데 변이된 유전자에 의해 생성된 효소는 fluoroquinolones과 결합하지 않으므로 항균제에 내성을 나타내게 된다. 특히 *Acinetobacter* 속에 속한 종들은 *gyrA*와/또는 *parC* 유전자에 돌연변이가 있는 경우 대부분 fluoroquinolones에 고도내성을 보이는 것으로 알려져 있다[4].

한편 세균은 plasmid를 통해 다양한 항균제에 내성을 나타낼 수 있게 하는 유전자들을 획득한다. Plasmid를 통해 운반되며 quinolone에 내성을 나타내도록 하는 인자들을 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants라고 하는데 이에 해당하는 유전자에는 *qnr*, *aac(6')-1b-cr*, *qepA*,

*oqxA* 및 *oqxB* 등이 있다. 이 유전자들에 의해 생성된 단백질들은 다양한 방법으로 fluoroquinolone 항균제가 세균세포에 작용하지 못하도록 하여 세균이 fluoroquinolone 항균제에 내성을 갖도록 한다. Onr 단백질은 DNA gyrase와 topoisomerase IV 효소에 fluoroquinolone 항균제가 결합하는 것을 방해하여 fluoroquinolone 항균제의 항균능력을 저하시킨다[5]. AAC(6')-1b-cr 단백질은 aminoglycoside acetyltransferase 효소로 fluoroquinolone 항균제를 변형시켜 항균작용을 못하도록 한다. 또한 QepA와 OqxAB 단백질은 유출펌프를 활성화시켜 fluoroquinolone 항균제를 세균세포 바깥으로 유출시킴으로써 fluoroquinolone 항균제가 작용할 수 없도록 한다[6]. PMQR에 포함되는 유전자들은 plasmid를 통해 다양한 균종으로 빠르게 확산될 수 있어 내성유전자의 확산이라는 면에서는 큰 문제이지만 *Acinetobacter* 속에 속한 종에서는 드물게 보고되고 있다[7,8].

최근까지 전세계적으로 *Acinetobacter* 속에 속한 종들을 대상으로 내성연구가 많이 진행되었고 보고되고 있으나 주로 *A. baumannii* 균종에만 국한되어 있거나 carbapenem 내성기전에 초점이 맞춰져 있는 경우가 대부분이었다[3,4]. 국내에서도 *Acinetobacter* 속에 속한 종들을 대상으로 한 연구는 많으나 [1,9] fluoroquinolone 항균제에 대한 내성연구는 드물다. 본 연구에서는 충청지역에서 분리된 Acb complex에 속하는 균주를 대상으로 fluoroquinolone 항균제에 대한 내성기전을 조사하여 종 간의 내성현황 및 내성기전을 비교 분석하였다. 또한 fluoroquinolone 항균제에 내성을 보이는 균주를 대상으로 repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR)을 시행하여 내성 균주간의 클론성을 비교 및 분석하였다. DNA fingerprinting 방법 중 하나인 REP-PCR 분석법은 *A. baumannii*에 의한 병원내감염의 역학적 특성을 밝히는데 유용하고 신속한 방법으로 알려져 있으며, 역학조사를 위한 참조방법인 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 방법으로 얻은 결과와 유사한 결과를 보인다고 보고되고 있다[10]. 본 연구결과는 충청지역에서 분리되는 *Acinetobacter* 속에 속한 균주들의 내성양상을 파악하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집 및 균종 동정

본 연구는 수집기간인 2014년 8월부터 2016년 5월까지 충청지역에 위치한 대학병원에 의뢰된 객담(68), 소변(18), 기관지세척액(14) 및 그 외 검체(4)로부터 분리된 104균주의 Acb

complex에 속하는 *Acinetobacter* species를 대상으로 하였다. 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 검체로부터 분리배양된 균주를 대상으로 Vitek 2® automated instrument ID system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 일차 균종 동정을 하였다. Vitek 2® automated instrument ID system (bioMérieux) 분석결과가 *Acinetobacter* 속에 속한 종인 균주를 대상으로 최종 균종 동정을 위해 Ac1055F (5'-GTGATAARATGGCBGGTCGT-3') 및 Ac1598R (5'-CGBGCRTGCATYTTGTCT-3')를 시발체로 *rpoB* 유전자를 증폭시켜 염기서열을 분석하였다[2]. 먼저 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액으로부터 DNA purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 DNA를 추출하였다. AccuPower PCR PreMix (Bioneer)에 DNA 추출액(2.5 µL), primer 각 10 pmol 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. GenePro Thermal Cycler B48D (Bioer Technology Corp. Ltd, China)로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 52°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 반응산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 PCR purification kit (Bioneer)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 서

열을 분석하였다.

