

Genospecies Classification of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Restriction Fragment Length Polymorphism

Hyo Sun Lim, Hyo Jung Hong, Hyun Jung Jo, Do Hee Kim and Kyung Soo Chang*

Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea

Acinetobacter calcoaceticus-*Acinetobacter baumannii* (*A. calcoaceticus*-*A. baumannii*) complex, which includes *A. calcoaceticus* (genospecies 1), *A. baumannii* (genospecies 2), *Acinetobacter* genospecies 3 and 13, has been identified as *A. baumannii* by automated bacteria identification system. The purpose of this study is to develop rapid genospecies classification of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by molecular techniques. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were determined for 4 reference strains and 80 isolates of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex from clinical sources. Four and eleven RAPD patterns were observed among the reference strains and the isolates, respectively. RAPD might be useful for genomic typing but not for genospecies classification of *Acinetobacter* spp. RFLP of 16S-23S rRNA intergenic spacer gene with three selected restriction enzymes (*Apa*LI, *Swa*I, and *Sal*I) showed only four RFLP patterns in the reference and the isolates. Of 80 isolates, 10 of *A. calcoaceticus* (12.5%), 50 of *A. baumannii* (62.5%), 11 of *A. genospecies* 3 (13.75%), and 9 of *A. genospecies* 13 (11.25%) were classified by RFLP. This result suggests that RFLP of 16S-23S rRNA intergenic spacer gene of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex might be useful for genospecies classification.

Key Words: Genospecies classification, *A. calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex, RAPD, RFLP, 16S-23S rRNA intergenic spacer gene

서 론

Acinetobacter 균종은 그람음성 짧은막대균으로 운동성이 없으며 oxidase 음성, catalase 양성이고, 포도당을 발효하지 않고 nitrate를 환원하지 않는다. 흔히 토양이나 물 등의 자연환경에 널리 존재하며 특히 건조한 침대시트, 베개 및 호흡기구, 혈관 내 삽관 튜브 등의 병원환경에 오랫동안 서식하다가 면역력이 약한 환자에서 결막염, 피부염, 폐렴, 뇌수막염, 패혈증, 심내막염, 복강 내 감염,

수술부위 감염, 요로감염 등의 합병증을 일으킨다 (1~4).

과거에 *Acinetobacter*는 전쟁과 같은 상황에서 상처를 입은 환자들에게서 가장 흔히 분리되었다 (5). 그러나 최근에는 원내감염을 일으키는 균으로 알려져 있고 특히 중환자실에서 *Acinetobacter*에 의한 폐렴감염이 많이 보고되고 있다. 이 중 *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)는 주로 인공호흡기를 부착한 환자에서 폐렴을, 화상 환자에서 상처감염을 일으킨다 (6). 더욱이 일반적으로 사용하는 여러 항생제에 내성을 나타내는 다약제 내성을 띄며 습한 환경보다는 건조한 환경에서도 오래 생존하여 병원감염의 역학에 중요한 역할을 한다 (7). 과거에는 *Acinetobacter*에 감염되어도 쉽게 치료가 가능하고 원내감염 발병율도 높지 않아 문제가 되지 않았으나 현재 항생제 내성을 나타내는 *A. baumannii*의 분리가 점점 늘고 있고 원내감염의 상당부분을 차지하고 있어 병원 내 환자들을 위협하고 있다 (8, 9). 특히 최근 몇 년 사

Received: January 30, 2011/ Revised: February 15, 2011

Accepted: February 18, 2011

*Corresponding author: Kyung Soo Chang, Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.
Phone: +82-51-510-0565, Fax: +82-51-510-0568
e-mail: kschang@cup.ac.kr

**This research was supported by the research fund of the Catholic University of Pusan.

이에 다약제 내성을 띄는 *A. baumannii*의 급격한 증가는 원내감염은 물론 전세계적으로 많은 영향을 미치고 있어 이에 대한 신속한 분리, 동정 및 치료가 요망되고 있다 (2, 5). 이와 같이 *Acinetobacter*는 원내감염을 일으키는 주요 원인 균 종으로 해마다 분리빈도가 증가하는 추세를 보이고 있지만 현재까지 31개의 genomic species 중 17종에만 균종명이 부여될 정도로 정보가 부족한 상황이다. 그리하여 유전학적 분류가 아닌 표현형 또는 생화학적 특징만으로는 정확한 감별이 어려운 상태이다 (3, 4). 특히 *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (*A. calcoaceticus-A. baumannii*) complex는 *A. baumannii* (genospecies 2형), *A. calcoaceticus* (genospecies 1형), *A. baumannii* (genospecies 3형), *A. baumannii* (genospecies 13형)이 혼합되어 있어서 API kit나 자동미생물동정기로 분류 시 모두 *A. baumannii*로 판명이 되어 *Acinetobacter* 속균에 대한 정확한 동정이 이루어지지 않고 있다 (2, 10~12). 많은 연구자들은 유전형 검사법으로 분류 및 동정법들을 개발하기 위해 노력하고 있으나 아직 병원에서 실용화할 만큼 유용하지 않기 때문에 신속 정확한 동정법의 개발이 필요하다 (13). 또한 *Acinetobacter* 균종은 장내세균과 표현형이 매우 비슷하여 구별 동정 시 장내세균으로 오인될 수 있으므로 더욱 더 정확한 유전학적 분류가 필요하다.

