

# 임상검체에서 분리된 *Acinetobacter baumannii*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 Class A Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase 생성 현황

오세진 · 이상욱 · 황현웅<sup>1</sup> · 배일권<sup>1</sup> · 조현수<sup>1</sup> · 이병호<sup>1</sup> · 정석훈<sup>1</sup>

고신대학교 의과대학 내과학교실, 진단검사의학교실<sup>1</sup>

## Prevalence of Class A Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*

Se Jin Oh, M.D., Sang Uk Lee, M.D., Hyun Yong Hwang, M.D.<sup>1</sup>, Il Kwon Bae, M.D.<sup>1</sup>, Hyun Soo Jo, M.D.<sup>1</sup>, Byung Ho Lee, M.D.<sup>1</sup>, and Seok Hoon Jeong, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Internal Medicine and Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

**Background :** Prevalence of class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) has been investigated repeatedly in members of family Enterobacteriaceae in Korea, but only rarely in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. The aims of this study were to determine the prevalence of class A ESBL-producing *A. baumannii* and *P. aeruginosa* and to characterize the genotypes.

**Methods :** During the period of June to September 2004, clinical isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were collected from patients in Kosin University Gospel Hospital, Busan, Korea. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion and the agar dilution methods, and ESBL-production by the double-disk synergy test. Transferability of ceftazidime-resistance of ESBL-producers were tested by conjugation. The isoelectric points of ESBLs were determined by isoelectric focusing. Searches for *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER-1</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>, and *bla*<sub>GES/IBC</sub> genes were performed by PCR amplification, and the genotypes of ESBLs were determined by a direct nucleotide sequence analysis of the amplified products.

**Results :** A total of 58 clinical isolates of *A. baumannii* and 77 *P. aeruginosa* were collected. Three (5.2%) isolates of *A. baumannii* and four (5.2%) *P. aeruginosa* isolates showed positive results in the double-disk synergy test using ceftazidime and imipenem disks, and one (1.7%) *A. baumannii* and two (2.6%) *P. aeruginosa* isolates showed positive results in that test using ceftazidime and cefoxitin disks. The most prevalent class A ESBL genotype in *A. baumannii* isolates was *bla*<sub>PER-1</sub> (n=6), and *bla*<sub>SHV-12</sub> gene was also found in one *P. aeruginosa* isolate.

**Conclusions :** It is concluded that class A PER-1 ESBL-producing *A. baumannii* isolates are spreading, and SHV-12-producing *P. aeruginosa* has emerged in Korea. The spread of class A ESBLs could compromise the future usefulness of expanded-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics for the treatment of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* infections. (*Korean J Lab Med* 2006;26:14-20)

**Key Words :** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, Class A ESBL

접 수 : 2005년 9월 22일  
수정본접수 : 2006년 1월 6일  
게재승인일 : 2006년 1월 13일  
교신저자 : 정 석 훈

접수번호 : KJLM1885

## 서 론

우 602-702 부산광역시 서구 암남동 34  
고신대학교복음병원 진단검사의학과  
전화 : 051-990-6373, Fax : 051-990-3034  
E-mail : kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

*Acinetobacter baumannii*와 *Pseudomonas aeruginosa*는 병원 감염의 중요 원인균이다. 이들 포도당 비발효 그람음성간균은 특징적인 세포외막 porin[1]과 염색체성  $\beta$ -lactamase 생성[2]으로

인하여 광범위  $\beta$ -lactam 제제 일부를 포함한 여러 항균제에 내재적 내성이지만, ceftazidime, piperacillin, ticarcillin 등은 이들 세균에 비교적 강한 항균력을 지닌다[3]. Class A의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)는 이들 항균제에 대한 내성을 부여하므로 ESBL을 생성하는 A. baumannii나 P. aeruginosa의 확산은 임상적으로 심각한 위협이 된다[4].