## 2. 항균제 감수성 시험

Mueller-Hinton 한천배지(Difco)를 사용하여 amikacin, gentamicin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem 및 meropenem (BBL, Cockeysville, MI, USA)에 대한 감수성을 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 디스크 확산법으로 확인하였다[11]. 정도관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위내에 있는지 확인하였다.

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

## 3. Quinolone 내성인자 검출

QRDR에 위치한 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 돌연변이와 PMQR determinants를 검출하기 위해 기존의 시발체(Table 1)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다[12-15]. 균종 동정을 위해 *rpoB* 유전자를 증폭시킬 때와 동일한 방법으로 준비한 DNA 추출액(2.5 µL), primer 각 10 pmol, AccuPower PCR PreMix (Bioneer) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. GenePro Thermal Cycler B48D (Bioer Technology

**Table 1.** Oligonucleotides used in this study for detection of quinolone resistance determinants

Primer	Sequence (5'-3')	Gene	Reference
QRDR mutation detection			
<i>gyrA</i> -F	AAATCTGCTCGTGTCTGTTGG	<i>gyrA</i>	[12]
<i>gyrA</i> -R	GCCATACCTACAGCAATACC		
<i>parC</i> -F	AAGCCCGTACAGCGCCGTATT	<i>parC</i>	[12]
<i>parC</i> -R	AAAGTTATCTTGCCATTCGCT		
PMQR gene detection			
<i>QnrA</i> -F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	[13]
<i>QnrA</i> -R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>QnrB</i> -F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	[13]
<i>QnrB</i> -R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA		
<i>QnrS</i> -F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	[13]
<i>QnrS</i> -R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>Aac(6)-Ib</i> -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	[14]
<i>Aac(6)-Ib</i> -R	CTCGAATGCCTGGCGTGT		
<i>QepA</i> -F	CCAGCTCGGCAACTTGATAC	<i>qepA</i>	[15]
<i>QepA</i> -R	ATGCTCGCCTTCAGAAAA		
<i>OqxA</i> -F	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>	[15]
<i>OqxA</i> -R	CCACTCTTCACGGGAGACGA		

Abbreviations: F, sense primer; R, antisense primer; M, A/C; H, A/T/C; Y, C/T.

Corp.)로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 50초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 증합효소연쇄반응에서 생성된 반응산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 band를 확인한 후 *rpoB* 유전자 분석할 때와 동일한 방법으로 염기서열분석을 시행하였다.

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

시발체로는 REP1 (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3')과 REP2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3') 로 명명된 장내세균의 반복 서열을 이용하였다[10]. 증폭반응은 DNA 추출액(5.0 µL), primer 각 20 pmol, AccuPower PCR PreMix (Bioneer) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 50 µL의 반응용액을 만들었다. GenePro Thermal Cycler B48D (Bioer Technology Corp.)로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 68°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10 µL)을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동 한 후 Slite 140 Image System (Novusci, Bedfordshire, UK)을 이용하여 band패턴을 분석하였다. Band의 강도와 상관없이 band의 개수 및 분자량으로 각 균주를 비교하였으며, 두 개 이상의 밴드 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다[10].

## 결 과

### 1. Ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species의 분리

수집기간동안 총 104 균주의 Acb complex에 속하는 *Acinetobacter* species가 분리되었는데 *A. baumannii*가 56 균주로 가장 많았으며 *A. pittii*가 28균주로 그 다음으로 많았고 *A. nosocomialis*는 20균주가 분리되었다. 한편 임상검체 종류에 따라 균종의 분리빈도가 다르게 나타났는데 객담 검체에서는 *A. baumannii*가(46/68) 압도적으로 많이 분리되었으며 그 다음으로 *A. pittii*가(16/68) 많이 분리되었다. 반면 소변 검체에서는 *A. pittii*가(8/18) 가장 빈번하게 분리되었으며 그 다음으로 *A. nosocomialis*가(6/18) 많이 분리되었다. 기관지세척액 검체에서는 Acb complex에 속하는 *Acinetobacter* species가 모두 유사한 빈도로 분리되었다.