지금까지 몇 연구자들은 restriction fragment length polymorphism (RFLP)법 (2, 13)을 이용하여 *Acinetobacter* genospecies를 분류하였으나, *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex에 속하고 생화학적 감별이 어려운 네 균주에 대한 genospecies 분류를 수행한 바가 없다. 또한 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)법 (7, 14)은 유전형 분류에 이용하여 왔고, RAPD법으로 표준 *Acinetobacter* genospecies의 유전형 감별은 가능하였으나, 임상분리주의 genospecies 분류에 적용하지 않았다.

따라서, 본 연구는 *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex인 *A. calcoaceticus* (genospecies 1형), *A. baumannii* (genospecies 2형), *A. baumannii* (genospecies 3형), *A. baumannii* (genospecies 13형)을 분자생물학적 기법을 이용하여 신속 정확히 genospecies 분류를 수행하고, 임상에서 생화학적 검사상 *A. baumannii*로 동정되는 *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex 분리주의 정확한 genospecies 분류를 통해 어떠한 genospecies들이 임상에서 질병과 연관성이 있으며, 앞으로 *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex의 genospecies별 다약제 내성 및 병원성 연구의 기초자료를 제공하고자 하였다. 특히 기존의

16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)법을 수정하여 더 신속하고 분명하게 *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex의 genospecies 분류가 가능하였다. 생화학적 정상검사에서도 *A. baumannii*로 동정된 *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex 중에서 *A. baumannii*의 분리율은 62.5%로 나타났다. 또한 RAPD에 의한 임상분리주의 genospecies 분류가 가능한 지를 RFLP 결과가 비교한 바, 유의성은 없었다.

재료 및 방법

균주 및 배양

2009년 4월에서 8월까지 부산의 종합병원에서 입원 및 외래 진료 환자로부터 채취한 가검물로부터 세균을 분리하였으며, 분리된 세균은 자동미생물동정기(bioMerieux, France)를 이용하여 동정하였으며, 그 중 *A. baumannii*로 동정된 80균주를 대상으로 실험하였다. 표준 균주로는 *A. baumannii* (ATCC 19606), *A. calcoaceticus* (ATCC 23055), *A. baumannii* (ATCC 17803), *A. baumannii* (ATCC 19004)로 미국 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받았다. 균주들은 blood agar plate (BAP)와 MacConkey agar (MAC)에 각각 접종한 후 37℃에서 24 시간 배양하거나, 순수 집락을 brain heart infusion (BHI) broth에 배양하면서 사용하였다.

Plasmid DNA extraction

Plasmid DNA는 boiling법을 사용하여 추출하였다 (11). Boiling법은 E-tube에 3차 증류수 100 µl를 넣은 후 1~2개의 colony를 백금으로 따서 풀어준 다음 끓는 물에서 5 분간 중탕하였다. 이 후 얼음에 2분간 방치하고 12,000 rpm으로 5분간 원심 후 상층액을 새로운 E-tube에 옮겼다. 추출된 DNA는 V-530 UV/VIS spectrophotometer (Jasco, Japan)로 농도를 측정 후 RAPD를 위한 template DNA 및 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 증폭하기 위한 template DNA로 이용하였다.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 이용한 genotyping

RAPD 분석은 Koeleman 등 (7)의 방법을 응용하여 수행하였고 분석을 위해 6개의 RAPD primer를 이용하였다(Table 1). RAPD 분석을 위한 PCR 반응 혼합액은

Table 1. Sequences of the six primers for RAPD analysis

RAPD primers	DNA sequences (5' to 3')
RAPD1	GGTGCGGGAA
RAPD2	GTTTCGCTCC
RAPD3	GTAGACCCGT
RAPD4	AAGAGCCCGT
RAPD5	AACGCGCAAC
RAPD6	CCCGTCAGCA

AccuPower PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 template DNA (50 ng/μl)와 각각의 RAPD 용 primer 1~6 (25 pM)를 각각 1 μl 넣고 증류수로 전체용량이 20 μl 되게 첨가하였다. PCR 반응조건은 95℃, 5분간 초기 반응한 후, 94℃에서 60초, 36℃에서 60초, 72℃에서 120초로 실시하며 45회 반복하였다. 증폭된 DNA는 0.5× TBE buffer로 만든 2% agarose gel을 사용하여 0.5× TBE buffer하에서 135 V로 70분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide (10 μg/ml)로 10분간 염색 후 UV하에서 관찰하였다. 전기영동상 증폭된 분절은 유전자 이미지 분석장치인 Kodak imaging system과 software (Kodak, NY, USA)를 이용하여 촬영과 분석을 실시하였다. 균주로는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주와 80개의 임상분리주를 모두 사용하였다.

