

Characteristics of Acquired β -lactamase Gene in Clinical Isolates of Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Sun Yang Chung¹, Ji Youn Sung², Kye Chul Kwon,² Jong Woo Park,² Chi Seon Ko,²
So Youn Shin,² Jeong Hoon Song,² Sun Hoe Koo²

¹Health Promotion Center, Samsung Medical Center, Seoul,

²Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

Background: Recently, there have been reports of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. To determine the mechanism of the resistance, we investigated the prevalence of Ambler class A and D β -lactamases, their extended-spectrum derivatives, and class B and D carbapenemase in multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates.

Methods: During the period of March 2006 to May 2007, clinical isolates of multidrug-resistant *P. aeruginosa* were collected from patients in Chungnam National University Hospital, Daejeon, Korea. Inhibitor-potentiated disk diffusion tests were used for the screening of metallo- β -lactamase (MBL) production. PCR and DNA sequencing were conducted for the detection of β -lactamase genes. We also employed the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR method for an epidemiologic study.

Results: A total of 37 consecutive, non-duplicate, multidrug-resistant *P. aeruginosa* were isolated. Twenty-nine of 37 isolates harbored bla_{OXA-10} (56.8%), bla_{OXA-2} (18.9%), and bla_{OXA-1} (5.4%). Only one iso-

late produced IMP-1, and it also harbored bla_{OXA-1} . None harbored Ambler class A β -lactamase or class D carbapenemase. The strains producing OXA type β -lactamases showed a significantly higher resistance to aminoglycoside compared to non-producers. The ERIC-PCR pattern of the 19 OXA-10 producing strains indicated that the isolates were closely related in terms of clonality.

Conclusion: OXA type β -lactamases are the most prevalent among the acquired β -lactamases produced by multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolated at a university hospital in Chungcheong Province. Besides β -lactam antibiotics, the strains harboring OXA type β -lactamase showed a significantly higher resistance to aminoglycoside and quinolone. (Korean J Clin Microbiol 2008;11:98-106)

Key Words: Multidrug resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, OXA type β -lactamase, Metallo- β -lactamase (MBL)

서 론

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 호기성 포도당 비발효 그람음성 간균으로 병원감염의 주요 원인균이다. 녹농균에 의한 감염은 대부분 기회감염이며, 외이도염, 골수염, 뇌수막염, 십내막염, 폐렴, 요로감염, 균혈증 등 다양한 감염증을 유발한다[1].

녹농균에 의한 감염증의 치료에는 이 세균에 비교적 강한 항균력을 지닌 β -lactam계열의 항균제인 ceftazidime, cefepime 및 carbapenem 등의 약제가 사용되고 있다. 그러나, 최근 cefepime이나 carbapenem에도 내성을 보이는 다제내성 녹농균의 감염이 증가하고 있어 많은 문제가 되고 있다[2]. 2003년

KONSAR surveillance 조사에 의하면 imipenem 내성인 녹농균의 비율이 20%로 높았고, 이중 대부분은 다제내성 균이었다[3]. 녹농균이 cefepime이나 carbapenem에 대한 내성을 획득하는 기전 중 하나가 Ambler class A와 D에 속하는 extended spectrum β -lactamase (ESBL)의 생성 혹은 class B와 D에 속하는 carbapenemase의 생성이다[4].

Class A에 속하며 장내세균에 의해 흔히 생성되는 TEM형 및 SHV형 ESBL은 드물지만 녹농균에서도 생성되는 것으로 알려져 있다[5]. VEB형[6] 및 cephalosporin계 항균제에 강한 분해활성을 갖는 PER-1형[7] 또한 녹농균에서 검출된 바 있다. 그러나 녹농균에서 주로 보고되는 ESBL은 class D에 속하는 OXA형 β -lactamase로 우리나라에도 널리 퍼져 있으며 ESBL인 OXA-17 생성 녹농균도 보고된 바 있다[8,9].

녹농균이 생성하는 carbapenemase에는 2000년 남아프리카 공화국에서 분리된 녹농균에서 처음 보고된 class A의 GES형 ESBL[10], class B metallo- β -lactamase (MBL), 그리고 class D

Received 31 January, 2008, Accepted 20 August, 2008

Correspondence: Sun Hoe Koo, Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital, 640, Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon, Korea. (Tel) 82-42-280-7798, (Fax) 82-42-257-5365, (E-mail) shkoo@cnu.ac.kr

의 OXA형 carbapenemase들이 있다.