장내세균과의 세균들은 TEM형 및 SHV형 ESBL을 흔히 생성하지만 A. baumannii나 P. aeruginosa는 이들 효소를 드물게 생성하는 것으로 알려졌다[5]. 프랑스에서 분리되는 P. aeruginosa의 1.9%만이 TEM형 효소를 생성한다고 하며[6], TEM-4, TEM-21, TEM-24 및 TEM-42를 생성하는 P. aeruginosa가 보고되었다[7-10]. SHV형 효소를 생산하는 P. aeruginosa가 프랑스[11] 및 태국[12]에서, SHV-12를 생성하는 A. baumannii가 중국[13]에서 각각 보고되었으나, 국내에서 분리되는 A. baumannii나 P. aeruginosa의 TEM형 혹은 SHV형 ESBL 생성 현황에 관한 보고는 아직 없다.

PER-1은 1993년에 P. aeruginosa에서 검출되었으며[14], 터키 및 이태리에서 이 효소를 생산하는 Acinetobacter와 P. aeruginosa가 보고되었다[15, 16]. Yong 등[17]과 김 등[18]은 PER-1을 생성하는 Acinetobacter를 보고하였으나, 이 효소를 생성하는 P. aeruginosa는 아직 국내에서 보고된 바 없다. VEB-1은 1999년 프랑스의 병원에 입원한 베트남 환자의 검체에서 분리된 Escherichia coli에서 처음 검출되었으며[19], 국내에서는 VEB-1 생성 Proteus mirabilis에 의한 감염의 집단발생이 보고된 바 있으나[20], 이 효소를 생성하는 A. baumannii나 P. aeruginosa는 아직 보고된 바 없다. GES형 ESBL의 경우 GES-1은 2000년 프랑스에서 분리된 Klebsiella pneumoniae, GES-2는 남아프리카공화국에서 분리된 P. aeruginosa, GES-3와 GES-4는 2004년 일본에서 분리된 K. pneumoniae에서 처음 검출되었다[21-24].

국내에서 분리되는 E. coli나 K. pneumoniae의 class A ESBL 생성현황에 대해서는 여러차례 조사가 있었지만, A. baumannii나 P. aeruginosa의 이들 효소 생성 현황에 대한 조사는 매우 드물다. 본 연구에서는 부산의 한 삼차병원에서 분리된 A. baumannii와 P. aeruginosa를 대상으로 TEM, SHV, PER, GES, VEB, IBC 등 class A의 ESBL 생성 현황을 조사하며, 이들 세균이 지닌 ESBL의 유전형질을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집

2004년 6-9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 A. baumannii와 P. aeruginosa를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균

주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)로 확인하였다.

### 2. 항균제 감수성 시험

미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 기준에 따라서 ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, cefotetan, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole 및 tetracycline (BBL, Cockeysville, Mich., USA)에 대한 감수성을 디스크 확산법[25]으로 확인하였다. 항균제의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 NCCLS 한천희석법[26]으로 측정하였다. 시험 항균제로는 piperacillin (유한, 군포), piperacillin-tazobactam (한국와이어스, 서울), ceftazidime (한미, 화성), ceftazidime-clavulanic acid, cefotaxime (한독, 서울), cefotaxime-clavulanic acid 및 cefepime (보령, 안산)을 사용하였다. Clavulanic acid의 농도는 4  $\mu$ g/mL로 고정하였다. E. coli ATCC 25933을 표준균주로 사용하였다.

### 3. ESBL 생성 균주 선별

Double-disk synergy 법으로 class A ESBL 생성하는 균주를 선별하였다[5]. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천(Difco, Cockeysville, Mich., USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 ceftazidime 30  $\mu$ g 디스크, 주위에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10  $\mu$ g), imipenem (30  $\mu$ g) 및 cefoxitin (30  $\mu$ g, BBL) 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. GES/IBC, PER, VEB 등 일부 non-TEM, non-SHV ESBL은 clavulanic acid뿐 아니라 cefoxitin 혹은 imipenem에 의해서 활성이 억제되기 때문에 이들 디스크 모두를 사용하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