*A. baumannii*에서 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자 증폭

먼저 RFLP 방법을 위해 선택된 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 PCR로 증폭하였다. 이들 유전자 증폭용 primer는 Dolzani 등 (2)이 이용한 primer를 사용하였다(Table 2). *A. baumannii* 균주의 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix (Bioneer)에 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주와 임상분리주로부터 추출된 DNA template (50 ng/μl)와 forward와 reverse spacer primer (25 pM/μl)를 각각 1 μl씩 넣고 증류수로 전체용량이 20 μl되게 첨가하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 초기 반응한 후, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분 30초, 72℃에서 2분으로 30회 반복하였고 72℃에서 10분간 연장 반응을 하였다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 100 V로 25분간 전기영동하여 확인하였으며, 증폭된 DNA

Table 2. Sequences of primers to amplify 16S-23S rRNA intergenic spacer gene for RFLP assay

Primer names	DNA sequences (5' to 3')	Size
Spacer-1	TTG TAC ACA CCG CCC GTC A	989 bp
Spacer-2	GGT ACT TAG ATG TTT CAG TTC	

의 크기는 1 kb에서 확인할 수 있다.

*A. baumannii*에서만 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자가 증폭되는 지는 알아보기 위하여, 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, 그람음성균인 *E. coli* 0157, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* 균으로부터 DNA를 분리하여, 위와 동일한 조건으로 PCR을 실시하였다

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

증폭된 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 확인하기 위하여 DNA 염기서열분석을 실시하였다. 증폭된 DNA는 agarose gel로부터 절단하여 gel purification kit (Bioneer)를 사용하여 분리정제하고 염기서열분석을 실시하였다. 염기서열분석은 dye terminator cycle sequencing법을 이용하였으며 ABI prism 310 genetic analyzer에 loading한 후 염기서열 결과를 수집하였다. *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주인 genospecies 1, 2, 3, 13형의 sequencing 결과를 확인한 후 RFLP 분석을 위해 제한효소 분석 프로그램인 NEB cutter 프로그램을 이용하여 genospecies를 감별할 수 있는 제한효소를 선택하였다. 선택된 제한효소는 *Apa*LI, *Swa*I과 *Sal*I이며, genospecies 1형의 경우 *Apa*LI, genospecies 2형은 *Swa*I, genospecies 13형은 *Sal*I에 의해 두 가닥으로 절단되었으며, genospecies 3형은 세 가지 제한효소에 의해 절단되지 않음이 확인되어, 선택된 제한효소에 의해 genospecies 1, 2, 3, 13형을 정확하게 분류할 수 있었다. 따라서 표준 균주 및 80개의 임상 균주의 DNA로부터 증폭된 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 세 가지 제한효소로 처리하였다. 제한효소 처리는 E-tube에 PCR product 2 μl, 제한효소 0.5 μl, 10× buffer 2 μl, 100× BSA 0.2 μl (option)로 첨가한 후, 3차 증류수를 20 μl까지 넣어 37℃ 항온조에서 4시간 반응하였다. RFLP pattern은 1.5% agarose gel에 100 V에서 25분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide (10 μg/ml)로 10분간 염색 후 UV하에서 관찰하였다. 전기영동상 증폭된 분절은 유전자 이미지 분석장치인 Kodak imaging system과