이중 가장 강력한 carbapenemase인 MBL은 1988년 일본에서 처음 발견되었으며[11], imipenem을 가수분해하는 효소라는 의미에서 IMP-1으로 명명되었다[12]. 그 후 일본을 비롯한 여러 나라에서 VIM형[13,14], SPM-1형[15], GIM-1형[16], 그리고 SIM-1형[17]등의 MBL이 보고되었다.

Class D의 OXA형 carbapenemase는 1985년에 스코틀랜드에서 분리된 imipenem 내성 *Acinetobacter baumannii*에서 처음 확인되었으며[18] 지금은 유럽, 아시아, 브라질 등 전세계적으로 확산되었으며[19], 국내에서도 2005년도에 분리된 녹농균에서 검출된 바 있다[20].

다제내성 녹농균의 출현 및 확산은 이 세균에 의한 감염증 치료에 많은 어려움을 가중시킬 수 있으므로 임상적으로 중요한 문제이다. 녹농균이 다제내성을 보이는 중요한 원인중의 하나가 β -lactamase 생성에 의한 획득 내성이므로 다제내성 녹농균을 대상으로 β -lactamase의 생성을 규명하는 것은 내성기전을 연구하는데 중요하다. 본 연구에서는 충청지역에서 분리된 다제내성 녹농균을 대상으로 Ambler class A와 D에 속하는 ESBL과 class B와 D에 속하는 carbapenemase의 대표적인 유전형들을 규명하여 내성세균의 확산을 방지하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2006년 3월부터 2007년 5월까지 충남대학교 의과대학병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체 분리 녹농균 중 다제내성을 보인 37주를 대상으로 하였다. 분리된 녹농균이 광범위 항균제인 cefepime, amikacin, ciprofloxacin, piperacillin / tazobactam과 meropenem 중 3가지 이상의 항균제에 내성을 보일 경우 다제내성균으로 정하였다[21]. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 시험

미국의 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라[22] amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, ceftazidime, imipenem, piperacillin, ticarcillin, 및 ciprofloxacin (BBL, Cockeysville, MD, USA)과 aztreonam, cefepime, meropenem, piperacillin-tazobactam, 및 ticarcillin-clavulanic acid (Oxoid, Cambridge, UK)에 대한 감수성을 Mueller-Hinton 한천 배지(Difco, Cockeysville, MD, USA)를 사용하여 디스크 확산법으로 확인하였다. 항균제에 대한 최소억제농도(minimum in-

hibitory concentration, MIC)는 Mueller-Hinton 액체배지 (BBL)를 사용하여 액체미량희석법으로 구하였다. Amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, aztreonam 및 piperacillin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외 사용한 항균제는 ceftazidime (한미약품, 서울, 한국), cefepime (보령제약, 서울, 한국), imipenem (MSD, Elkton, VA, USA), meropenem (AstraZeneca, Cheshire, UK), ticarcillin 및 ciprofloxacin (ICN Biomedicals Inc, Costa, Mesa, CA, USA)이었다. 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위에 드는지 확인하였다.

3. Inhibitor-potentiated disk diffusion (IPD) 방법을 이용한 Metallo- β -lactamase 생성 선별 검사

다제내성 녹농균을 대상으로 IPD 검사[23] 실시하여 MBL 생성 균주를 선별하였다. MacConkey 한천 배지(Difco)에서 35°C, 24시간 동안 배양한 균 집락을 풀어 McFarland 표준액 0.5에 맞춘 후 균액을 Mueller-Hinton 한천배지에 접종하였다. 접종한 균액이 마른 후 두 개의 10 μ g imipenem disk를 두 디스크 중심간의 거리가 4~5 cm간격이 되게 하여 배지 위에 올려놓고 두 개 중 한 개의 디스크에만 0.5 M EDTA용액 10 μ l를 분주하였다. 35°C, 18시간 배양한 다음 억제대를 판독하여 imipenem과 imipenem-EDTA 디스크의 억제대 차가 7 mm 이상인 균주를 MBL 생성 선별검사의 양성으로 판단하였다[23].