이 균주들을 대상으로 ciprofloxacin에 대한 항균제 감수성 시험을 한 결과 총 53균주 중 46균주(82.1%)의 *A. baumannii*, 4균주(14.3%)의 *A. pittii*, 그리고 3균주(15.0%)의 *A. no-*

*socomialis*가 ciprofloxacin에 내성을 가지고 있는 것이 확인되었다(Table 2). 또한 시험기간 동안 분리된 총 53 균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species 중 49균주가 다제 내성을 보였다. 한편 정도관리를 위해 *E. coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853 균주도 *Acinetobacter* species와 동일한 방법으로 9종류의 항균제에 대해 감수성 검사를 시행하였다. 그 결과 *E. coli* ATCC 25922의 항균제 억제영역의 직경(mm)은 각각 amikacin (23), gentamicin (24), aztreonam (32), cefepime (35), ceftazidime (31), ciprofloxacin (36), imipenem (30) 및 meropenem (32)인 것으로 나타나 모두 허용범위내에 들었다. *P. aeruginosa* ATCC 27853 또한 각 항균제에 대해 억제영역의 직경(mm)이 amikacin (24), gentamicin (20), aztreonam (26), cefepime (28), ceftazidime (26), ciprofloxacin (30), imipenem (26) 및 meropenem (32)로 모두 허용범위내에 드는 것으로 나타났다.

### 2. Quinolone 내성인자 검출 및 분석

총 53균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species를 대상으로 *gyrA* 및 *parC* 유전자에 돌연변이가 있는지를 확인하기 위해 증합효소연쇄반응과 염기서열분석을 수행한 결과 *A. baumannii* 44균주, *A. pittii* 3균주, 그리고 *A. nosocomialis* 한 균주로 구성된 총 48균주가 *gyrA* 와/또는 *parC* 유전자에 돌연변이를 가지고 있었다(Table 2). 돌연변이가 확인된 48균주의 *Acinetobacter* species 중 *A. nosocomialis* 한 균주를 제외한 나머지 47 균주는 *gyrA*와 *parC* 유전자 모두에 돌연변이를 가지고 있었다. 본 연구에서 확인된 *gyrA* 및 *parC* 유전자 돌연변이는 염기의 치환에 의해 serine 잔기가 leucine 잔기로 치환되는 sense mutation으로 *gyrA* 유전자의 83번째 아미노산 (serine)과 *parC* 유전자의 80번째 아미노산 (serine)이 leucine으로 치환된 돌연변이였다.

한편 본 연구에서는 53균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species를 대상으로 PMQR 유전자인 *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA* 및 *oqxA* 유전자의 빈도를 조사하기 위해 증합효소연쇄반응을 시행하였으나 양성반응을 보인 균주는 하나도 없는 것으로 나타났다.

### 3. Ciprofloxacin 내성 *A. baumannii*의 유전형 분석

시험기간 중 분리된 46균주의 ciprofloxacin 내성 *A. baumannii*가 같은 클론에서 유래되었는지를 확인하기 위하여 REP-PCR을 수행한 결과 총 7개의 band 패턴(A, B, C, D, E, F 및 G형)이 확인되었다(Figure 1). 분석대상이 되었던 46 균주

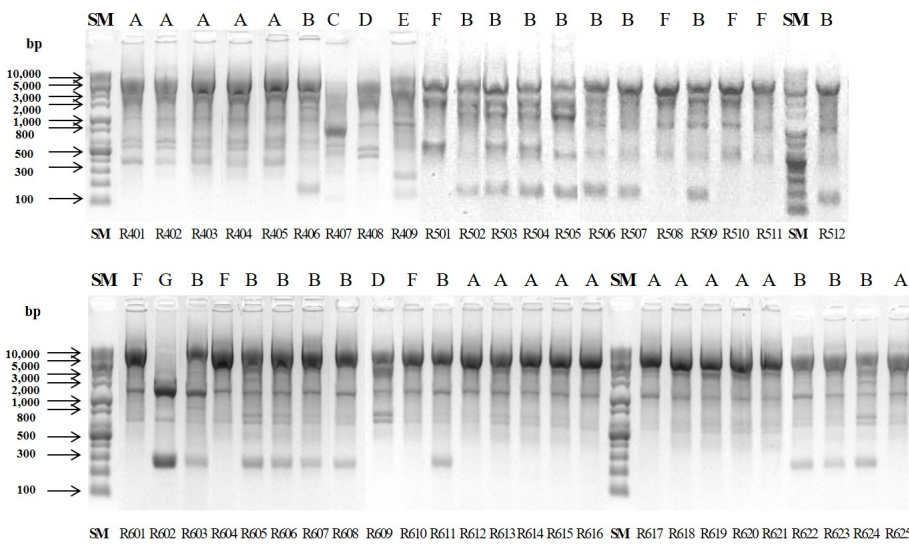
**Table 2.** Antimicrobial susceptibility patterns and characteristics of 53 *Acinetobacter* spp. isolated from clinical specimens in Chungcheong, Korea