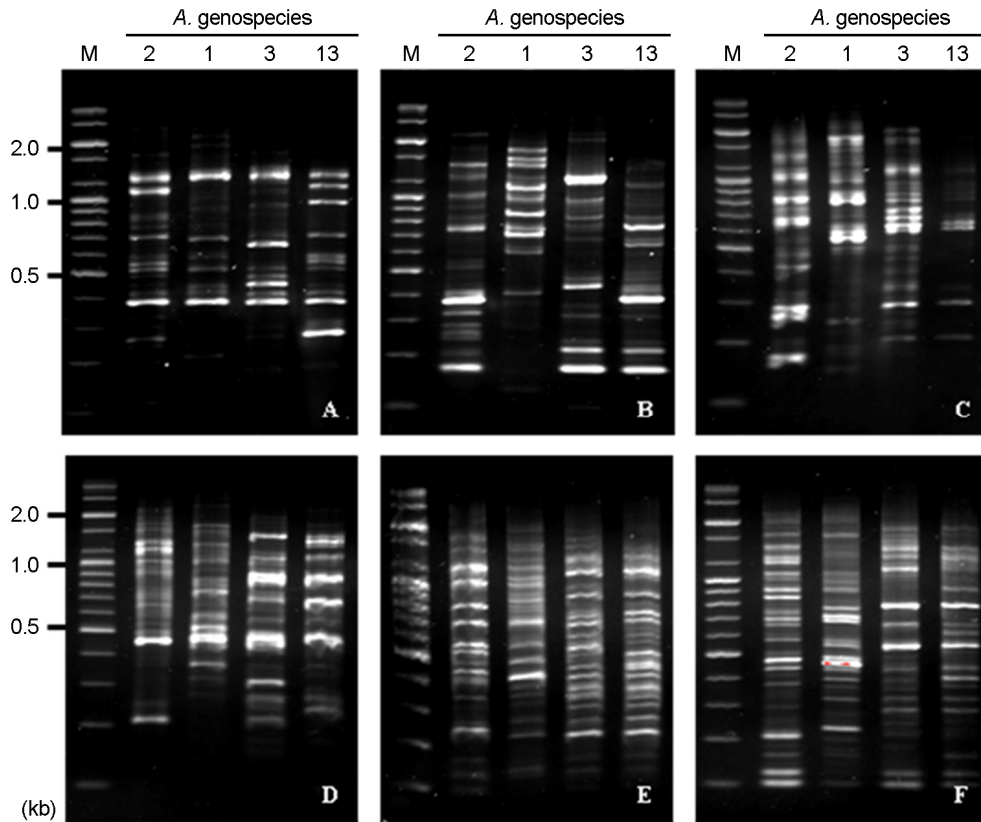


Figure 1. RAPD patterns of reference *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains by PCR using the six RAPD primers. (A) RAPD patterns using RAPD primer 1, (B) RAPD patterns using RAPD primer 2, (C) RAPD patterns using RAPD primer 3, (D) RAPD patterns using RAPD primer 4, (E) RAPD patterns using RAPD primer 5, (F) using RAPD patterns using RAPD primer 6. M: marker, 2: *A. baumannii* (genospecies type 2), 1: *A. calcoaceticus* (genospecies type 1), 3: *A. genospecies* type 3, 13: *A. genospecies* type 13.

software (Kodak)를 이용하여 촬영과 분석을 실시하였다.

결 과

RAPD를 이용한 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주와 임상 균주 동정

RAPD를 이용하여 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex를 감별할 수 있는지 알아보기 위해 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주인 genospecies 1, 2, 3, 13로부터 DNA를 분리하여 6개의 RAPD 용 primer set로 PCR을 수행하였다. 네 개의 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주들은 각각의 RAPD 용 primer에 의해 특이적으로 감별될 수 있는 RAPD pattern을 나타내었다(Fig. 1).

RAPD primer 1의 경우 표준 균주들의 분절 개수가 가장 적고 선명하게 나와 genospecies 감별에 용이하였다. 증폭이 잘된 선명한 분절만으로 pattern을 보면, *A.*

*baumannii*는 2개의 큰 band와 1개의 작은 분절이 관찰되었으며, *A. calcoaceticus*는 각각 1개의 크고 작은 분절이, *A. genospecies* 3은 1개의 큰 분절과 3개의 작은 분절이 관찰되었으며, *A. genospecies* 13은 2개의 작은 분절이 특징이었다. 네 표준 균주 모두 390 bp 크기의 분절이 공통으로 관찰되었으며, *A. genospecies* 1, 2, 13형에서 서로 유사하면서도 감별이 용이한 분절이 많이 관찰되었다.

RAPD primer 2 역시 분절 개수가 많지 않아 변별력이 높은 편이지만, *A. genospecies* 2형과 13형이 서로 유사한 band로 각 genospecies의 특이적인 감별점이 없어 primer 1 보다는 pattern 분석이 적절하지 않음을 보여주었다. RAPD primer 3, 4, 5, 6은 *A. genospecies* 3형과 13형의 RAPD pattern이 비슷하고 분절 pattern이 복잡하였다. 따라서 이와 같은 결과로 미루어 보았을 때 분절수도 많지 않고 어느 정도 분절 간의 간격이 유지되며 확연한 분절이 검출된 RAPD primer 1이 가장 *A. genospecies* 감별에 용이

