

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 방법을 이용한 국내 분리 *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* Complex 균주의 유전자종 동정

서남대학교 의과대학 미생물학교실
오재영 · 조재위 · 박종천 · 이제철*

=Abstract=

Genomic Species Identification of *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* Complex Strains by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

Jae-Young Oh, Jae-We Cho, Jong-Chun Park and Je-Chul Lee*

Department of Microbiology, Seonam University College of Medicine, Namwon, Korea

Members of the genus *Acinetobacter* are recognized as newer pathogens of the nosocomial infection with an increasing frequency in recent years. Strains that belonged to *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (genomic species 1, 2, 3, and 13TU) were major groups associated with nosocomial infection. Phenotypic identification was unreliable and laborious method to classify *Acinetobacter* strains into 19 genomic species. Rapid and reliable identification of clinical isolates is essential to diagnosis and epidemiology of *Acinetobacter*. We investigated the suitability of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) to identify genomic species of 131 *Acinetobacter* isolates. The 16S rRNA genes (ribosomal DNA) were enzymatically amplified and the amplified PCR products were restricted independently with the enzymes, *AluI*, *CfoI*, and *MboI*. Genomic species of *Acinetobacter* was classified by the combinations of restriction patterns. The analysis was showed that restriction profiles were characteristic for each genomic species. One hundred fourteen isolates were identified as *A. baumannii*, twelve were identified as genomic species 13TU, and one was identified as genomic species 3. Four isolates were found to be unknown organisms. All of the isolates which were identified to *A. baumannii* by phenotypic tests were completely discriminated into *A. baumannii* and genomic species 13TU by ARDRA. This study demonstrates that ARDRA is a rapid and simple techniques for the identification of *Acinetobacter* species according to the genomic species.

Key Words: *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex, Nosocomial infection, ARDRA, Genomic species

접수 : 2000년 2월 1일, 게재결정 : 2000년 5월 26일

*책임저자: 이제철, 590-711, 전북 남원시 광치동 720번지 서남대학교 의과대학 미생물학교실, 전화: 0671) 620-0341, FAX: 0671) 620-0345 e-mail: leejc@tiger.seonam.ac.kr

서 론

Acinetobacter 균은 호기성 그람음성 비발효성 간구균으로 병원환경을 비롯하여 자연계에 널리 존재하며 인체에서도 정상세균총으로 발견되는 균이다^{2,13}. *Acinetobacter* 균은 낮은 병원성에도 불구하고 오염된 의료장비나 의료진의 손에 의해서 인체감염을 일으키는 균으로 1990년대 이후부터는 원내감염의 원인균으로 급격한 증가를 보이고 있다. 인체감염은 하부호흡기 감염이 가장 흔하고, 비뇨기감염, 창상감염 및 패혈증 등 다양한 감염증을 유발한다¹⁴. 국내에서 분리되는 대부분의 *Acinetobacter* 균주들은 항균제에 중복내성을 가지고 있어서 감염치료가 힘들며, 이러한 중복내성균들은 환자의 가검물에서뿐만 아니라 피부나 점막에서도 분리되므로 분리균을 실제 감염균으로 진단하기가 힘이 든다.

Acinetobacter 균의 분류체계는 아직까지 명확하게 정립되어 있지 않으나 현재는 표현형이 아닌 유전형에 따라서 균들을 분류하고 있으며, Bouvet과 Grimont⁴이 고안한 DNA-DNA hybridization 방법에 의한 유전자종 (genospecies, genomic species) 분류법에 따라서 균을 분류하고 있다. 그러나 병원의 미생물 검사실에서는 균의 생화학적 성상에 근거한 표현형에 의한 Bergey's manual 분류법¹³에 따라 균을 분류하고 있는 실정이므로, 균의 동정, 분류 및 역학조사 등의 실험을 위해서는 균을 재동정해야 하는 번거로움이 있다. Bergey's manual에 의한 분류법¹³의 단점은 *Acinetobacter* 균들이 많은 종류의 생화학적 검사에 반응하지 않아 다른 유전형을 가지고 있음에도 불구하고 동일한 표현형을 나타내어 동일한 균종으로 동정되고 있으며, 이러한 분류법은 DNA-DNA hybridization에 의한 최근의 유전자종 동정법과는 전혀 일치하지 않고 있다. 지금까지 밝혀진 유전자종은 최초로 Bouvet과 Grimont⁴의 분류법에 의한 12개의 유전자종과 Tjernberg와 Ursing¹⁶에 의한 3개의 유전자종 (13-15균) 및 Bouvet과 Jeanjean³에 의한 5개의 유전자종 (13-17균)이 보고되어 19개의 유전자종으로 분류되고 있으나, 이들 동정방법도 학자들마다 다른 방법에 따라서 균을 분류하고 있으므로 통일되고 체계적인 분류방법이 필요하다.

