

Antimicrobial Susceptibility and Clonal Distribution of the Blood Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Two Korean Hospitals

Chi Hyun Kim and Je Chul Lee*

Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

An increasing prevalence of infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) causes a serious therapeutic problem in clinical setting. This study investigated the antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms against aminoglycosides, and molecular epidemiology of 76 blood isolates of *P. aeruginosa* from two Korean hospitals. Thirty-four isolates were susceptible to all 13 antimicrobial agents tested, whereas 28 isolates showed a MDR or extensively drug-resistant phenotype. There was a significant difference in resistance rates of *P. aeruginosa* isolates against aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, and norfloxacin between two hospitals. Genes for aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), including *aphA6* ($n = 14$), *aadB* ($n = 11$), *aacA4* ($n = 8$), and *aphA1* ($n = 1$), and 16S rRNA methylase *armA* ($n = 6$) were detected in 26 *P. aeruginosa* isolates resistant to aminoglycosides. There was no significant difference in carriage of genes for AME and 16S rRNA methylase between two hospitals, but *aacA4* and *aphA1* were specifically detected in *P. aeruginosa* isolates from one hospital. Seventy-six *P. aeruginosa* isolates were classified into 55 pulsotypes at similarity value of 0.85, and 31 and 24 pulsotypes were specifically detected in each hospital. This study demonstrates that differences in antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* isolates between two hospitals are possibly due to the presence of diverse clones specific in each hospital.

Key Words: *P. aeruginosa*; Antimicrobial agent; Resistance; Aminoglycoside; 16S rRNA methylase

INTRODUCTION

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 포도당 비발효 그람 음성 막대균으로 병원감염(hospital-acquired infection)의 중요한 원인균이다 (1~3). 녹농균 감염은 면역력이 저하된 환자나 중환자실에 입원한 환자에서 주로 기회감염(opportunistic infection)으로 발생하며, 호흡기감염, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 폐혈증 등 다양한 감염을 일으킨다. 병원감염을 일으킨 그람음성균 중 녹농균은 대장균, 클레브시엘라 균종 다음으로 중요한 혈류감염의 원

인균이다 (4). 녹농균에 의한 균혈증은 사망률이 38%에 이를 정도로 높으며, 감염 첫째 날에 30~50%의 환자가 사망할 만큼 질병의 빠른 진행과 대부분 다약제내성균에 의한 감염 및 치료도중에 새로운 항균제 내성을 획득할 수 있는 능력 등으로 인해 감염환자의 치료가 매우 어렵다 (5~7).

아미노글리코시드는 베타락탐 항균제와 함께 녹농균 감염의 치료에 병합요법으로 사용되는 항균제로, 세균의 30S 리보솜의 16S rRNA에 결합하여 단백질합성을 저해한다 (8). 아미노글리코시드 내성은 세균이 생산하는 아미노글리코시드 변형효소(aminoglycoside-modifying enzyme)가 아미노

Received: November 10, 2016/ Revised: November 27, 2016/ Accepted: December 1, 2016

*Corresponding author: Je Chul Lee. Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, 680 Gukchaebosang-ro, Jung-gu, Daegu 41944, Korea.

Phone: +82-53-420-4844, Fax: +82-53-427-5664, e-mail: leejc@knu.ac.kr

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

글리코시드의 구조를 변경시켜 16S rRNA에 약제가 결합하지 못하도록 하는 것이 가장 흔한 내성기전이다 (9, 10). 그러나 2000년 이후부터는 대부분의 아미노글리코시드를 포함하는 4,6-disubstituted deoxystreptamine에 고도의 내성을 가지는 ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, NpmA 등의 16S rRNA methylase 효소가 다양한 그람음성균들 사이에 확산되어 있다 (11, 12). 우리나라에서는 16S rRNA methylase 중 ArmA가 그람음성균에서 가장 흔하게 발견되며, *rmtA* 유전자를 가진 1주의 녹농균도 보고되었다 (13~15). 본 연구는 2개 대학병원에 입원한 환자들의 혈액에서 분리된 녹농균을 대상으로 각종 항균제에 대한 감수성, 아미노글리코시드 내성기전 및 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 이용한 역학적 특성을 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

균주

2008년부터 2010년까지 대구에 있는 3차 병원(A 병원)과 전라북도에 있는 3차 병원(B 병원)에 입원한 환자의 혈액에서 분리된 녹농균 76주를 대상으로 하였으며, A 병원 분리주 39주와 B 병원 분리주 37주는 경북대학교병원 병원체자원은행에서 분양받았다 (16). 한 환자로부터는 하나의 균주만을 선택하였다. Vitek II system (bioMerieux, France)을 이용한 생화학검사로 균종을 동정하였다.