### 4. 접합에 의한 내성 전달

Filter mating 법[27]으로 시험하였으며, azide 내성인 A. baumannii YMC02/8/P534[17] 혹은 P. aeruginosa PA04089Rp[28]을 내성수여자로 사용하였다. 내성공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (Difco) 액체배지에 접종하여서 3시간 진탕배양하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37°C로 1시간 배양 후, ceftazidime 8  $\mu$ g/mL와 azide 100  $\mu$ g/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. 37°C에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위해서 transconjugant의 ceftazidime에 대한 감수성을 디스크

확산법으로 확인하였다.

### 5. Isoelectric focusing (IEF)에 의한 등전점(pI) 측정

세균 추출액 10  $\mu$ L와 동량의 sample buffer (TEFCO Corporation, Tokyo, Japan)를 섞어 agarose gel (pH 3-10, TEFCO Corporation)에 100 V로 1시간, 200 V로 1시간 및 300 V로 40 분간 전기영동하였다. Nitrocefin (Oxoid, Hampshire, England)에 적신 여과지로 gel을 덮고 20초간 염색하였다. Gel에 나타난

**Table 1.** Antimicrobial susceptibilities of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates

Antimicrobial agents	% Susceptibility			
	<i>A. baumannii</i> (n=58)		<i>P. aeruginosa</i> (n=77)	
	Intermediate	Resistant	Intermediate	Resistant
Ampicillin	3.4	94.9	ND	ND
Ampicillin-sulbactam	3.5	14.6	ND	ND
Piperacillin	7.0	24.6	0.0	39.0
Piperacillin-tazobactam	0.0	21.1	0.0	37.8
Cefoxitin	7.3	87.2	ND	ND
Cefotetan	3.6	94.6	ND	ND
Ceftazidime	5.2	25.8	5.2	29.9
Cefotaxime	60.3	32.7	36.9	58.7
Cefepime	5.2	22.4	10.0	26.0
Aztreonam	27.6	67.2	20.8	29.9
Imipenem	0.0	24.1	13.0	31.2
Meropenem	0.0	24.1	3.9	40.3
Amikacin	0.0	27.6	2.6	29.6
Gentamicin	0.0	29.4	2.6	46.0
Tobramycin	0.0	29.8	0.0	44.2
Ciprofloxacin	1.7	24.0	ND	ND
Trimethoprim-sulfamethoxazole	7.0	26.3	ND	ND
Tetracycline	0.0	23.6	ND	ND

Abbreviations: ND, not done.

**Table 2.** Characteristics of double-disk synergy-positive *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates

DDS (+) with	Isolate	Species	Specimen	MICs ( $\mu$ g/mL)				
				PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA*	FEP
Imipenem disk	K20653	<i>A. baumannii</i>	Sputum	256	32	128	256	32
	K22565	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	8	4
	K22898	<i>A. baumannii</i>	Urine	4	1	2	2	1
	K18885	<i>P. aeruginosa</i>	Urine	32	32	128	256	32
	K19135	<i>P. aeruginosa</i>	Urine	16	8	128	256	32
	K24002	<i>P. aeruginosa</i>	Urine	32	8	128	256	32
	K24857	<i>P. aeruginosa</i>	Pus	64	32	>256	>256	128
Cefoxitin disk	K24931	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	32	32	16
	K23180	<i>P. aeruginosa</i>	Sputum	1	1	1	2	8
	K23413	<i>P. aeruginosa</i>	Sputum	8	4	2	4	4

\*clavulanic acid at a fixed concentration of 4  $\mu$ g/mL.

Abbreviations: DDS (+), double-disk synergy-positive; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime-clavulanic acid; FEP, cefepime.

붉은색의 band를 관찰하여  $\beta$ -lactamase의 pI를 확인하였다.