4. 분자생물학적 방법에 의한 β -lactamase 유전형 확인

β -lactamase의 유전형을 분석하기 위해 이미 보고된 바 있는 기존의 시발체를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다(Table 1). 대상 균주를 brain heart infusion 액체배지(Difco, Cockeysville, MI, USA)에 접종하여 37°C로 하룻밤 배양한 후 DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 배양액으로부터 DNA를 추출하였다. DNA 추출액(5 μ L), 10 \times Taq buffer (2.5 μ L), 10 mM dNTP mix (0.5 μ L), primer 각 10 pmol, 0.7U Taq DNA polymerase (솔젠트, 대전, 한국) 및 증류수를 혼합하여 25 μ L의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 20초, 59°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 70°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)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.

Table 1. Oligonucleotides used as primers for amplification and sequencing

Enzyme Class	Primer pairs	Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Class A	TEM F	<i>bla</i> _{TEM} and derivative	ATGAGTATTCAACATTTCCGT	861	24
	TEM R		TTACCAATGCTTAATCAGTGA		
	SHV F	<i>bla</i> _{SHV} and derivative	CCGGGTATTCTTATTTGTCGCT	831	24
	SHV R		TAGCGTTGCCAGTGCTCG		
	PER F	<i>bla</i> _{PER}	GTTAATTTGGGCTTAGGGCAGA	855	26
	PER R		CAGCGCAATCCCCACTGT		
	VEB F	<i>bla</i> _{VEB}	CGACTTCCATTTCCCGATGC	650	25
	VEB R		GGACTCTGCAACAAATACGC		
	GES F	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{IBC}	GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT	903	24
	GES R		TGTCCGTGCTCAGGATGAGT		
Class B	IMP F	<i>bla</i> _{IMP}	CATGGTTTGGTGCTTCTGT	488	27
	IMP R		ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
	VIM F	<i>bla</i> _{VIM}	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780	27
	VIM R		TGCTACTCAACGACTGAGCG		
	SIM F	<i>bla</i> _{SIM}	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	569	31
	SIM R		TGGCCTGTCCCATGTGAG		
	SPM F	<i>bla</i> _{SPM}	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798	31
	SPM R		CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
	GIM F	<i>bla</i> _{GIM}	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72	31
	GIM R		CGGAACGACCATTGAATGG		
Class D	OXA-1F	<i>bla</i> _{OXA} group III	AGCCGTTAAAATTAAGCCC	908	28
	OXA-1R		CTTGATTGAAGGGTTGGGCG		
	OXA-2F	<i>bla</i> _{OXA} group II	GCCAAAGGCACGATAGTTGT	700	29
	OXA-2R		GCGTCCGAGTTGACTGCCGG		
	OXA-10F	<i>bla</i> _{OXA} group I	TCTTTCGAGTACGGCATTAGC	760	25
	OXA-10R		CCAATGATGCCCTCACTTTCC		
	OXA-23F	<i>bla</i> _{OXA-23} , 27, 49	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	1,058	27
	OXA-23R		TCACAACAACATAAAAGCACTG		
	OXA-24F	<i>bla</i> _{OXA-24} , 25, 26, 40, 72	GTACTAATCAAA GTTGTAAG	825	27
	OXA-24R		TTCCCCTAACATGAATTTGT		
	OXA-58F	<i>bla</i> _{OXA-58}	CGATCAGAATGTTCAAGCGC	528	30
	OXA-58R		ACGATTCTCCCCTCTGCGC		

Abbreviations: F, forward; R, reverse.

5. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC PCR)에 의한 역학적 연관성 조사

DNA purification kit (Promega)로 대상 균주의 DNA를 추출하여 주형 DNA로 사용하였다. Primer로는 ERIC1R (5'-ATGT AAGCTCCTGGGGA-TTCAC-3')과 ERIC2 (5'-AAGTAAGTG ACTGGGGTGAGCG-3')로 명명된 장내세균의 반복 서열을 사용하였다[32]. 증폭반응은 DNA 추출액 (5.0 µL), 10× Taq buffer (5.0 µL), 10 mM dNTP mix (1.0 µL), primer 각 20 pmol, 1.4U Taq DNA polymerase (솔젠트) 및 증류수를 혼합하여 50 µL의 혼합액으로 시행하였다. 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 92°C에서 50초, 52°C에서 55초, 70°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 70°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 증폭산물 (10 µL)은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동 한 후 BioDoc-14TM Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이

용하여 분석하였다. Band의 강도와 상관없이 band의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 밴드 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다[33].