항균제 감수성 검사

항균제 감수성 검사는 Mueller-Hinton agar (Difco, USA)를 사용한 우무평판희석법으로 하였으며, 항균제 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 검사방법과 최소억제농도의 판정은 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)의 기준에 따랐다 (17). 항균제는 Magiorakos 등 (18)의 기준에 따라 선택하였으며, 4종의 아미노글리코시드(아미카신, 젠타마이신, 네티마이신, 토브라마이신), 2종의 카바페넴(이미페넴, 메로페넴), 2종의 항녹농균 세팔로스포린(세프트라지딴, 세페딴), 2종의 플루오로퀴놀론(시프로플록사신, 노플록사신), 항녹농균 페니실린과 베타락탐분해효소 저해제의 복합제(피페라실린-타조박탐), 모노박탐(아즈트레오남), 콜리스틴 등 모두 13종을 사용하였다. 녹농균의 항균제 내성양상은 Magiorakos 등 (18)의 기준에 따라 다약제내성(multidrug-resistant), 광범위 내성(extensively drug-resistant) 및 범내성(pandrug-resistant)으로

분류하였다.

아미노글리코시드 내성유전자의 검색

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 Luria-Bertani 액체배지에서 하룻밤 배양하여 증류수로 균을 세척한 후 흡광도 600 nm에서 광학밀도 1.0으로 맞춘 다음 10분간 끓인 세균배양액 2 µl, 각 primer 20 pM, dNTP 250 µM, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 U의 *Taq* DNA polymerase (Takara Bio, Japan)를 함유하도록 하여 최종 20 µl 용액으로 만들었다. PCR 반응은 95°C에서 2분간 반응시켜 DNA를 변성시키고, 95°C에서 1분, 각각의 primer에 맞는 어닐링(annealing) 온도에서 1분, 72°C에서 2분간 35회를 실시한 후, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 실험에 사용한 5종의 16S rRNA methylase 유전자와 8종의 아미노글리코시드 변형효소 유전자의 primer와 어닐링 온도는 Table 1에 표시하였다 (19~24).

PFGE 분석

녹농균의 DNA를 *SpeI* 제한효소(Fermentars, Germany)로 절단한 후 1.0% agarose gel에서 contour-clamped homogeneous-field apparatus (CHEF DRIII system, Bio-Rad Laboratories)에서 전기영동 하였다. 조건은 6 V/cm²로 하여 pulse time을 5초에서 40초로 증가시키면서 20시간 전기영동 하였다 (25). 48.5 kb concatemer로 구성된 박테리오파지 lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)를 분자량 표지자로 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 ethidium bromide로 DNA를 염색하고 DNA 밴드양상을 GelCompar II software (Applied Maths, Belgium)로 분석하였다. Band tolerance는 1.5%로 하였으며, Dice coefficient를 이용하여 분석하였다. Cluster의 분류는 unweighted pair group method of arithmetic averages (UPGMA)를 사용하였다. 밴드의 유사도(similarity index)가 0.85 이상일 경우 동일한 pulsotype으로 분류하였다.