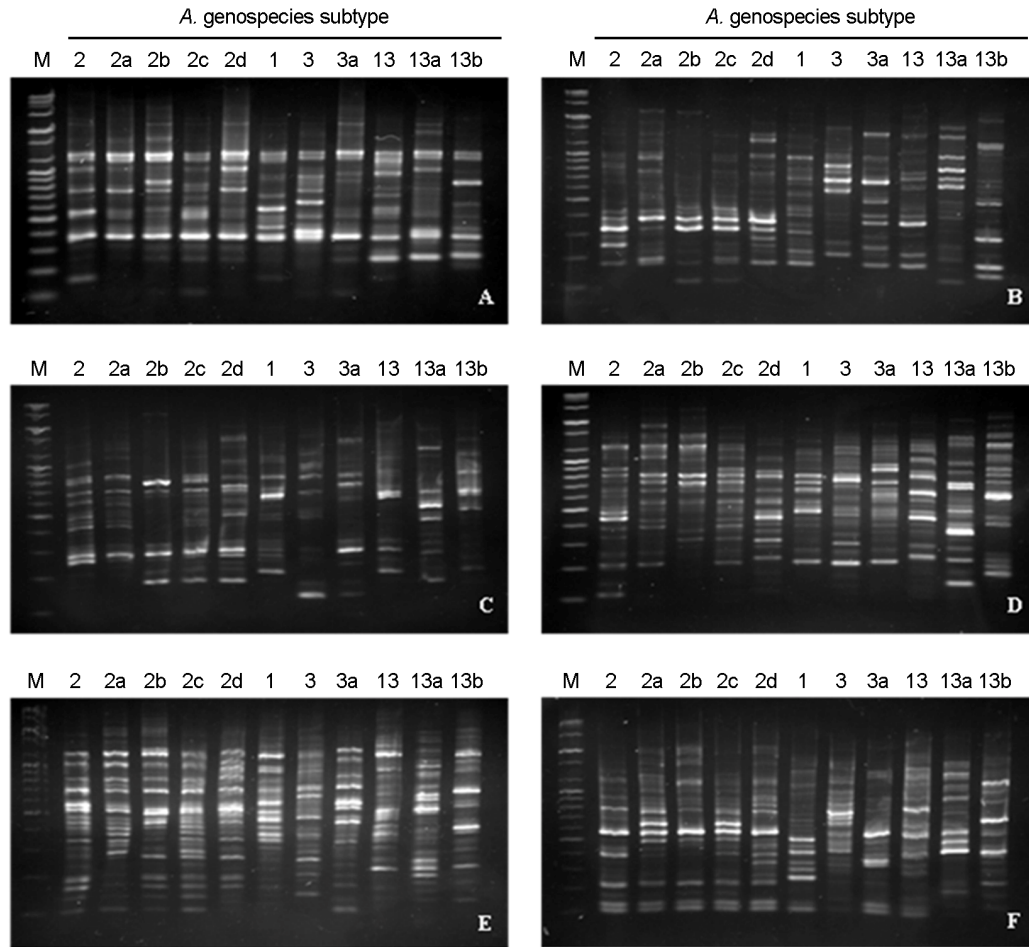


Figure 2. RAPD patterns of representative clinical *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates by PCR using the six RAPD primers. (A) RAPD patterns using RAPD primer 1, (B) RAPD patterns using RAPD primer 2, (C) RAPD patterns using RAPD primer 3, (D) RAPD patterns using RAPD primer 4, (E) RAPD patterns using RAPD primer 5, (F) using RAPD patterns using RAPD primer 6. M: marker, 2-2d: *A. baumannii* (genospecies 2) subtype 2, subtype 2a, subtype 2b, subtype 2c, subtype 2d, respectively, 1: *A. calcoaceticus* (genospecies 1) subtype 1, 3-3a: *A. genospecies* 3 subtype 3, subtype 3a, respectively, 13-13b: *A. genospecies* 13 subtype 13, subtype 13a, subtype 13b, respectively.

하였다. 즉, RAPD primer 1을 사용한 경우 감별 분절로는 *A. baumannii*는 1.1 kb의 분절, *A. genospecies* 3형은 680 bp와 450 bp의 분절에, *A. genospecies* 13형은 290 bp의 분절이 특징이며, 네 표준 균주는 390 bp의 공통 분절 및 *A. genospecies* 1, 2, 3형은 1.3 kb의 공통 분절을 특징으로 하였다.

RAPD primer 1을 사용하여 80개의 임상 균주의 genospecies를 분류한 바, 각 분절에 따라 genospecies 1형, 2형, 3형, 13형으로 분류하였으며, 비슷하지만 약간 다른 경우를 각각의 subtype으로 나누었다. Subtype으로 분류한 결과 *A. baumannii*인 genospecies 2형은 2, 2a, 2b, 2c, 2d형으로, *A. calcoaceticus*인 genospecies 1형은 subtype이 없었고,

genospecies 3형은 3, 3a형으로 genospecies 13형은 13, 13a, 13b형으로 분류되어 11개의 subtype들이 검출되었다. 검출된 11개의 subtype에 해당되는 대표 균주를 이용하여 RAPD primer 1부터 6까지 RAPD pattern을 분석한 바, Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 각각의 subtype들은 모두 RAPD primer별로 특이하고 감별된 pattern을 나타내었지만, 이를 이용한 *A. genospecies* 분류는 쉽지가 않았으며 실험실 진단으로 사용하기는 적합하지가 않았다.