결 과

1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 37주의 다제내성 녹농균이 환자의 임상검체에서 분리되었으며, amikacin 91.9%, gentamicin 97.3%, netilmicin 91.9%, tobramycin 86.5%, aztreonam 56.8%, ceftazidime 75.7%, cefepime 78.4%, imipenem 67.6%, meropenem 67.6%, piperacillin 54.1%, piperacillin-tazobactam 48.6%, ticarcillin 97.3%, ticarcillin-clavulanic acid 83.8%, 그리고 ciprofloxacin 94.6%의 내성율을 보였다(Table 2).

Table 2. Antibiotic susceptibility profiles and β -lactamases of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Isolates	Antibiotic susceptibilities														β -lactamase
	AMK	GEN	NET	TOB	ATM	CAZ	FEP	IPM	MEM	PIP	TZP	TIC	TIM	CIP	
P2	R	R	R	R	R	I	I	R	R	S	S	R	R	R	OXA-10 OXA-10
P3	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	
P4	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	
P5	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	
P7	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
P15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	OXA-2
P17	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	R	OXA-2, OXA-10
P18	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	OXA-1, IMP OXA-10 OXA-2 OXA-2 OXA-2
P21	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	
P23	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
P25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	
P26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
P29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	OXA-2
P31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	OXA-2
P34	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	OXA-2
P35	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	R	R	R	OXA-10 OXA-2 OXA-2 OXA-10 OXA-2
P40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
P41	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	S	
A2	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	
A3	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	
A8	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	OXA-10
A9	R	R	S	R	I	R	R	I	I	S	S	R	S	R	OXA-10
A10	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	R	R	R	OXA-10
A11	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	OXA-10
A13	R	R	R	S	I	I	I	R	R	S	S	S	R	R	OXA-10
A14	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	OXA-10 OXA-10 OXA-10 OXA-10 OXA-2
A15	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	S	R	R	R	
A16	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	
A18	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	
A19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
A26	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	OXA-2
A32	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	OXA-10 OXA-10 OXA-10 OXA-10 OXA-10
A36	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	
A41	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	
A42	R	R	R	R	I	R	R	I	I	S	S	R	R	R	
A43	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	
A50	R	R	S	R	S	S	R	R	I	S	S	R	S	R	OXA-1

Abbreviations: AMK, amikacin; GEN, gentamicin; NET, netilmicin; TOB, tobramycin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM meropenem; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; TIC, ticarcillin; TIM, ticarcillin-clavulanic acid; CIP, ciprofloxacin.

Table 3. Prevalence of Ambler class A, B, and D β -lactamases in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Class	Type of β -lactamases	No.(%) of isolates
Class B	IMP-1	1 (2.7)*
Class D	OXA-1	2 (5.4)*
	OXA-2	7 (18.9) [†]
	OXA-10	20 (54.1) [†]
Combined	IMP and OXA-1	1 (2.7)*
	OXA-2 and OXA10	1 (2.7) [†]
Not detected		9 (24.3)

*P23 strain: IMP-1 was combined with OXA-1; [†]P17 strain: OXA-2 was combined with OXA-10.

2. IPD방법을 이용한 MBL 생성 녹농균 선별

대상균주 37주 중 한 주인 P23만이 MBL 생성 선별검사서에서 양성을 보였으며 imipenem 디스크에서 생긴 억제대 보다 imipenem에 EDTA를 넣어준 디스크에서 생긴 억제대 크기가 10 mm 더 컸다.

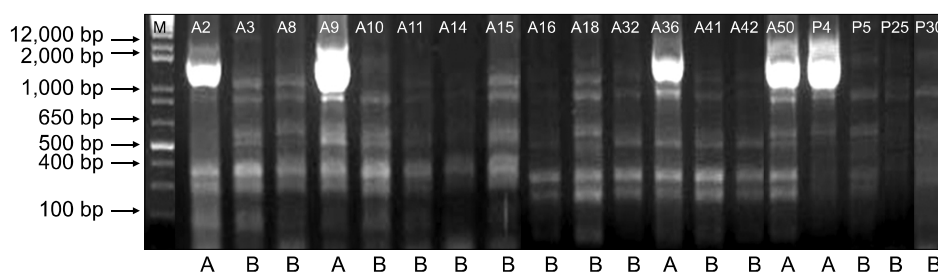
3. β -lactamase 유전형

IPD 검사에서 양성반응을 나타낸 P23주를 대상으로 MBL 유전자 검출을 위한 PCR을 수행한 결과 P23주는 *bla*_{IMP}에만 양성반응을 보였고 그 외의 MBL 유전자(*bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM})에는 음성반응을 보였다.