Isolate	<i>Acinetobacter</i> spp.	Antimicrobial susceptibility								QRDR* mutations in		PMQR <sup>†</sup> genes
		AMK	GEN	AZT	FEP	CAZ	CIP	IPM	MEM	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
R401	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R402	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R403	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R404	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R405	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
R406	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R407	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R409	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R410	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R501	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R502	<i>A. baumannii</i>	S	I	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R503	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R504	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R505	<i>A. baumannii</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R506	<i>A. baumannii</i>	S	I	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R507	<i>A. baumannii</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R508	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R509	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R510	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R511	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R512	<i>A. baumannii</i>	S	S	R	R	R	R	I	I	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R601	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R602	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
R603	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R604	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R605	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R606	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R607	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R608	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R609	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R610	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R611	<i>A. baumannii</i>	S	S	R	I	R	R	S	I	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R612	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R613	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R614	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R615	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R616	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R617	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R618	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R619	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R620	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R621	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R622	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R623	<i>A. baumannii</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R624	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
R625	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
RP401	<i>A. pittii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
RP402	<i>A. pittii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
RP403	<i>A. pittii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
RP404	<i>A. pittii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	Ser83Leu	-
SN603	<i>A. nosocomialis</i>	S	R	R	S	S	R	S	S	-	-	-
RN401	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	Ser83Leu	-	-
RN402	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	R	R	R	4	R	R	-	-	-

*aac(6)-1b-cr*, *qepA* 및 *oqxA*.

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

\*Point mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs). <sup>†</sup>Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes: *qnr*,



**Figure 1.** Repetitive element sequence-based (REP)-PCR patterns of genomic DNA from forty-six ciprofloxacin resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Land SM is 1 kb DNA size marker.

중 5균주를 제외한 41균주가 A형(16균주), B형(18균주), 또는 F형(7균주)의 band 패턴을 보였다.

**고 찰**

*Acinetobacter*속에 속한 종들은 병원감염 및 기회감염을 일으키는 주된 원인균으로 다양한 항균제 내성인자를 가지고 있어 병원환경에서 내성유전자의 확산에 중요한 역할을 한다[2]. 따라서 *Acinetobacter*속에 속한 종들을 대상으로 한 항균제 내성연구는 병원감염관리를 위해 매우 중요하다. 본 연구에서는 환자로부터 분리된 Acb complex에 속하는 균주를 대상으로 항균제 감수성 양상과 fluoroquinolone 항균제에 대한 내성기전 조사하였으며 *Acinetobacter*종간의 차이점을 비교 분석하였다.

연구기간 동안 총 53 균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species가 임상검체로부터 분리되었는데 그 중 86.8%에 해당하는 46균주가 *A. baumannii*였다. *A. baumannii* 균주의 ciprofloxacin에 대한 항균제 내성율은 82.1%로 *A. pittii* 균주(14.3%)나 *A. nosocomialis* 균주 (15.0%)보다 5배 이상 높았는데 이전에 아프리카(82.4%)와 국내(79.5%)에서 보고된 연구결과와 유사한 내성율을 보이고 있다[16,17]. 본 연구에서 분리된 *A. pittii* 및 *A. nosocomialis* 균주들의 ciprofloxacin에 대한 내성율은 15.0% 이하로 *A. baumannii* 균주보다 매우 낮았는데 유사한 결과(13.3~14.3%)가 이전에 국내에서 보고된 바 있다[17]. 이상의 결과에서 Acb complex에 속하는 *Acinetobacter* 종들 중 *A. baumannii*의 분리빈도와 ciprofloxacin에 대한 내성율이 non-*A. baumannii*에 비해 월