### 6. 분자생물학적 방법에 의한 내성유전형 확인

PCR로 class A ESBL의 유전형을 시험하였다. Ryoo 등[29]이 고안한 primer로 TEM, SHV, CTX-M, PER, GES/IBC 및 VEB형  $\beta$ -lactamase 유전자를 검출하기 위한 시험을 하였다. 시험세균으로 PCR 반응액을 만든 후 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)으로 94°C로 30초간 denaturation, 58°C로 1분간 annealing, 72°C로 1분간 extension하는 30 cycle의 PCR를 시행하여 증폭산물의 band를 확인하고, PCR 증폭산물을 추출하여서 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, Oh., USA)를 이용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다[30].

## 결 과

### 1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 58주의 *A. baumannii*와 77주의 *P. aeruginosa*가 환자의 임상검체에서 검출되었다. *A. baumannii*의 piperacillin, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam, imipenem 및 meropenem에 대한 내성율은 각각 24.6%, 25.8%, 32.7%, 22.4%, 67.2%, 24.1% 및 24.1%였으며, *P. aeruginosa*의 이들 항균제에 대한 내성률은 각각 39.0%, 29.9%, 58.7%, 26.0%, 29.9%, 31.2% 및 40.3%이었다(Table 1).

### 2. Double-disk synergy 시험 및 접합에 의한 내성 전달

*A. baumannii* 3주(5.2%)와 *P. aeruginosa* 4주(5.2%)는 imi-

penem과 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였으며, *A. baumannii* 1주(1.7%)와 *P. aeruginosa* 2주(2.6%)는 cefoxitin과 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였다. Amoxicillin-clavulanic acid 와 ceftazidime 디스크 사이에 synergy를 보인 균주는 없었다(Table 2, Fig. 1). 대상 균주 중 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa* 각 1주의 ceftazidime 내성이 recipient에게로 전달되었다.

### 3. Class A ESBL 유전형

*bla*<sub>TEM</sub> 유전자 검출을 위한 PCR에는 *A. baumannii* 21주(36.2%)와 *P. aeruginosa* 7주(9.1%), *bla*<sub>SHV</sub> 유전자 검출을 위한 PCR에는 *P. aeruginosa* 1주(1.3%), *bla*<sub>PER-1</sub> 유전자 검출을 위한 PCR에는 *A. baumannii* 6주(10.3%)가 양성반응을 보였다. *bla*<sub>GES</sub> 혹은 *bla*<sub>VEB</sub> 유전자 검출을 위한 PCR에 대상균주 모두 음성반응을 보였다. Double-disk synergy 양성인 균주 중 K22898에서만 TEM-116이 검출되었을 뿐, 다른 균주에서는 class A  $\beta$ -lactamase 유전자가 검출되지 않았다.

대상균주 중 *A. baumannii* 13주와 *P. aeruginosa* 3주의 *bla*<sub>TEM</sub> 유전자 증폭산물은 *bla*<sub>TEM-1</sub> 유전자의 84번째 아미노산 valine (ggt)이 isoleucine (att), 184번째 아미노산 alanine (gca)이 valine



Fig. 1. An example of double disk synergy obtained with an *A. baumannii* isolate producing Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Two 30  $\mu$ g-antibiotics disks (left, imipenem; right, cefoxitin) were placed 1.5 cm apart (margin to margin) around a disk containing 30  $\mu$ g of ceftazidime.

(gta)으로 각각 치환된 *bla*<sub>TEM-116</sub> 유전자였으며(Table 3), *A. baumannii* 8주와 *P. aeruginosa* 4주의 증폭산물은 *bla*<sub>TEM-1</sub> 유전자의 염기서열과 일치하였다. *P. aeruginosa* K19204에서 검출된 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자 증폭산물의 염기서열은 *bla*<sub>SHV-1</sub> 유전자의 35번째 아미노산 leucine (cta)이 glutamine (caa), 238번째 아미노산 glycine (ggc)이 serine (agc), 240번째 아미노산 glutamic acid (gag)이 lysine (aag)로 각각 치환된 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자와 일치하였다. *A. baumannii* 6주에서 검출된 *bla*<sub>PER-1</sub> 유전자 증폭산물은 *bla*<sub>PER-1</sub> 유전자와 염기서열이 일치하였다. IEF를 통하여 TEM-116, SHV-12 및 PER-1에 해당하는 pI 5.4, 8.2 및 5.3의 band를 확인할 수 있었다.