통계처리

데이터의 통계학적 유의성은 Pearson's χ^2 statistics test를 사용하여 검사하였으며, *p* 값이 0.05 미만이면 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Genes	Sequences (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	PCR products (bp)	References
<i>armA</i>	CCG AAA TGA CAG TTC CTA TC GAA AAT GAG TGC CTT GGA GG	55	846	19
<i>rmtA</i>	CCG AAA TGA CAG TTC CTA TC GAA AAT GAG TGC CTT GGA GG	60	635	19
<i>rmtB</i>	ATG AAC ATC AAC GAT GCC CT CCT TCT GAT TGG CTT ATC CA	55	769	19
<i>rmtC</i>	AGT GTA TGA AAA ATG TCT GG GGT GTG TTA GAA TTT GCC TT	55	1,201	20
<i>npmA</i>	CTC AAA GGA ACA AAG ACG G GAA ACA TGG CCA GAA ACT C	58	660	21
<i>aacC1</i>	ACC TAC TCC CAA CAT CAG CC ATA TAG ATC TCA CTA CGC GC	55	169	13
<i>aacC2</i>	ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	55	237	13
<i>aacA4</i>	TAT GAG TGG CTA AAT CGA T CCC GCT TTC TCG TAG CA	55	395	22
<i>aphA1</i>	GCA TTT TAT CCG TAC TCC TG AAC CTA TTA ATT TCC CCT CG	57	386	13
<i>aphA6</i>	ATA CAG AGA CCA CCA TAC AGT GGA CAA TCA ATA ATA GCA AT	55	234	23
<i>aphA2</i>	GCT ATT CGG CTA TGA CTG GGC CCA CCA TGA TAT TCG GCA AGC	55	531	13
<i>aadB</i>	TCT GCC GCT CTG GAT CGA GCC TGT AGG ACT	55	404	24
<i>aadA1</i>	ATG AGG GAA GCG GTG ATC GC TTA TTT GCC GAC TAC CTT GG	50	792	13

RESULTS

혈액분리 녹농균의 항균제 감수성

환자의 혈액으로부터 분리한 76주의 녹농균을 대상으로 항균제 감수성 검사를 시행하였다. 실험에 사용한 13종의 항균제 중 시프로플로삭신과 노플로삭신에 대한 내성률 (43.4%)이 가장 높았고, 콜리스틴에는 모든 균주가 감수성이었다(Table 2). 분리병원에 따라서 항균제 감수성 결과에 큰 차이가 있었다. 아스트레오남과 세페핌을 제외한 10종

의 항균제에 대해 B 병원에서 분리한 녹농균들이 A 병원 분리 균주보다 내성률이 높았으며, 이중 피페라실린-타조박탐, 이미페넴, 메로페넴, 시프로플로삭신, 노플로삭신의 5종의 항균제에 대한 내성률은 B 병원 균주에서 유의하게 높았다($p < 0.05$). 녹농균의 아스트레오남 내성은 B 병원 분리균보다 A 병원 분리균에서 유의하게 높았다($p < 0.05$). 76주의 녹농균을 Magiorakos 등 (18)의 기준에 따라서 내성양상을 분류하였다. 34주(44.7%)는 모든 항균제에 감수성을 나타내었으며, 다약제내성과 광범위내성균은 각각 14주(18.4%) 있었다(Table 3). 모든 항균제에 내성을 가지

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* isolates from two Korean hospitals

Antibiotics	Total (n = 76)				Hospital A (n = 39)	Hospital B (n = 37)
	MIC range (μg/ml)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	No. of resistant isolates (%)	No. of resistant isolates (%)	No. of resistant isolates (%)
Amikacin	2->1024	8	256	14 (18.4)	5 (12.8)	9 (24.3)
Gentamicin	2->1024	4	>1024	27 (35.5)	11 (28.2)	16 (43.2)
Netilmicin	1->1024	8	1024	26 (34.2)	10 (25.6)	16 (43.2)
Tobramycin	0.25->1024	1	>1024	26 (34.2)	10 (25.6)	16 (43.2)
Piperacillin-tazobactam	2->512	8	256	19 (25.0)	6 (15.4)	13 (35.1)
Cefepime	0.5->1024	8	64	17 (22.4)	9 (23.1)	8 (21.6)
Ceftazidime	0.5->512	4	64	17 (22.4)	8 (20.5)	9 (24.3)
Aztreonam	2-512	8	32	11 (14.5)	8 (20.5)	3 (8.1)
Imipenem	0.06-128	2	16	22 (28.9)	5 (12.8)	17 (45.9)
Meropenem	0.06-1024	0.5	16	14 (18.4)	3 (7.7)	11 (29.7)
Ciprofloxacin	0.03-128	1	32	33 (43.4)	12 (30.8)	21 (56.8)
Norfloxacin	0.25-128	1	128	33 (43.4)	12 (30.8)	21 (56.8)
Colistin	2-4	2	4	0	0	0