임상검체에서는 유전자종 1 (*A. calcoaceticus*), 유전자종 2 (*A. baumannii*), 유전자종 3 및 유전자종

13TU (Tjernberg and Ursing)를 포함하는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 균들이 대부분 분리되고 있다^{1,2}. 이들 균종들은 균종간에 유사성이 높고 대부분의 표현형이 동일하므로 표현형에 의해서는 유전자종 동정이 불가능하며, 분자 유전학적 방법에 의한 유전형으로만 분류가 가능하다^{7,8,10}. *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 균종중 *A. baumannii* 균종이 임상검체에서 가장 많이 분리되는 균종으로 이 균종은 다른 유전자종에 비해 각종 항균제에 대한 내성율이 높고 원내감염의 유행균으로 가장 많이 분리되므로 다른 유전자종과 구별할 필요성이 있으며, 감염균의 역학조사를 위해서도 정확한 균종 동정이 필수적이다^{9,15,17,18}.

Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)는 균이 가지고 있는 16S rRNA의 유전자를 특이 primer로 증폭하고 증폭산물을 각종 제한효소로 처리하여 그 양상을 표준균주 또는 서로 다른 균주와 비교하는 방법이다²⁰. ARDRA는 실험과 결과분석이 비교적 쉽고 균종간의 변별력이 뛰어난 방법으로 *Mycobacterium*과 *Mycoplasma* 등 여러 세균들의 동정과 역학조사에 이용되고 있는 방법이다^{5,19}. 본 연구는 임상검체에서 분리된 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 균주를 대상으로 ARDRA 방법을 적용하여 유전자종을 동정하였다.

재료 및 방법

균 주

A. calcoaceticus-*A. baumannii* complex에 속하는 유전자종의 표준균주는 네덜란드의 Dijkshoorn⁶으로부터 분양받은 *A. calcoaceticus* ATCC23055와 *A. baumannii* ATCC19606, 유전자종 3 ATCC19004 및 유전자종 13TU ATCC17903의 4주를 사용하였다. 임상분리 균주는 서남대학교 병원에서 분리된 4주와 연세대학교 병원에서 분리된 20주, 단국대학교 병원에서 분리된 27주 및 전남대학교 병원에서 분리된 80주 등 131주를 사용하였다.

표현형에 의한 균종 동정

배양온도에 따른 균의 성장검사는 nutrient agar plate (NAP; Difco, Detroit, Mich., USA)에서 배양된 균을 brain heart infusion broth (BHI; Difco)에서 30℃에서 20시간 재 배양한 후 배양액을 스포이

드로 한방울씩 4 ml BHI broth에 접종하고 30℃, 37℃, 41℃ 및 44℃ 배양기에서 48시간 배양하여 혼탁정도를 보고 결과를 판정하였다. 표현형에 의한 균의 최종 동정은 API20NE kit (bioMerieux sa, France)를 이용하여 균을 동정하였다.