*A. baumannii*에서 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자의 특이성

Acinetobacter genospecies를 감별하기 위한 다른 분자생

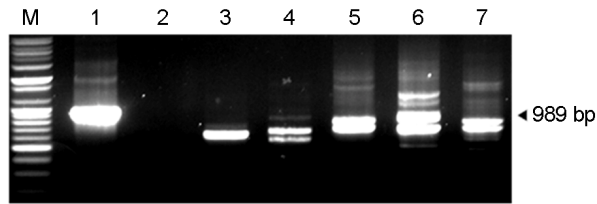


Figure 3. DNA fragments obtained by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer gene of *A. baumannii* and other bacteria. M: marker, 1: *A. baumannii* (genospecies type 2) 2: *Staphylococcus aureus*, 3: *Streptococcus pyogenes*, 4: *Enterococcus faecalis*, 5: *Escherichia coli* 0157, 6: *Salmonella typhimurium*, 7: *Shigella dysenteriae*.

물학적 방법으로 RFLP를 실시하였다. 먼저 RFLP에 이용한 유전자인 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자가 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 특이적으로 증폭되는지를 알아보기 위해, *A. baumannii*는 물론 다른 균종인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* 0157, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*의 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 증폭하여 확인하였다.

*A. baumannii*를 비롯한 *A. genospecies*에서 989 bp 크기의 band가 증폭되었지만, *S. aureus*는 어떠한 band도 관찰되지 않았으며, 다른 세균들은 모두 band가 관찰되었으나 크기가 작았으며, 몇몇 균종은 600~700 bp 사이에서 multiband가 관찰되어 약 1 kb 크기의 band가 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에서만 증폭됨이 확인되었다(Fig. 3).

RFLP 기법을 이용한 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 표준 균주와 임상 균주의 유전형 분석

A. calcoaceticus-*A. baumannii* complex 표준 균주의 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 증폭한 후, DNA 염기서열분석 및 제한효소 절단분석을 통하여 얻어진 제한효소 *Apa*LI, *Swa*I과 *Sal*I을 사용하여 RFLP를 실시하였다. 그 결과, *A. baumannii*인 *A. genospecies* 2형은 989 bp 크기의 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자가 *Apa*LI 처리에 의해 701 bp와 288 bp로 절단되었으며, *A. calcoaceticus*인 *A. genospecies* 1형은 *Swa*I 처리 시 525 bp와 464 bp로 절단되었으며, *A. genospecies* 13형은 *Sal*I 처리 시 764 bp와 225 bp로 절단되었다(Fig. 4). 이런 결과를 바탕으로 임상에서 분리된 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 80주를 대상으로 세 개의 제한효소를 이용하여 RFLP를 실시한

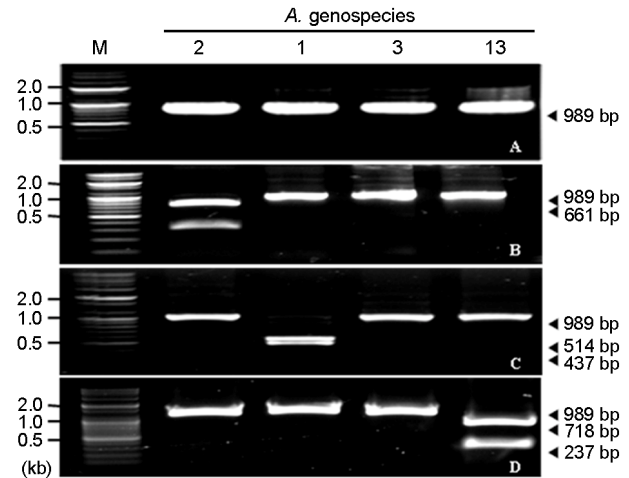


Figure 4. RFLP patterns of the 16S-23S rRNA intergenic spacer gene of reference *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains treated with selected restriction enzymes. (A) not treated with restriction enzyme, (B) treated with *Apa*LI, (C) treated with *Swa*I, (D) treated with *Sal*I. M: marker, 2: *A. baumannii* (genospecies type 2), 1: *A. calcoaceticus* (genospecies type 1), 3: *A. genospecies* type 3, 13: *A. genospecies* type 13.

Table 3. Genospecies classification of eighty clinical *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates by RFLP

<i>A. genospecies</i>	No. of population	Isolation frequency (%)
<i>A. calcoaceticus</i>	10	12.5
<i>A. baumannii</i>	50	62.5
<i>A. genospecies</i> 3	11	13.75
<i>A. genospecies</i> 13	9	11.25

바, 표준 균주와 동일한 RFLP pattern을 나타내어 *genospecies* 분류가 가능하였다. 따라서 자동미생물동정기로는 *A. baumannii*로 동정되었던 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 분리주 80주를 분류한 바, *A. baumannii*가 62.5%로 가장 높은 분리율을 나타내었으며, 그 다음으로는 *A. genospecies* 3가 13.75%, *A. calcoaceticus*가 12.5%, *A. genospecies* 13이 11.25%로 순으로 분류되었으며 *A. baumannii*를 제외한 세 종류의 *genospecies*의 분리율은 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 3).