Table 4. Comparison of the antimicrobial resistance (%) between the class D β -lactamase producers and non-producers

Antimicrobial agents	Class D β -lactamase producers (N=28)			Class D β -lactamase non-producers (N=9)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistant (%)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistant (%)
AMK	≥64	≥64	100	≥64	≥64	66.7
GEN	≥16	≥16	100	≥16	≥16	88.9
NET	≥32	≥32	92.9	≥32	≥32	88.9
TOB	≥16	≥16	100	≤4	≥16	44.4
ATM	16	≥32	46.4	≥32	≥32	88.9
CAZ	≥32	≥32	82.1	≥32	≥32	55.6
FEP	≥32	≥32	82.1	≥32	≥32	55.6
IPM	≥16	≥16	57.1	≥16	≥16	100
MEM	≥16	≥16	57.1	≥16	≥16	100
PIP	≥128	≥128	57.1	≤64	≥128	44.4
TIC	≥128	≥128	100	≥128	≥128	88.9
CIP	≥4	≥4	92.9	≥4	≥4	77.8

Abbreviations : See Table 2.

**Fig. 1.** ERIC-PCR patterns of genomic DNA from clinical isolates of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*_{OXA-10}. Lane M is 1 kb DNA size marker. Nineteen strains of OXA-10 β -lactamase producing clinical isolates show A or B pattern.

Ambler class D β -lactamase 유전자 검출을 위해 총 37주의 다제내성 녹농균을 대상으로 PCR을 한 결과 *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} 그리고 *bla*_{OXA-10}에 대해 각각 2주(5.4%), 7주(18.9%) 및 20주(54.1%)가 양성반응을 보였다. 이 중 한 주(P17)는 *bla*_{OXA-2}과 *bla*_{OXA-10}에 동시에 양성반응을 보였으며, *bla*_{OXA-10}에 양성반응을 보인 20주 중에는 *bla*_{IMP}에 양성을 보인 P23주가 속해있었다. 그 외 class D에 속하는 *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} 및 *bla*_{OXA-58}에 대해서는 대상 균주 모두 음성반응을 보였다. Ambler class A에 속하는 ESBL (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES})을 검출하기 위한 PCR에는 양성반응을 보인 균주가 한 주도 없었다 (Table 3).

대상 균주 중 *bla*_{IMP} 유전자 증폭산물은 IMP-1 유전자의 염기서열과 일치하였다. *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} 및 *bla*_{OXA-10} 유전자 증폭산물의 염기서열은 각각 *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} 및 *bla*_{OXA-10} 유전자와 염기서열이 일치하였다.

4. Class D β -lactamase 생성균주에 대한 항균제 MIC 특성

OXA형 β -lactamase를 생성하는 균주들이 OXA형 β -lactamase를 생성하지 않는 균주들 보다 aminoglycoside계 항균제 (amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin)와 cephalosporin

계 항균제(ceftazidime 및 cefepime)에 대한 내성율이 각각 평균 26.0%와 26.5% 높았다. 또한 quinolone계 항균제(ciprofloxacin)에 대해서도 내성율이 15.1% 높은 것으로 나타났다 (Table 4).

5. ERIC PCR에 의한 역학적 연관성 조사

OXA-10 β -lactamase를 생성하는 녹농균 19주를 대상으로 ERIC PCR을 시험한 결과 1500 bp에서 짧은 밴드를 보인 A형과 2000 bp 이하의 밴드 여섯 개를 보인 B형이 관찰되었다 (Fig. 1).

고 찰

β -lactam 제제는 가장 널리 사용되고 있는 항균제 중 하나로, penicillin, cephalosporin, monobactam 및 carbapenem 등 다양한 계열로 분류되며, 현재 150가지 이상의 β -lactam계 항균제가 임상에서 사용되고 있다[34]. 그러나 이러한 항균제 사용의 증가는 내성세균의 양산이라는 부작용을 동반하였으며, 이들 내성세균의 치료를 위해서 새로운 항균제를 개발하여야 하는 악순환이 되풀이 되어왔다.

그램 음성 간균의 β -lactam 항균제에 대한 내성은 주로 β -lactam 항균제를 가수분해하는 β -lactamase 생성에 의해 나타나는데 특히 획득성 β -lactamase 유전자는 plasmid나 integron에 위치하는 경우가 많아 항균제 내성 유전자의 수평전달을 유도하여 항균제 내성을 급격히 확산시키는 요인이 된다.