염색체 DNA의 분리

4 ml의 trypticase soy broth (Difco)에 균을 접종하여 30℃에서 20시간 진탕 배양한 배양액 1.5 ml를 12,000 rpm으로 원심분리하여 세포침사를 얻었다. 세포침사를 567 µl의 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시키고 30 µl의 10% sodium dodecyl sulfate와 3 µl의 proteinase K (20 mg/ml)를 가하여 섞은 후 37℃에서 1시간 배양하여 균체를 완전히 용해시켰다. 용해액에 100 µl의 5 M NaCl을 첨가하여 잘 섞은 후 80 µl의 CTAB/NaCl 용액 (0.7 M NaCl 용액에 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide)을 넣고 65℃에서 10분 반응시켜 세포의 단백질과 다당질을 CTAB와 복합체를 이루게 하여 0.8 ml의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)로 핵산을 추출하였다. 세균의 단백질과 다당질을 완전히 제거하기 위하여 위의 과정을 3~5회 반복하고 핵산을 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)로 추출하여 동량의 isopropanol로 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 뒤 TE buffer에 녹인 다음 전기영동하여 염색체 DNA를 확인한 뒤 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

유전자종의 동정

ARDRA를 이용하여 *Acinetobacter* 균주의 유전자종을 동정하였다²⁰⁾. 위의 방법에 따라 세균의 DNA를 추출하거나 NAP배지에서 배양된 집락을 증류수로 희석하고 10분간 끓여서 PCR의 주형으로 사용하였다. 1.25 U의 *Taq* polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japan), 250 µM의 dNTP, 50 mM의 KCl, 10 mM의 Tris-HCl 및 1.5 mM의 MgCl₂로 조성된 PCR 반응액에 0.2 µM의 primer와 5 µl의 주형 DNA를 넣어 최종 50 µl로 만들어 반응을 실시하였다. PCR 반응은 DNA thermal cycler (Model 9600, Perkin-Elmer Cetus)를 사용하여 95℃에서 5분간 반응시켜 주형 DNA를 변성시키고 다시 95℃에서 45초, 50℃에서 45초, 72℃에서 1분간 35회 반복하고, 72℃에서 7분간 최종적으로 반응시켰다. 사용한 primer의 DNA 염기서열은 5'-TGG CTC

Table 1. Species identification of *Acinetobacter* strains by phenotype and ARDRA

Species	No. (%) of strains	
	Phenotype	ARDRA
<i>A. baumannii</i>	124 (94.7)	114 (87.0)
Genospecies 3	0	1 (0.8)
Genospecies 13TU	0	12 (9.2)
Unknown organisms	7 (5.3)	4 (3.0)
Total	131 (100)	131 (100)

AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3'과 5'-TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CA-3'으로 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였다. 반응 후 증폭된 PCR 산물은 3% agarose gel (FMC BioProduct, Maine, USA)에서 전기영동하여 약 1,500 bp의 크기를 확인하고 *AluI*, *CfoI* 및 *MboI*의 제한효소 (Promega, Madison, Wis., USA)를 사용하여 절단하였다. 10 µl의 PCR 산물에 5 U의 제한효소를 첨가하여 최종 20 µl가 되게 한 후 37℃에서 2시간 반응시켜 얻어진 산물을 전기영동하여 나타난 band 양상을 표준균주와 비교하여 유전자종을 결정하였다. 표준균주의 제한효소 절단양상은 유전자 이미지 분석장치 (Imager^{II}; 바이오니아)를 사용하여 band의 크기를 측정하고 표준화하였으며, 분자량 측정시 진하게 염색되는 band들만 분자량을 측정하였고 희미하게 염색되거나 100 bp 이하의 band는 계산하지 않았다.

결 과

표현형에 의한 *Acinetobacter* 균주의 균종 동정

4개의 병원에서 *Acinetobacter* 균으로 동정된 131주를 배양온도에 따른 균 성장유무와 API20NE Kit를 사용하여 균의 표현형에 따라서 다시 동정하였다. 배양온도에 따른 균 성장은 131주중 127주가 37℃, 41℃ 및 44℃의 온도에서 성장하였으며, API20NE를 사용한 동정결과에서는 131주중 124주 (94.7%)는 *A. baumannii*로 동정되었고 7주 (5.3%)는 어느 균으로도 동정되지 않았다 (Table 1).