Table 3. Antimicrobial susceptibility profiles that fit MDR, XDR, and PDR for 76 *P. aeruginosa* isolates

Antimicrobial susceptibility profiles ^a	No. of isolates (%)		
	Total (n = 76)	Hospital A (n = 39)	Hospital B (n = 37)
Susceptible to antimicrobial agents	34 (44.7)	20 (51.3)	14 (37.8)
Resistant to 1 or 2 antimicrobial categories	14 (18.4)	9 (23.1)	5 (13.5)
Multidrug-resistant	14 (18.4)	6 (15.4)	8 (21.6)
Extensively drug-resistant	14 (18.4)	4 (10.3)	10 (27.0)
Pandrug-resistant	0	0	0

^a Multidrug-resistant (MDR), the isolate is non-susceptible to at least 1 agent in ≥ 3 antimicrobial classes; extensively drug-resistant (XDR), the isolate is non-susceptible to at least 1 agent in all but 2 or fewer antimicrobial classes; pandrug-resistant (PDR), non-susceptibility to all agents in all antimicrobial classes for each bacterium.

는 범내성균은 없었다. 광범위내성균은 B 병원 분리주에서 A 병원 분리주보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

아미노글리코시드 내성의 특성

4종의 아미노글리코시드 중 A 병원에서 분리한 11주와 B 병원에서 분리한 16주를 포함해 모두 27주(34.2%)의 균주가 하나 이상의 아미노글리코시드에 내성을 나타내었다.

분리병원에 따른 아미노글리코시드 항균제에 대한 내성률은 유의한 차이가 없었다(Table 2). 아미노글리코시드에 대해 내성을 가지는 녹농균의 내성기전을 조사하기 위해 아미노글리코시드 변형효소와 16S rRNA methylase 유전자를 PCR로 검색하였다. *aphA6* ($n = 14$), *aadB* ($n = 11$), *aacA4* ($n = 8$), *aphA1* ($n = 1$) 등 4종의 아미노글리코시드 변형효소가 검색되었고, *aacC1*, *aacC2*, *aphA2* 유전자는 검색되

Table 4. Detection of resistant determinants for aminoglycosides in *P. aeruginosa* isolates from two Korean hospitals

Resistant pattern of aminoglycosides ^a	No. of isolates	Genes	No. of isolates	
			Hospital A	Hospital B
Amk, Gem, Tob, Ntl	13	<i>aadB, armA</i>	1	4
		<i>aphA6, aadB</i>	—	4
		<i>aacA4, aphA6, aadB</i>	2	—
		<i>aacA4, aphA6, armA</i>	1	—
		Not detected	—	1
Gem, Tob, Ntl	11	<i>aacA4</i>	4	—
		<i>aphA6</i>	—	7
Amk, Gem	1	Not detected	1	—
Gem, Ntl	1	<i>aphA1</i>	1	—
Ntl, Tob	1	<i>aacA4</i>	1	—

^a Abbreviations. Amk, amikacin; Gem, gentamicin; Tob, tobramycin; Ntl, netilmicin.

지 않았다(Table 4). 16S rRNA methylase 유전자 중에서는 6주에서 *armA*만 증폭되었다(Table 4). 아미노글리코시드 내성유전자의 분포는 분리된 병원에 따라서 다르게 나타났다. *aacA4*와 *aphA1* 유전자는 A 병원 분리균주에서만 검출되었다. 2주의 아미노글리코시드 내성 균주의 내성기전은 규명하지 못하였다.

혈액분리 녹농균의 역학적 특성

76주의 녹농균을 대상으로 역학적 특성을 조사하기 위해 PFGE를 시행하였다. PFGE 결과에 따라 계통나무(dendrogram)를 얻은 후 유사도 0.85를 기준으로 *pulsotype*을 분석하였다. A 병원에서 분리한 39주는 31개, B 병원에서 분리한 37주는 24개의 *pulsotype*으로 분류할 수 있었다(Fig. 1). 2개의 병원에서 분리된 균주가 동일한 *pulsotype*으로는 분류되지 않았다.