등하게 높은 것으로 나타났는데 이는 *Acinetobacter*종들 중 주된 병원감염균으로 작용하고 임상적으로 매우 중요한 종이 *A. baumannii*임을 의미한다. 이전의 국내외의 많은 연구자들은 역시 *Acinetobacter*종들 중 *A. baumannii* 균주가 기회감염 및 병원감염을 일으키는 주된 원인균으로 대부분의 *A. baumannii* 균주가 다제내성을 나타낸다고 보고하고 있다[17-19].

*Acinetobacter* species가 fluoroquinolone에 내성을 나타내는 가장 중요한 기전 중 하나가 DNA gyrase 와 DNA topoisomerase IV의 돌연변이이다. 특히 *gyrA*와 *parC* 유전자에 모두 돌연변이가 일어나 아미노산이 치환될 경우 fluoroquinolone에 고도내성을 나타낸다고 알려져 있다[19]. 본 연구에서도 수집된 53 균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species 중 44균주의 *A. baumannii*와 3균주의 *A. pittii*가 *gyrA*와 *parC* 유전자 모두에 돌연변이를 가지고 있는 것이 확인되었다. 이들은 종에 상관없이 모두 serine 잔기가 leucine 잔기로 치환되는 sense mutation을 *gyrA* 유전자와 *parC* 유전자에 포함하고 있었다. 본 연구에서 확인된 serine 잔기의 leucine 잔기로의 치환은 이미 *A. baumannii* 균주를 대상으로 많은 연구에서 보고된 바 있다[20,21]. 그러나 *A. pittii* 또는 *A. nosocomialis* 균주를 대상으로 한 연구에서 *gyrA*와/또는 *parC* 유전자에 sense mutation이 있음을 보고한 연구는 그동안 거의 없었다. 그러나 본 연구에서는 *A. pittii* 균주 역시 *A. baumannii* 균주와 마찬가지로 *gyrA*와 *parC* 유전자 모두에 sense mutation을 가질 경우 fluoroquinolone에 고도내성을 보일 수 있음을 확인하여 의미가 있었다. 한편 본 연구에서 수집된 53 균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species는 PMQR 유전자를 포함하고 있지 않았는데 이 결과는 *Acine-*

*tobacter* species의 fluoroquinolone 내성과 PMQR 유전자의 획득은 크게 관련성이 없음을 뒷받침 하는 것으로 이전의 *Acinetobacter* species를 대상으로 한 연구에서도 PMQR 유전자의 검출빈도가 매우 낮거나 검출되지 않았다고 보고하고 있다[22-24].

본 연구에서는 총 44균주의 ciprofloxacin 내성 *A. baumannii*가 분리되었는데 이들을 대상으로 서로 같은 clone에서 유래했는지 여부를 알아보기 위해 REP-PCR을 수행한 결과 분석대상이 되었던 46 균주 중 5균주를 제외한 41균주가 A형, B형, 또는 F형 band 패턴을 보였다. 이러한 결과는 ciprofloxacin 내성 *A. baumannii* 균주들이 병원내에서 수평확산 되었음을 의미한다.

Ciprofloxacin 내성 Acb complex에 속한 균주의 분리빈도가 지속적으로 증가하고 있음에도 불구하고 충청지역에서 분리된 *Acinetobacter* 균주의 항균제 감수성 양상 및 fluoroquinolone 내성기전에 대한 연구는 상대적으로 많지 않았다. 본 연구에서는 충청지역에서 분리된 Acb complex에 속한 균주를 대상으로 항균제 감수성 양상과 fluoroquinolone 내성기전을 분석하였는데 *A. baumannii*가 다른 *Acinetobacter* 종들에 비해 항균제 내성율이 높고 다제내성을 나타낼 가능성이 많은 것으로 나타났다. 또 *Acinetobacter* species의 fluoroquinolone에 대한 내성은 PMQR 유전자의 획득 보다는 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 돌연변이 획득이 더 크게 관련성이 있는 것으로 나타났다. 한편 다제내성 *A. baumannii* 균주가 병원환경에 지속적으로 확산되고 있음이 확인되었는데 이를 방지하기 위해서는 지속적으로 항균제 내성을 유발하는 인자를 조사하고 내성세균의 변화 및 확산 양상을 감시해야 할 것으로 사료된다