본 연구에서는 다제내성 녹농균을 대상으로 획득성 β -lactamase의 유전형질을 분석하였는데 검출된 β -lactamase의 대부분이 class D인 OXA형 β -lactamase들이었다. OXA형 β -lactamase는 oxacillin과 cloxacillin에 대해 강한 활성을 가지는 효소로 녹농균에서 빈번하게 검출되며, 이 효소로부터 유래한 ESBL을 생성하는 세균은 oxyimino cephalosporins에 대해 내성을 갖는다[35]. 본 연구에서는 narrow-spectrum β -lactamase인 OXA-10이 가장 높은 빈도(51.4%)로 검출되었으며 그 다음으로 OXA-2 β -lactamase (13.5%)가 많았다. 반면 OXA형 ESBL은 하나도 검출되지 않았다. 2005년도에 국내에서 분리된 녹농균을 대상으로 조사한 결과에서도[9] class A β -lactamase들에 비해 class D OXA β -lactamase들이 빈번하게 검출이 되었고 그 중 OXA-10의 검출율이 제일 높았으며(13.5%) 그 다음으로 OXA-4 (4.4%), OXA-2 (2.3%) 및 OXA-30 (2.0%)이었다. 반면 대상균주 중 1주(0.3%)만이 OXA형 ESBL을 생성하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 2005년 터키에서도 녹농균을 대상으로 OXA형 β -lactamase들의 빈도를 조사한 결과 OXA-10 β -lactamase의 빈도가 가장 높았던 반면 OXA형 ESBL은 검출되지 않았다고 했다[36]. 그러나 2006년에 대만에서 분리된 OXA형 β -lactamase들을 생성하는 녹농균의 경우 OXA형 ESBL인 OXA-17을 가장 많이 생성했으며 최근 들어 그 비율이 감소하고 있는 중이라고 했다[37]. 녹농균에서 OXA형 β -lactamase의 분리양상은 지역적, 시간적으로 차이를 보이며 국내에서는 OXA형 ESBL의 검출율이 비교적 낮은 것으로 나타났다.

OXA형 β -lactamase 생성주를 대상으로 항균제의 MIC 측정 결과 대상 항균제 중 aztreonam과 carbapenem계 항균제를 제외한 대부분의 항균제에 대해 높은 내성율을 보였다. 특히 aminoglycoside계 항균제에 대한 내성율은 다른 항균제들에 비해 월등하게 높았는데 이는 2006년도에 대만에서[38] 분리된 녹농균에서 보여진 결과와 일치하였다. 또한 국내에서도 class D β -lactamase를 생성하는 녹농균의 경우 aminoglycoside와 quinolone계 항균제에 대해 교차내성을 보인다는 보고가 있다[9].

가장 높은 빈도로 검출된 OXA-10 β -lactamase 생성주를 대상으로 역학적 연관성을 조사하기 위해 ERIC PCR을 실행한 결과 두 개의 pattern이 관찰되었다. 총 19주 중 5주가 A형을 나타냈으며 나머지 14주가 B형을 나타내었는데 이 결과는 이들이 각각 동일한 감염원에서 유래되었음을 추측하게 한다.

다제내성 녹농균이 생성하는 획득성 β -lactamase중 가장 높은 빈도를 차지한 것이 OXA형 β -lactamase인 반면 carbapenemase에 속하는 OXA-23, OXA-24, 및 OXA-58 β -lactamase는

검출되지 않았다. 이들 OXA형 carbapenemase는 *Acinetobacter baumannii*에서는 흔히 생성되는 것으로 알려져 있고 국내에서도 많이 보고가 되었으나[19] 녹농균에서는 드물게 보고가 되고 있다. 국내에서는 2005년에 OXA-23 β -lactamase가 처음으로 녹농균에서 분리된 바 있다[20].

본 연구에서 분리된 획득성 β -lactamase중에 class A에 속하는 β -lactamase는 발견되지 않았다. 2006년도에 국내에서 처음으로 SHV-12 β -lactamase를 생성하는 녹농균이 보고되었으나[39] 그 이외의 class A에 속하는 β -lactamase는 보고된 적이 없다. 녹농균이 TEM형 혹은 SHV형 ESBL을 생성하는 경우는 드문 것으로 알려졌는데, 이는 이들 세균이 광범위 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는데 plasmid성 TEM형 혹은 SHV형 ESBL을 생성하는 것보다 탈억제에 의해서 염색체성 cephalosporinase를 과량 생성하는 것이 더 손쉬운 방법이고[40], 또한 이들 세균이 class D의 OXA형 ESBL을[37] 흔히 생성하기 때문에 TEM 혹은 SHV형 ESBL의 필요성이 장내세균에 비해 상대적으로 낮기 때문인 것으로 추측한다.