DISCUSSION

병원감염을 일으킨 대부분의 녹농균은 다약제내성균으로 알려져 있으며, 특히 항녹농균 세팔로스포린과 카바페넴에 대한 내성균이 점차 증가하고 있으므로 임상에서는 녹농균에 감염된 환자의 치료를 위한 항균제 선택에 어려움을 겪고 있다. 병원마다 사용하는 항균제의 종류와 총량의 차이에 따라 세균에 가해지는 항균제 선택압

(antibiotic selective pressure)이 다르므로 병원에 따라 동일한 항균제에 대해서도 감수성 정도 및 내성기전에 차이가 존재할 수 있다 (26). 본 연구는 지리적으로 떨어져 있는 2개 병원의 환자 혈액에서 분리한 녹농균을 대상으로 분리병원에 따라 항균제 감수성 및 아미노글리코시드 내성 유전자에 차이가 있음을 규명하고, 병원별로 다양한 클론의 녹농균이 존재함을 규명하였다.

76주의 녹농균을 대상으로 13종의 항균제에 대한 감수성 결과에서 34주는 검사한 모든 항균제에 대해 감수성을 나타내었으나, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 미노사이클린 등의 항균제에는 모든 균들이 내성을 나타내었다(data not shown here). 실험에 사용한 녹농균들은 콜리스틴에는 모두 감수성을 나타내어 범내성균은 없었다. 14주의 광범위내성균은 12종의 항균제에 모두 내성을 나타내었고, 콜리스틴에만 감수성이었다. 광범위내성균의 분리비율은 A 병원 분리주($n = 4$)보다 B 병원 분리주($n = 10$)에서 통계학적으로 유의하게 높았다. Gurung 등 (14)이 보고한 결과에 의하면 2008년부터 2010년까지 경북대학교병원에서 혈액을 포함한 다양한 임상검체로부터 얻은 100주의 녹농균의 항균제 내성률은 아미카신에는 16%, 젠타마이신에는 50%, 네틸마이신에는 51%, 토브라마이신에는 44%, 피페라실린-타조박탐에는 35%, 세페픽에는 46%, 세프트리딤에는 41%, 아즈트레오남에는 52%, 이미페넴에는 58%, 메로페넴에는 40%, 시프로플로삭신에는 44%, 노플로삭신