### 4. Class A ESBL 생성균주에 대한 항균제 MIC 특성

*bla*<sub>PER-1</sub> 유전자를 지닌 *A. baumannii* 6주 중 5주에 대한 pi-

Table 3. Characteristics of TEM-116-producing *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates

Isolate	Species	Specimen	MICs ( $\mu$ g/mL)				
			PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA*	FEP
K21919	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	16	4
K22538	<i>A. baumannii</i>	Bile	16	4	16	16	8
K22615	<i>A. baumannii</i>	Sputum	>256	16	32	16	64
K22709	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	8	4
K22899	<i>A. baumannii</i>	Urine	4	1	2	2	1
K22842	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	8	4
K23145	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	8	4
K23308	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	8	8	4
K23499	<i>A. baumannii</i>	Sputum	16	4	4	8	2
K18396	<i>A. baumannii</i>	Pus	>256	128	256	>256	64
K18480	<i>A. baumannii</i>	Sputum	>256	128	256	>256	64
K18843	<i>A. baumannii</i>	Bile	256	32	128	256	128
K19583	<i>A. baumannii</i>	Sputum	>256	128	>256	>256	64
K25430	<i>P. aeruginosa</i>	Sputum	16	8	8	16	32
K24686	<i>P. aeruginosa</i>	Urine	>256	256	32	64	>256
K19204	<i>P. aeruginosa</i>	Pus	>256	256	32	64	>256

\*clavulanic acid at a fixed concentration of 4  $\mu$ g/mL.

Table 4. Characteristics of SHV-12 or PER-1-producing *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates

Genotype	Isolate	Species	Specimen	Underlying disease	Prognosis	MICs ( $\mu$ g/mL)				
						PIP	TZP	CAZ	CAZ/CLA*	FEP
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	K19204	<i>P. aeruginosa</i>	Pus	Rectal cancer	Improved	>256	256	32	64	>256
<i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	KB2660	<i>A. baumannii</i>	Blood	Bronchogenic cancer	Improved	16	4	4	8	4
	KB2919	<i>A. baumannii</i>	Blood	Stomach cancer	Expired	16	4	4	8	4
	K20936	<i>A. baumannii</i>	Sputum	Pulmonary tuberculosis	Improved	16	8	8	16	4
	K21866	<i>A. baumannii</i>	Sputum	Stomach cancer	Improved	16	4	8	16	8
	K23417	<i>A. baumannii</i>	Sputum	Epidural hemorrhage	Improved	16	4	8	8	4
	K20039	<i>A. baumannii</i>	Sputum	Paroxysmal supraventricular tachycardia	Improved	>256	128	>256	>256	>256

\*clavulanic acid at a fixed concentration of 4  $\mu$ g/mL.

Abbreviations: PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime-clavulanic acid; FEP, cefepime.

peracillin, ceftazidime 및 cefepime의 MIC는 각각 16  $\mu\text{g/mL}$ , 4-8  $\mu\text{g/mL}$  및 4-8  $\mu\text{g/mL}$ 로 유사한 분포를 보였으나, 1주 (K20039)에 대한 이들 항균제의 MIC는 각 256  $\mu\text{g/mL}$  이상으로 높았다. *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자를 지닌 *P. aeruginosa* K19204에 대한 이들 광범위 항균제의 MIC는 각각 >256, 32, 및 >256  $\mu\text{g/mL}$ 였다(Table 4).