표준균주의 ARDRA 양상

Acinetobacter 표준균주를 이용하여 ARDRA를 표준화하였다. *A. calcoaceticus* ATCC23055, *A. ba-*

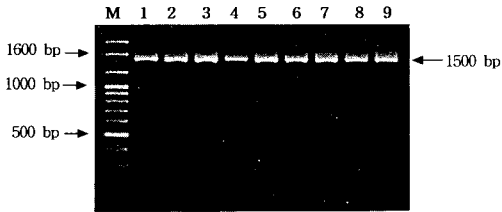


Figure 1. Amplified ribosomal DNA restriction analysis of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains. The 16S rRNA genes of *Acinetobacter* strains were amplified with the specific primer pairs. Lane M, 100 bp DNA ladder.

umannii ATCC19606, 유전자종 3 ATCC19004 및 유전자종 13TU ATCC17903의 4주를 16S rRNA 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 시행한 결과 4주 모두에서 약 1500 bp 크기의 산물이 증폭되었다 (Fig. 1). 증폭산물을 *AluI* 제한효소로 처리한 결과 *A. baumannii*, 유전자종 3 및 유전자종 13TU의 균주에서는 385, 220, 185 bp 크기의 절편 (양상 I)과 *A. calcoaceticus* 균주에서는 450, 390, 230 bp 크기의 절편 (양상 II)이 나타났다 (Fig. 2A). *MboI*으로 처리한 결과 *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, 및 유전자종 13TU의 균주에서는 605, 328,