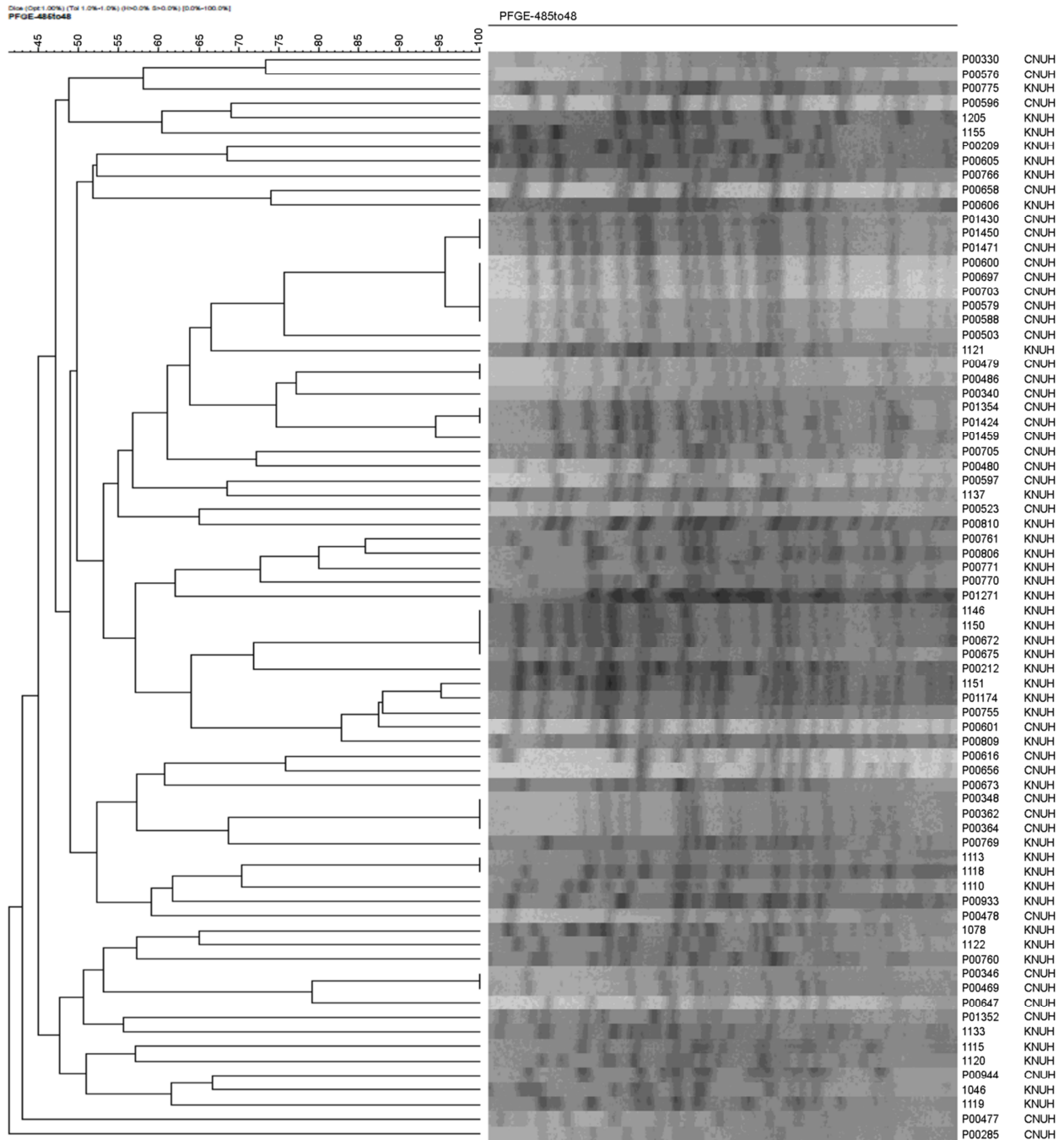


Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of 76 *P. aeruginosa* isolates from two Korean hospitals. Dendrogram showing a clustering of *SpeI*-generated PFGE patterns from *P. aeruginosa* isolates. Abbreviations: KNUH, Hospital A; CNUH, hospital B.

에는 43%로 나타나 대부분의 항균제에 대해 본 연구에서 사용한 혈액분리 녹농균의 항균제 내성률보다 높게 나타났다. 선행된 항균제 치료는 녹농균에 의한 균혈증의 위

험인자이며, 감염 치료도중 항균제 내성이 생길 수 있으므로 다른 임상검체에서 분리된 녹농균보다 혈액분리 녹농균의 항균제 내성률이 높을 것으로 예상되었으나, 본

연구 결과에서는 혈액분리 녹농균이 다른 임상검체에서 유래된 녹농균보다 대부분의 항균제에 더 높은 감수성을 나타내었다. Khan 등 (27)도 다약제내성을 가진 녹농균의 분리빈도가 혈액보다는 농, 창상, 기관지 세척액, 뇨 등에서 높다고 보고하고 있지만, Khan 등 (27)의 연구와 본 연구에서 사용한 혈액분리 녹농균의 숫자가 매우 적으므로 녹농균의 임상검체별 항생제 감수성 결과에 차이가 나는지는 추후 연구를 통해 규명할 필요성이 있다. 또한 2개 병원에서 분리한 녹농균은 항균제 감수성 결과에서 큰 차이를 나타내었는데, 6종의 항균제에 대해 병원별 내성률이 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다. 이러한 결과는 2개의 병원에서 사용하는 항균제의 종류 및 사용량 등에 따른 차이에 의한 항균제 선택압이 다르거나 항균제 감수성이 다른 클론의 녹농균이 감염을 일으킨 결과로 해석할 수 있다.