## 고 찰

시험기간 중 분리된 *A. baumannii*의 ceftazidime, cefotaxime, cefepime 및 aztreonam에 대한 내성률은 각각 25.8%, 32.7%, 22.4% 및 67.2%로 2003년 전국 12개 병원을 대상으로 한 내성률 조사[31]의 58%, 73%, 55% 및 81%보다 낮은 분포를 보였다. 다만 imipenem에 대한 내성률은 24.1%로 2003년 조사의 23%와 비슷한 분포를 보였다. 한편 본 연구의 *P. aeruginosa*의 ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam 및 imipenem에 대한 내성율은 각각 29.9%, 58.7%, 26.0%, 29.9% 및 31.2%로 2003년 조사의 21%, 76%, 25%, 33% 및 25%와 유사한 분포를 보였다.

PER-1은 국내에서 분리되는 *A. baumannii*가 cefepime에 대한 내성을 획득하는 중요한 기전 중 하나로 알려졌으며, 서울의 한 종합병원에서 분리된 cefepime 내성 *A. baumannii* 중 86.9% (53/61)가 이 효소를 생성하였다고 한다[17]. 본 연구에서는 PER-1을 생성하는 *A. baumannii*가 6주 만에 분리되어서 고신대학교 복음병원에서는 이 내성균주가 확산되는 초기임을 추측할 수 있었다. 본 연구에서 분리된 PER-1 생성 *A. baumannii* 6주 중 5주에 대한 광범위  $\beta$ -lactam 항균제의 MIC는 비교적 낮은 분포를 보였으나, 1주(K20039)에 대한 MIC는 대단히 높아서 이 세균이 다른 내성 기전을 지니고 있음을 시사하였고, 추가적인 실험을 통하여 이 균주는 class B metallo- $\beta$ -lactamase의 일종인 VIM-2를 생성함을 확인할 수 있었다(data not shown). 터키 등지에서는 PER-1을 생성하는 *P. aeruginosa*가 분리되었으나 국내에서는 아직 분리된 바 없으며[15], 본 연구에서도 이 세균의 분리를 시도하였으나 검출되지 않았다.

*P. aeruginosa*나 *A. baumannii*가 TEM형 혹은 SHV형 ESBL을 생성하는 경우는 드문 것으로 알려졌는데, 이는 이들 세균이 광범위  $\beta$ -lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는데 plasmid성 TEM 혹은 SHV형 ESBL을 생성하는 것보다 탈억제에 의해서 염색체성 cephalosporinase를 과량생성하는 것이 더 손쉬운 방법이고[6], 또한 이들 세균이 class B의 IMP 혹은 VIM형 metallo- $\beta$ -lactamase[32]나 class D의 OXA형 ESBL[33, 34]을 흔히 생성하기 때문에 TEM 혹은 SHV형 ESBL의 필요성이 장내세균에 비해 상대적으로 낮기 때문인 것으로 추측한다. 본 연구에서도 TEM형 ESBL은 검출되지 않았으며, SHV-12를 생성하는 *P. aeruginosa* 1주만이 검출되었다. 저자 등은 총 16주에서 검출

된 TEM-116을 ESBL로 간주하지 않았는데[35], 이는 본 연구진이 시행한 타 실험에서 *bla*<sub>TEM-116</sub> 유전자 transformant 5주에 대한 ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam의 MIC가 모두 0.06-2  $\mu\text{g/mL}$ 로 낮아서 TEM-116이 이들 광범위  $\beta$ -lactam 항균제에 대한 내성을 제공한다는 증거를 찾을 수 없었기 때문이다(data not shown). 향후 TEM-116의 기질특이성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