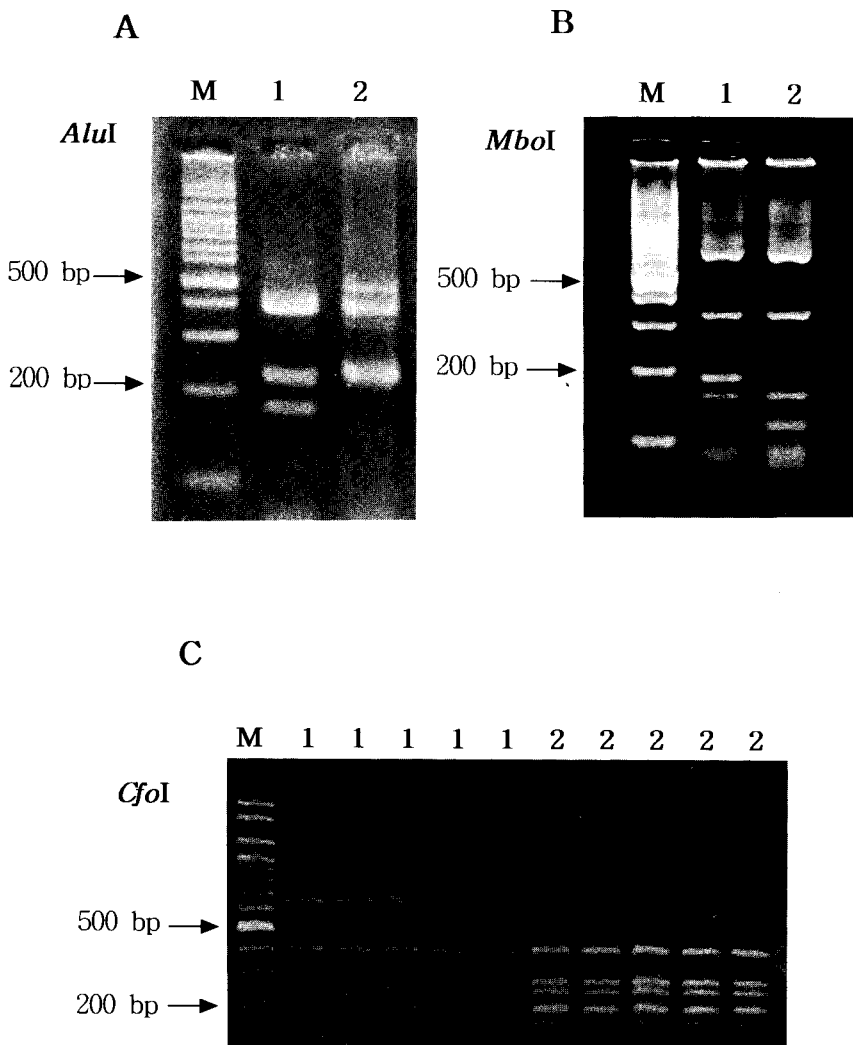


Figure 2. Amplified ribosomal DNA restriction analysis of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains. The amplified PCR product was digested with *AluI* (A), *MboI* (B), and *CfoI* (C). Lane M, 100 bp DNA ladder. Numbers above each lane correspond to arbitrarily assigned restriction pattern numbers for each enzyme.

Table 2. Differentiation of genospecies by restriction fragment patterns in *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains

Genospecies	Restriction pattern by the following enzymes*		
	<i>AluI</i>	<i>CfoI</i>	<i>MboI</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	2	2	1
<i>A. baumannii</i>	1	1	1
Genospecies 3	1	2	2
Genospecies 13TU	1	2	1

*The restriction patterns of each restriction enzyme were depicted in the text

Table 3. Genospecies identification of *Acinetobacter* strains by ARDRA

Genospecies	No. of strains				Total (%)
	Yonsei	Dankook	Chunnam	Seonam	
<i>A. calcoaceticus</i>	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	15	27	69	3	114 (87.0)
Genospecies 3	1	0	0	0	1 (0.8)
Genospecies 13TU	3	0	8	1	12 (9.2)
Unknown organisms	1	0	3	0	4 (3.0)
Total	20	27	80	4	131 (100)

192, 185 bp 크기의 절편 (양상 I)과 유전자종 3의 균주에서는 605, 328, 185, 120 bp 크기의 절편 (양상 II)이 나타났다 (Fig. 2B). *CfoI* 제한효소로 처리하면 *A. baumannii* 균주에서는 645, 410, 258, 200 bp 크기의 절편 (양상 I)이 나타나고, *A. calcoaceticus*, 유전자종 3 및 유전자종 13TU의 균주에서는 420, 295, 265, 205, 175 bp 크기의 절편 (양상 II)이 나타나 표현형과 유전형이 가장 유사하여 구분이 어려운 *A. baumannii* 균종과 유전자종 13TU를 분류할 수 있었다 (Fig. 2C). 한가지 제한효소 처리에 의해서는 4개의 균종을 구분할 수 없었으나 3종의 제한효소 처리결과를 조합하면 *A. calcoaceticus* 균종과 유전자종 13TU는 각각 *AluI*과 *MboI*에 의해서 다른 균종과 구분할 수 있었고, *A. baumannii* 균종과 유전자종 13TU 균종은 *CfoI*의 절편양상에 의해 구분이 되어 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 4개의 유전자종은 *AluI*, *CfoI* 및 *MboI*의 3종류의 제한효소에 의해서 쉽게 동정할 수 있었다 (Table 2).

임상분리 *Acinetobacter* 균주의 유전자종 동정

임상검체에서 분리된 *Acinetobacter* 균주 131주를 ARDRA 방법으로 유전자종을 동정한 결과 *A. baumannii* 균종이 114주 (87.0%), 유전자종 13TU가 12주 (9.2%), 유전자종 3이 1주 (0.8%) 동정되었다 (Table 3). 나머지 4주 (3.1%)는 PCR에서 모두 2 kb 이상의 산물이 증폭되고 API20NE를 이용한 동정에서도 *Acinetobacter* 균속 균주가 아닌 것으로 나타났다. 임상검체에서 *A. calcoaceticus* 균종 균주는 동정되지 않았다. *AluI* 처리결과 400, 220, 200, 185 bp 크기와 *CfoI* 처리양상에서는 265, 205, 175 bp 크기가 나타난 2주는 표준균주의 제한효소 처리결과와는 다른 양상을 나타내었다. 2주의 제한효소 처리결과를 유전자종 13TU의 표준균주와 비교해 보면, *CfoI*의 경우 420과 295 bp 크기의 band가 나타나지 않았고, *AluI*의 경우 400 bp와 200 bp의 절편이 나타났다. 이러한 결과는 *AluI*의 양상 II와 *CfoI*의 양상 I과는 전혀 다른 결과여서 최종적으로 유전자종 13TU로 동정하였다. 표현