한편, IPD방법을 이용한 MBL 생성검사서 P23만이 양성 반응을 보였고 이 균주가 IMP-1형 MBL을 생성함이 밝혀졌다. 일본에서는 IMP-1을 생성하는 그람 음성세균의 분리가 흔한 것으로 알려졌는데 반하여[41], 국내에서의 IMP-1 생성균주의 분리는 흔하지 않았으나 2005년 Yoon 등에 의해 IMP-1형 MBL이 imipenem에 내성인 녹농균 사이에서 확산되고 있음이 보여졌다[20]. 본 연구에서는 총 37주의 다제내성 녹농균중 1주만이 MBL을 생성하였는데, 이는 다제내성의 원인이 MBL 생성에 이외의 다른 요인들에 의한 것임을 추측하게 한다[9]. 최근 일본에서 다제내성 녹농균을 대상으로 분자생물학적 특성을 조사한 결과에 의하면 다제내성이 MBL 및 RND 유출펌프 생성에 의해 유도되기도 하지만 그 보다는 오히려 더 많은 경우가 porin단백의 발현 감소 및 염색체성 cephalosporinase를 과량 생성과 같은 다른 기전들에 의해 유도된다고 했다[42]. 본 연구에서도 이를 뒷받침하는 결과를 보여주었다.

이상의 결과에서 충청지역의 한 대학병원에서 분리된 다제내성 녹농균에 가장 광범위하게 확산되어 있는 획득성 β -lactamase는 OXA형 β -lactamase임을 확인하였다. 또한 OXA형 β -lactamase 유전자가 aminoglycoside 또는 quinolone계통의 항균제에 대한 내성유전자와 동시에 존재할 수 있음을 시사했다. 그러나 본 연구에서 검출된 β -lactamase는 모두 narrow spectrum의 β -lactamase이었으며 P23균주를 제외하고는 carbapenemase도 검출되지 않았다. 이는 녹농균의 다제내성이 획득성 β -lactamase 생성보다는 그 이외의 다른 요인들 즉 염색체성 cephalosporinase의 과량생성, 항균제의 유출(efflux), 또는 porin단백의 발현 감소로 인한 세포막의 투과성 감소 등에 의해 유도되는 것임을 추측하게 한다. 따라서 다제내성 녹농균의 내성기전을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업의 지역 R&D 클러스터사업(B000935) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Bergogne-Berezin E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram-negative bacilli. In: Cohen J and Powerly WG, eds. Infectious Diseases. 2nd ed, New York; Mosby, 2003;2203-17.
- Song W, Woo HJ, Kim JS, Lee KM. In vitro activity of β -lactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2003;21:8-12.
- Lee K, Park KH, Jeong SH, Lim HS, Shin JH, Yong D, et al., KONSAR group. Further increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, amikacin- and fluroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: 2003 KONSAR surveillance. Yonsei Med J 2006;47:43-54.
- McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Infect Control 2006;34:S29-S37.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2385-92.
- Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:573-81.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37: 962-9.
- Chen HY, Yuan M, Livemore DM. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol 1995;43:300-9.
- Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, et al. Prevalence of Ambler class A and D β -lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. J Antimicrob Chemother 2005;56:122-7.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2598-603.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
- Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla_{IMP}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother 2000;44: 1229-35.
- Lauretli L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43: 1584-90.
- Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla_{VIM-2}* cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1053-8.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002;50:673-9.
- Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4654-61.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_(SIM-1)*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91.
- Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:196-9.
- Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000;44: 1556-61.
- Yoon WS, Lee BY, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Jeong TJ, et al. Prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates and mechanisms of resistance. Korean J Clin Microbiol 2005;8: 26-33.
- Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents 2006;27:224-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. M100-S10(M2). Wayne, Pennsylvania; CLSI, 2006.
- Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, et al. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. J Microbiol Methods 2003;54:411-8.
- Kang JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Lee J, Lee WG, et al. Prevalence of ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2005;8:17-25.
- Naas T, Benaoudia F, Massuard S, Nordmann P. Integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. J Antimicrob Chemother 2000; 46:703-11.
- Park JH, Lee SH, Jeong SH, Kim BN, Kim KB, Yoon JD, et al. Characterization and prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing an extended spectrum β -lactamase from Korean hospitals. Korean J Lab Med 2003;23:18-24.
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23- β -lactamase in