## 요약

*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) complex에 속한 종들은 빈번하게 병원감염 및 기회감염을 일으킨다. 또한 다제내성인 경우가 많아 이 균들의 감염증 치료를 위한 항균제 선택이 매우 제한적이다. 본 연구에서는 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* species 53균주를 대상으로 fluoroquinolone 내성기전을 조사했다. 항균제 감수성 양상을 조사하기 위해 디스크확산법이 시행되었다. Fluoroquinolone 내성과 관련된 유전자 및 돌연변이 검출을 위해 PCR과 염기서열분석이 이루어졌다. 본 연구에서 수집된 53균주의 ciprofloxacin 내성 *Acinetobacter* 중 47균주가 *gyrA* 유전자의 83번째 serine 아미노산 잔기와 *parC* 유전자의 80번째 serine 아미노산 잔기가

leucine 잔기로 치환된 sense mutations 가지고 있는 것으로 나타났다. *gyrA*와 *parC* 유전자에 sense mutations을 가지고 있는 47균주 중 44균주가 *A. baumannii*였고 3균주는 *A. pittii*였다. 본 연구에서 조사대상이 되었던 Acb complex 균주들 중 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants를 가지고 있는 균주는 하나도 없었다. 46 균주의 ciprofloxacin 내성 *A. baumannii*는 A, B, 또는 F형의 banding pattern을 보였는데 이는 충청지역에 위치한 일개의 병원에 ciprofloxacin 내성 *A. baumannii*가 수평확산 되어 있음을 의미한다. Fluoroquinolone 내성 Acb complex 균주의 집락화 및 확산을 막기 위해서 다제내성 균주들을 대상으로 항균제 내성인자들을 지속적으로 조사하고 모니터링할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements: This work was supported by the 2017 Far East University Research Grant (FEU2017R02).

Funding: None

Conflict of interest: None

## REFERENCES

1. Sung JY. Clonal dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates harboring *bla<sub>OXA-23</sub>* at One University Hospital in Daejeon, Korea. Korean J Clin Lab Sci. 2016;48(2):94-101.
2. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 2006;44(3):827-832.
3. 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.
4. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 1997;39(6):757-762.
5. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 2005;41(Suppl 2):120-126.
6. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):463-469.
7. Jiang X, Yu T, Jiang X, Zhang W, Zhang L, Ma J. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Henan, China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(3):381-383.
8. Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De Champs C. First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered

- from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60(3):287-290.
9. Lim J, Lee G, Choi Y, Kim J. An analysis of the antibiotic resistance genes of multi-drug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Clin Lab Sci*. 2016;48(3):217-224.
  10. 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(12):635-643.
  11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010, p52-53.
  12. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8): 2499-2507.
  13. Cattoir V, Poirel L, Rdotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(2):394-397.
  14. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3953-3955.
  15. Li J, Wang T, Shao B, Shen J, Wang S, Wu Y. Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potential transfer to agricultural lands. *Environ Health Perspect*. 2012;120(8):1144-1149.
  16. Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, Ammari H, Bakour R. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>* and *bla<sub>NDM-1</sub>* in Algiers hospitals. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(6):438-446.
  17. Park YK, Jung SI, Park KH, Kim DH, Choi JY, Kim SH, et al. Changes in antimicrobial susceptibility and major clones of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex isolates from a single hospital in Korea over 7 years. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 1):71-79.
  18. 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(5):501-506.
  19. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2499-2507.
  20. Güler G, Ercan B. Investigation of fluoroquinolone resistance mechanisms in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(2):278-286.
  21. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol Immunol*. 2005; 49(7):647-653.
  22. Yang H, Hu L, Liu Y, Ye Y, Li J. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in China. *J Chemother*. 2016;28(5): 443-445.
  23. Gu DX, Hu YJ, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC Associated with Quinolone Resistance in *Acinetobacter pittii*. *Microb Drug Resist*. 2015;21(3):345-351.
  24. MJ Jiang, Sh P Zhao, J M Li, FS Zhang. Molecular epidemiological study and detection of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*-related resistance genes. *African J Microbiol Reser*. 2013;7(48):5496-5502.