형에 의해 *A. baumannii* 균종으로 동정된 124주는 ARDRA에 의해서는 *A. baumannii* 균종으로 111주, 유전자종 3으로 1주, 유전자종 13TU로 12주가 동정되었고, 표현형에 의해 어느 균종으로도 동정되지 않았던 7주는 ARDRA로 동정한 결과 3주가 *A. baumannii*로 동정되었다.

고 찰

본 연구는 표현형에 의해서는 최근의 분류법인 유전자종으로 동정되지 않는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 균주들을 대상으로 ARDRA 방법을 적용하여 동정하였다. 각 병원에서 표현형에 의해 *Acinetobacter* 균으로 동정된 131주는 온도에 따른 균 성장유무와 API20NE를 이용해서 재동정한 결과 124주가 *A. baumannii*이었으며 ARDRA 방법에 의해서는 114주가 *A. baumannii* 균종으로 나타나 표현형에 의한 동정방법과 유전형에 의한 동정방법에는 큰 차이가 있었다. 표현형에 의해 어느 균종으로도 동정되지 않았던 7주는 ARDRA 방법에 의해 3주가 *A. baumannii* 균종으로 동정되어 ARDRA 방법의 민감도와 특이도가 높음을 알 수 있었다.

A. calcoaceticus-*A. baumannii* complex에 속하는 균주는 *Acinetobacter* 균들중 인체감염 원인균의 대부분을 차지하고 있으며, 특히 *A. baumannii* 균종은 중환자실의 호흡기 감염, 비뇨기감염 및 창상감염 등 *Acinetobacter* 균종 중 인체감염의 가장 중요한 원인균으로 보고되고 있다^{1,2)}. 외국에서는 유전자종 3과 유전자종 13TU 균종에 의한 원내감염의 유행이 보고되고 있으며, 국내에서도 입원환자에서 유전자종 3과 유전자종 13TU 균종의 분리가 차츰 증가하고 있는 추세에 있다^{1,12)}. 감염 환자의 진단과 치료 및 역학조사를 위해서는 감염의 원인균인 *Acinetobacter* 균주를 정확히 동정하는 것이 필수적이나 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 4개의 유전자종은 다른 유전자종의 균들보다 표현형과 유전형의 유사성이 높기 때문에 현재 임상 검사실에서 사용되는 표현형에 의한 분류방법으로는 정확히 동정되지 않는다.

Acinetobacter 균종 분류의 가장 기본이 되는 DNA-DNA hybridization 방법은 가장 정확한 방법이나, 대부분의 임상실험실에서는 시행하기가 까다롭고 시간과 비용이 많이 드는 단점을 가지고 있으므로 DNA-DNA hybridization 방법과 동일한

민감도와 특이도를 가지면서 적은 비용으로 간편하게 시행될 수 있는 방법이 필요하다^{7,8)}. Gerner-Smidt 등¹¹⁾에 의한 ribotyping 방법은 *Acinetobacter*의 유전자종과 균주에 따라서 각각 다른 band 양상을 나타내므로 유전자종 동정뿐만 아니라 역학조사까지 가능한 방법이나 역시 많은 비용과 시간이 소요되는 단점을 가지고 있다. ARDRA 방법은 세균이 가진 16S rRNA의 유전자를 PCR로 증폭하고 증폭산물을 제한효소로 처리하여 나타나는 band 양상을 비교 분석하는 방법으로 *Acinetobacter* 균종 동정뿐만 아니라 여러 종류의 세균 동정과 분류에 많이 이용되는 방법이다^{5,19,20)}.