또한, RAPD 기법으로 분류되었던 11종류의 subtype의 대표 균주를 RFLP pattern으로 *A. genospecies*를 분류한 바, RAPD subtype 2, 2a, 2b, 2c, 2d과 3a번은 *A. baumannii*로 분류되었으며, RAPD subtype 1과 13번은 *A. genospecies* 13, RAPD subtype 3, 13a과 13b번은 *A. genospecies* 3으로 동정되었다(Fig. 5). 따라서 이와 같은 결과는 16S-23S

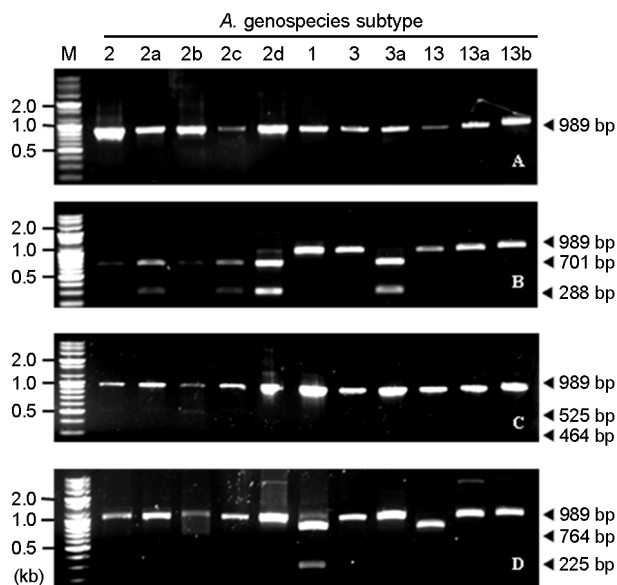


Figure 5. RFLP patterns of the 16S-23S rRNA intergenic spacer gene of representative clinical *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates with selected restriction enzymes. (A) not treated with restriction enzyme, (B) treated with *Apa*LI, (C) treated with *Sma*I, (D) treated with *Sal*I. M: marker, 2-2d: *A. baumannii* (genospecies 2) subtype 2, subtype 2a, subtype 2b, subtype 2c, subtype 2d, respectively, 1: *A. calcoaceticus* (genospecies 1) subtype 1, 3-3a: *A. genospecies* 3 subtype 3, subtype 3a, respectively, 13-13b: *A. genospecies* 13 subtype 13, subtype 13a, subtype 13b, respectively.

rRNA intergenic spacer 유전자를 이용한 RFLP법은 RAPD 보다는 *Acinetobacter* 군종의 genospecies 분류에 정확하고 간편하며 임상에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

고 찰

Acinetobacter 군종은 genospecies 1형과 3형이 비슷하고 genospecies 2형과 13형이 비슷하여 생화학적으로 감별하는데 한계가 있다. 또한 자동미생물동정기인 Vitek을 이용 시 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex가 *A. baumannii*로만 동정되므로 정확하게 군종을 감별할 수 없다 (15). Chang 등 (11)은 자동미생물동정기와 16S-23S rRNA gene의 spacer 영역의 염기서열분석을 통해, 자동미생물동정기의 *A. genospecies* 분류의 정확성을 비교하였다. 자동미생물동정기를 사용한 결과는 79개의 실험 균주 중 18주의 *A. calcoaceticus*와 61주의 *A. baumannii*로 분리되었으나, 분자생물학적 방법을 이용한 genotype 분석에서는 46주의 *A. baumannii*, 19주의 *A. genospecies* 3, 11주의 *A. genospecies*

13로 79개 중 76개의 균주가 동정되어 동정 분리율이 96.2%이었으며, 자동미생물동정기를 이용한 phenotype 동정 분류법과 DNA 염기서열을 이용한 genotype 분류법과는 차이가 있음이 확인되었으며, 균종간 생화학적 성상에 의한 감별의 어려움이 확인되었다.

현재까지 많은 연구자는 자동미생물동정기의 한계성을 알고 다양한 분자생물학적 기법을 통하여 *A. genospecies*를 분류하고자 하였다 (6). *A. genospecies*를 분류하기 위한 typing system으로는 biotyping, antibiograms, serotyping, phage typing, bacteriocin typing, protein profiles, multilocus enzyme electrophoretic typing, plasmid profiles, pulse-field gel electrophoresis, ribotyping, PCR fingerprint같은 방법들이 있다 (6, 16). 최근 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) 등의 방법을 genospecies 분류에 적용하였으나 (7), 실험이 어렵고 해석에 전문성이 필요하여 신속한 분류에 한계가 있다.