SHV-12는 스위스에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 처음 검출되었다[36]. 이 효소는 SHV-1의 아미노산 3개가 치환된(Leu35Gln, Gly238Ser 및 Glu240Lys) 것이며, SHV-2a 혹은 SHV-5와는 각각 아미노산 1개(Glu240Lys 및 Leu35Gln)의 차이가 있다. 이 효소는 국내에서 분리되는 장내세균이 흔히 생성하는 것으로 알려졌으며[37], 국내에서 이 효소를 생성하는 *P. aeruginosa*가 분리된 것은 본 연구가 처음이다. 이 효소는 ceftazidime에 강한 활성을 지니고 있으며, *P. aeruginosa* K19204에 대한 ceftazidime의 MIC도 32  $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높았다. SHV-12는 clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성이 있으나 *P. aeruginosa* K19204에 대한 ceftazidime-clavulanic acid의 MIC는 64  $\mu\text{g/mL}$ 로 ceftazidime에 비해서 오히려 높았는데, 이는 clavulanic acid의 유도능에 의하여 이 균주의 염색체성 cephalosporinase가 과량생성된 때문으로 추측한다.

Double-disk synergy 시험은 장내세균이 생성하는 ESBL의 검출에 유용한 검사법으로 널리 사용되고 있다[5]. 본 연구에서 *A. baumannii* 3주(5.2%)와 *P. aeruginosa* 4주(5.2%)는 imipenem 디스크와 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였으며, *A. baumannii* 1주(1.7%)와 *P. aeruginosa* 2주(2.6%)는 cefoxitin 디스크와 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였다. Class A ESBL 중 PER형과 VEB형 효소는 imipenem과 cefoxitin, GES형과 IBC형 효소는 imipenem에 의해서 활성이 억제되는 것으로 알려졌다[7]. 따라서 double-disk synergy 양성을 보인 이들 균주에서 이들 class A ESBL을 검출할 수 있을 것으로 기대하였으나 본 연구에서는 검출에 실패하였으며, 다만 ceftazidime과 imipenem 디스크 사이에 억제대의 상승효과를 보인 *P. aeruginosa* K1885와 K24857에서 OXA-7과 유사한 유전자를 검출할 수 있었다(data not shown). 이들 효소의 존재를 규명하기 위한 추가적 연구가 필요한 것으로 생각한다.

이상의 결과에서 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *A. baumannii* 중 가장 흔한 class A ESBL은 PER-1이며, SHV-12를 생성하는 *P. aeruginosa*의 존재도 증명하였다. 이들 ESBL 생성 균주의 확산은 광범위  $\beta$ -lactam 항균제 임상적 효용성을 제한할 것으로 우려된다.

## 요 약

**배경 :** 국내에서 분리되는 *Escherichia coli*나 *Klebsiella pneu-*



moniae의 class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성현황에 대해서는 여러차례 조사가 있었지만, *Acinetobacter baumannii*나 *Pseudomonas aeruginosa*의 이들 효소 생성 현황에 대한 조사는 매우 드물다. 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 분리된 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 TEM, SHV, PER, VEB, GES/IBC 등 class A의 ESBL 생성 현황을 조사하며, ESBL의 유전형을 규명하고자 하였다.

**방법** : 2004년 6-9월에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa*를 대상으로 하였다. 항균제 감수성은 디스크 확산법과 한천 희석법으로 시험하였고, ESBL 생성은 double-disk synergy 시험으로 확인하였다. Cef-tazidime 내성 전달성은 접합으로 시험하였다. Isoelectric focusing으로  $\beta$ -lactamase의 pI값을 측정하였으며 중합연쇄반응으로 TEM형, SHV형, CTX-M형, PER-1형, VEB형, IBC형 및 GES형 효소의 유전자를 검출하였고, 중합연쇄반응 산물의 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

**결과** : 시험기간 중 총 58주의 *A. baumannii*와 77주의 *P. aeruginosa*가 환자의 임상검체에서 검출되었다. *A. baumannii* 3주(5.2%)와 *P. aeruginosa* 4주(5.2%)는 imipenem 디스크와 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였으며, *A. baumannii* 1주(1.7%)와 *P. aeruginosa* 2주(2.6%)는 ceftoxitin 디스크와 ceftazidime 디스크 사이에 synergy 현상을 보였다. 대상균주 중 *A. baumannii* 6주는 *bla*<sub>PER-1</sub> 유전자를 지니고 있었으며, *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자를 지닌 *P. aeruginosa* 1주 및 *bla*<sub>TEM-116</sub> 유전자를 지닌 *A. baumannii* 13주와 *P. aeruginosa* 3주도 검출되었다.