아미노글리코시드는 감염환자의 치료에 단독으로는 사용하지 않고 세포벽 합성 저해제인 베타락탐 항균제와 병합용법으로 사용되는 항균제이다 (8). 76주의 녹농균을 대상으로 한 4종의 아미노글리코시드에 대한 감수성 시험 결과 젠타마이신에 대한 내성이 27주(35.5%)로 가장 많았으며, 아미카신에 대한 내성이 14주(18.4%)로 가장 적었다. 또한 아미노글리코시드에 대한 녹농균의 MIC를 분리병원에 따라 비교해 보면 B 병원 분리주가 A 병원 분리주보다 높은 MIC₅₀과 MIC₉₀을 가지고 있는 것으로 나타나, 내성을 뿐만 아니라 MIC에도 차이가 있었다. 이러한 내성률 및 MIC의 차이는 아미노글리코시드 내성유전자인 아미노글리코시드 변형효소 및 16S rRNA methylase인 *armA* 유전자의 분리빈도와 관련되어 있었다. *aacA4*와 *aphA1* 유전자는 A 병원 균주에서만 검색되었다. 아미노글리코시드에 고도내성(MIC, >1,024 µg/ml)을 나타내는 *armA* 유전자도 B 병원 분리주에서는 4주에서 검색되었지만, A 병원 분리주에서는 1주만이 검색되어 4종의 아미노글리코시드의 MIC₉₀에 영향을 준 것으로 나타났다. 그러나 검색된 아미노글리코시드 내성유전자와 내성의 표현형이 일치하지 않는 균주들이 있었고, 아미노글리코시드 내성유전자가 전혀 검색되지 않은 1주는 다른 내성유전자 또는 내성기전을 가지고 있을 것으로 추정된다.

본 연구에서 조사한 2개의 병원에서 분리한 녹농균의 항균제 내성빈도는 6종의 항균제에 대해 병원에 따라 유의한 차이가 있었으며, 아미노글리코시드 내성유전자도 병원에 따라 일부 차이가 있었다. PFGE를 이용한 역학조

사 결과에서는 병원별 특정 클론의 유행에 의한 환자 감염보다는 다양한 균주에 의한 감염임을 확인하였다. 따라서 조사한 2개 병원의 항균제 내성의 특성의 차이는 각각 다른 병원환경과 항균제 선택압에 의한 균주의 특성에 의한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, *et al.* NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:996-1011.
- 2) Jones RN, Stilwell MG, Rhomberg PR, Sader HS. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2007). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:331-4.
- 3) Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagace-Wiens P, *et al.* Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4684-93.
- 4) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
- 5) Mutlu GM, Wunderink RG. Severe pseudomonal infections. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:458-63.
- 6) Mahar P, Padiglione AA, Cleland H, Paul E, Hinrichs M, Wasiak J. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burns patients: Risk factors and outcomes. *Burns* 2010;36:1228-33.
- 7) Lambert ML, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, *et al.* Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:30-8.
- 8) Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005;105:477

- 98.
- 9) Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:939-51.
 - 10) Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004;53:1233-40.
 - 11) Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, *et al.* Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305-12.
 - 12) Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003;362:1888-93.
 - 13) Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:185-90.
 - 14) Gurung M, Moon DC, Tamang MD, Kim J, Lee YC, Seol SY, *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla* (IMP-1) in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68:468-70.
 - 15) Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, *et al.* Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. *J Microbiol* 2016;54:44-9.
 - 16) Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC. Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:490-1.
 - 17) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI; 2015.
 - 18) Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
 - 19) Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1007-12.
 - 20) Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, *et al.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:178-84.
 - 21) Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1843-5.
 - 22) Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T. Detection of *aac*(6)-I genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2925-8.
 - 23) Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, *et al.* Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999;37:758-61.
 - 24) Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 1999;150:317-22.
 - 25) Lee YC, Ahn BJ, Jin JS, Kim JU, Lee SH, Song DY, *et al.* Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents, but susceptible to colistin, in Daegu, Korea. *J Microbiol* 2007;45:358-63.
 - 26) Lee J, Oh CE, Choi EH, Lee HJ. The impact of the increased use of piperacillin/tazobactam on the selection of antibiotic resistance among invasive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int J Infect Dis* 2013;17: e638-43.
 - 27) Khan F, Khan A, Kazmi SU. Prevalence and Susceptibility Pattern of Multi Drug Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Karachi. *Pak J Med Sci* 2014;30:951-4.