최근까지 여러 세균들의 역학조사에 이용되고 있는 RAPD 분석방법은 사용되는 시약과 DNA 추출방법 및 PCR 증폭조건 등에서 높은 재현성을 갖는다고 보고되고 있다 (7). 그러나 *Acinetobacter* 군종에서는 정확하게 보고되지 않았고 또한 증폭되는 분절이 매우 많고 조밀하여 확실하게 구별이 어려우며 특히 너무나 많은 subtype이 발견되어 균을 신속 동정하는 데는 한계가 있을 것으로 사료된다. RAPD법은 *A. genospecies*의 분류보다는 genomic typing에 응용되고 있으나, 임상분리주들은 너무나 다양한 pattern을 나타내며, 실험 시 표준 균주들과 비교해야 하는 복잡성 때문에 병원의 임상검사실에서는 적용하기 어려운 것으로 생각된다. 본 연구에서도 RAPD를 이용한 표준 균주의 *A. genospecies* 분류는 명확하였으나, 임상분리주에서는 많은 subtype들이 관찰되어 신속감별에는 적합하지 않았다.

반면, 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자를 이용한 PCR-RFLP법은 간편하고 판독이 용이하여 RAPD보다 정확하고 빠르게 임상에 적용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자의 DNA 염기서열을 이용한 genotyping법은 매우 유용하게 사용되어 왔다 (2, 4, 11). 본 연구에서도 임상 가검물에서 분리 동정된 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 80주를 대상으로 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자의 DNA 염기서

열을 분석한 바, RFLP 결과와 일치하였다. 따라서 염기서열을 분석하지 않고도 임상에서 간편하고 정확한 *A. genospecies*의 분류가 가능할 것으로 판단된다. 특히, 본 연구는 *A. baumannii*가 가장 많이 동정되었으나, 다른 *A. genospecies* 3, *A. calcoaceticus*, *A. genospecies* 13도 13.75%, 12.5%, 11.25%로 순으로 분류되어 총 37.5%로 Chang 등 (11)이 16S-23S rRNA intergenic spacer 유전자의 염기서열을 이용한 분류와 유사하였다. 하지만 국내에서 Lee 등 (13)이 rRNA intergenic spacer length polymorphism (tRNA-ILP)를 통해 보고한 83주의 *Acinetobacter* 균속 중 80주의 *A. baumannii*가 분리되어 97.6%의 분리율을 나타내었다는 국내의 분리율과는 다소 차이를 나타내었다. 이는 *A. baumannii*로 판명된 분리주들이 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 형태로 다른 *A. genospecies*와 혼재되어 있을 가능성이 있다고 생각된다. 현재 병원에서는 실제 분리되는 빈도에 비해 *Acinetobacter* 균종에 대한 정보가 부족한 상황이며 특히, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex로 임상 검체에서 분리 동정된 *A. genospecies*의 역학적 유행패턴은 보고되고 있지 않다. 따라서 앞으로 본 연구 결과를 토대로 지속적인 역학조사 및 *A. genospecies* 분석을 통해 다약제 내성 *Acinetobacter* 균속의 유행 균주 감시 및 통제 체계를 구축할 있는 자료로 활용되리라 기대한다.

참 고 문 헌

- 1) Soddell JA, Beacham AM, Seviour RJ. Phenotypic identification of non-clinical isolates of *Acinetobacter* species. J Appl Bacteriol 1993;74:210-4.
- 2) Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. J Clin Microbiol 1995;33: 1108-13.
- 3) Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005;43:4382-90.
- 4) Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol 1995;33:11-5.
- 5) Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino Ivy C, et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. J Clin Microbiol 2006;44:2921-32.
- 6) Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996;9:148-65.
- 7) Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1998;36:2522-9.
- 8) Lee HK, Kim HJ, Kim YC, Cho SR, Lee WG. Clinical and molecular epidemiologic analysis of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. J Korean Pediatr Soc 2000;43:43-8.
- 9) Dueñas Díez AI, Bratos Pérez MA, Eiros Bouza JM, Almaraz Gómez A, Gutiérrez Rodríguez P, Miguel Gómez MA, et al. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. Int J Antimicrob Agents 2004;23:487-93.
- 10) Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotype and phenotypic methods. J Clin Microbiol 1996;34:1519-25.
- 11) Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. J Clin Microbiol 2005;43:1632-9.
- 12) Bernards AT, Dijkshoorn L, van der Toorn J, Bochner BR, van Boven CP. Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridization groups by means of the Biolog system. J Med Microbiol 1995;42:113-9.
- 13) Lee SH, Lee MK, Park AJ, Choi ES. Identification of *Acinetobacter* genospecies by analysis of rRNA spacer regions. Korean J Clin Pathol 2000;20:48-55.
- 14) Graser Y, Klare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol 1993;31:2417-20.

- 15) Shin MG, Kim SH, Lee JC, Cho D, Kee SJ, Shin JH, *et al.* A comparison of ID32 GN system with amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter baumannii*. Korean J Lab Med 2004;24:107-12.
 - 16) Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. J Clin Microbiol 1994;32:2677-81.
-