**결론** : 이상의 결과에서 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *A. baumannii* 중 가장 흔한 class A ESBL은 PER-1이며, SHV-12를 생성하는 *P. aeruginosa*의 존재도 증명하였다. 이들 ESBL 생성 *A. baumannii*와 *P. aeruginosa* 균주의 확산은 향후 광범위  $\beta$ -lactam 항균제 임상적 효용성을 제한할 것으로 우려된다.

## 참고문헌

1. Satake S, Yoshihara E, Nakae T. Diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:685-90.
2. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2046-8.
3. Chamberland S, L'Ecuier J, Lessard C, Bernier M, Provencher P, Bergeron MG. Antibiotic susceptibility profiles of 941 gram-negative bacteria isolated from septicemic patients throughout Canada. The Canadian Study Group. Clin Infect Dis 1992;15:615-28.
4. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24(S 1):S19-45.
5. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2385-92.
6. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 2002;50:11-8.
7. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2488-93.
8. Poirel L, Ronco E, Naas T, Nordmann P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 1999;5:651-2.
9. Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*<sub>(TEM-21)</sub> gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3624-6.
10. Marchandin H, Jean-Pierre H, De Champs C, Sirot D, Darbas H, Perigault PF, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:213-6.
11. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1281-4.
12. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother 2001;48:839-52.
13. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2004;25:425-7.
14. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:962-9.
15. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2265-9.
16. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant

- Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. J Clin Microbiol 2001;39:1865-70.
17. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1749-51.
  18. Kim JM, Kang HK, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho BK, et al. Prevalence of PER-1 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:20-6. (김정만, 강현경, 정석훈, 배일권, 권수봉, 조병규 등. 부산의 한 대학병원에서 분리된 *Acinetobacter baumannii*의 PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 현황. 대한임상미생물학회지 2004;7:20-6.)
  19. 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  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:573-81.
  20. Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. J Antimicrob Chemother 2004;54:1144-7.
  21. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:622-32.
  22. Poirel L, Wiedhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2598-603.
  23. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A  $\beta$ -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1960-7.
  24. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A  $\beta$ -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the  $\Omega$ -loop. Antimicrob Agents Chemother 2004;48: 2905-10.
  25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement, M100-S10. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
  26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th ed., approved standards M7-A5. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
  27. Miller J. Experiments in molecular genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992:82-5.
  28. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
  29. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. J Antimicrob Chemother 2005;56:698-702.
  30. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
  31. Hong SG, Lee JW, Yong DG, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, et al. Antimicrobial Resistance of Clinically Important Bacteria Isolated from 12 Hospitals in Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:171-7. (홍성근, 이종욱, 용동은, 김의중, 정석훈 등. 전국 12개 병원의 임상검체에서 분리된 주요 세균의 항균제 내성율. 대한임상미생물학회지 2004;7:171-7.)
  32. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla*<sub>(VIM-2)</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1053-8.
  33. Jeon BC, Kwon KY, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho BK, et al. Prevalence of OXA-23 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:139-47. (전병찬, 권기영, 정석훈, 배일권, 권수봉, 조병규 등. 부산의대학병원에서 분리된 *Acinetobacter baumannii* 생성 class D  $\beta$ -lactamase OXA-23. 대한임상미생물학회지 2004;7:139-47.)
  34. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:447-53.
  35. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. J Clin Microbiol 2004;42:2902-6.
  36. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:943-9.
  37. Hong SG, Kim SJ, Jeong SH, Chang L. CH, Cho SR, Ahn JY, et al. Prevalence & Diversity of Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2003;6:149-55. (홍성근, 김선주, 정석훈, 장철훈, 조성란, 안지영 등. 국내에서 분리된 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도 및 유형. 대한임상미생물학회지 2003;6:149-55.)