- Korea. J Clin Microbiol 2005;43:2241-5
28. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1615-20.
29. De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, et al. Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3031-4.
30. Heritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. J Antimicrob Chemother 2005;55:115-8.
31. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2007;45:544-7.
32. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;19:6823-31.
33. Park KO, Son HC, Bae IK, Jeong SH. Molecular epidemiology of infection caused by OXA-23 or IMP-1 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. Korean J Lab Med 2005;8:121-9.
34. Yao JDC and Moellering RC Jr. Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, et al, eds. Manual for Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999;1474-504.
35. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1362-6.
36. Aktaş Z, Poirel L, Salcıoğlu M, Özcan PE, Midilli K, Bal C, et al. PER-1- and OXA-10-like β -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. Clin Microbiol Infect 2005;11:193-8.
37. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:447-53.
38. Yan JJ, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. OXA-type β -lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2006;39:130-4.
39. Oh SJ, Lee SU, Hwang HY, Bae IK, Jo HS, Lee BH, et al. Prevalence of class A extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Korean J Lab Med 2006;26:14-20.
40. Nordmann P and Guibert M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998;42:128-31.
41. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:824-9.
42. Ohara M, Kouda S, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. Microbiol Immunol 2007;51:271-7.

=국문초록=

임상검체에서 분리된 다제내성 녹농균의 획득성 β -lactamase 유전형 특성

¹삼성서울병원 건강의학센터, ²충남대학교 의과대학 진단검사의학교실
정선양¹, 성지연², 권계철², 박종우², 고지선², 신소연², 송정훈², 구선희²

배경: 최근 cefepime이나 carbapenem계 항균제에도 내성을 보이는 다제내성 녹농균이 증가하고 있다. 저자들은 충청지역에서 분리된 다제내성 녹농균을 대상으로 Ambler class A, B 그리고 D에 속하는 β -lactamase와 그들의 광범위 활성 유도체의 빈도를 조사하고 대표적인 유전형들을 규명하고자 하였다.

방법: 2006년 3월부터 2007년 5월까지 충남대학교 병원 환자의 임상검체에서 분리된 다제내성 녹농균을 대상으로 하였다. Metallo- β -lactamase (MBL) 생성은 inhibitor-potentiated disk diffusion 시험으로 확인하였으며 Ambler Class A, B, 그리고 D에 해당하는 β -lactamase 유전자를 검출하기 위해 중합연쇄반응과 염기서열 분석을 하였다. 또한 돌발감염이 있었는지를 알아보기 위해서 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR을 수행하였다.

결과: 시험기간 중 총 37주의 다제내성 녹농균이 환자의 임상검체에서 분리되었다. 37주의 녹농균 중 29주가 *bla*_{OXA-10} (56.8%), *bla*_{OXA-2} (18.9%), 또는 *bla*_{OXA-1} (5.4%)를 가지고 있는 것으로 나타났다. IMP-1을 생성하는 균주는 단 한 주였으며 *bla*_{OXA-1}도 가지고 있었다. Ambler class A β -lactamase와 class D carbapenemase는 검출되지 않았다. OXA형 β -lactamase를 가지고 있는 균주의 경우 그렇지 않은 균주 보다 aminoglycoside계 항균제에 대한 내성율이 더 높은 것으로 나타났다. ERIC-PCR 결과 OXA-10을 생성하는 19주는 유전적으로 매우 밀접한 것으로 나타났다.

결론: 충청지역의 한 대학병원에서 분리된 다제내성 녹농균에 가장 광범위하게 확산되어 있는 획득성 β -lactamase는 OXA형 β -lactamase였다. 그리고 OXA형 β -lactamase를 갖고 있는 균주들은 β -lactam계 항균제뿐 아니라 aminoglycoside계 항균제와 quinolone계 항균제등에 대해 내성 높은 내성율을 보였다. [대한임상미생물학회지 2008;11:98-106]

교신저자 : 구선희, 301-721, 대전광역시 중구 대사동 640
충남대학병원 진단검사의학과
Tel: 042-280-7798, Fax: 042-257-5365
E-mail: shkoo@cnu.ac.kr