본 연구는 *Acinetobacter* 표준균주를 이용하여 먼저 ARDRA 방법을 표준화하고 임상검체에서 분리되어 표현형에 의해 *Acinetobacter* 균속으로 동정된 균주를 대상으로 ARDRA 방법을 적용하였다. 표준균주를 이용한 실험에서는 *AluI*, *CfoI* 및 *MboI*의 3종류의 제한효소를 사용한 결과의 조합에서 각각의 유전자종에 따라 다른 결과가 나타나 유전자종 동정이 가능하였다. 이 방법은 기술적으로 적용하기가 쉽고 빠른 시간내에 결과를 알 수 있으며, 결과의 해석도 ribotyping이나 DNA-DNA hybridization처럼 복잡하지 않고 단순하므로 임상실험실에서 적용하기가 용이하다. 그러나 모든 임상균주에서 제한효소 처리결과가 동일하지 않고 다른 결과를 나타내는 균주가 2주가 나와서 결과해석이 어려운 단점이 있었다. 표현형에 의한 동정방법과 유전형에 따른 동정방법은 분류체계는 다르지만 현재 사용되는 분류법인 유전자종 분류방법과 비교해 볼 때 표현형에 의한 분류는 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 4개의 유전자종은 전혀 구분할 수 없었다. *A. baumannii* 균종이 아닌 17주중 13주는 유전자종 3과 13TU 균종으로 동정되어 *Acinetobacter* 균속 균주로 동정된 127주는 모두 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 균들이었고, *A. calcoaceticus* 균종은 분리되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 ARDRA 방법은 표현형으로 분류가 불가능한 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex 균주들을 유전형에 따라 유전자종으로 정확하게 분류할 수 있었으며, 임상분리주의 87%가 *A. baumannii* 균종인 것으로 나타났다. ARDRA 방법을 이용한 *Acinetobacter* 균속 균주의 정확한 유전자종 동정은 감염 환자의 진단과 원내감염을 일으킨 유행균주의 역학조사에 많

은 도움이 될 것으로 판단된다.

결 론

A. calcoaceticus-*A. baumannii* complex에 속하는 균주를 유전자종으로 동정하기 위하여 *AluI*, *CfoI* 및 *MboI* 제한효소를 사용하여 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) 방법으로 임상검체에서 분리된 *Acinetobacter* 131주를 대상으로 유전자종을 동정하였다.

Acinetobacter 표준균주를 대상으로 16S rRNA 유전자를 특이 primer로 증폭한 결과 모든 균종에서 약 1500 bp 크기의 증폭산물을 얻을 수 있었으며, *AluI*, *CfoI* 및 *MboI* 제한효소로 처리한 전기영동상에서는 제한효소에 따라 각각 2개의 band 양상이 나타나 band 양상의 조합으로 유전자종을 동정할 수 있었다. 131주의 임상분리 균주는 표현형에 의해서 124주의 *A. baumannii* 균종과 동정이 불가능한 균주 7주로 동정되었으나, ARDR 방법 에 의해서는 *A. baumannii* 균종이 114주 (87.0%), 유전자종 13TU가 12주 (9.2%), 유전자종 3이 1주 (0.8%)로 동정되었다. 나머지 4주는 표현형과 ARDR 방법 에 의해서 *Acinetobacter* 균속 균주가 아닌 것으로 나타났다. 표현형에 의해서는 동정이 불가능하였던 7주중 3주는 ARDR 방법 에 의해 *A. baumannii*로 동정되었다. 임상분리주에서 *A. calcoaceticus* 균종은 분리되지 않았다.

이상의 결과로 생화학적 성상에 근거한 표현형에 의한 *Acinetobacter* 균종 동정방법은 최근의 분류방법인 유전자종 분류법과는 큰 차이가 있었으며, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex에 속하는 균주를 *AluI*, *CfoI* 및 *MboI* 제한효소를 사용한 ARDR 방법 으로 정확하게 유전자종을 동정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 조동택, 이제철, 김정민, 신형섭, 장희경, 안수열: *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* 복합군의 ribotyping에 의한 동정. 대한미생물학회지 **33**: 605-617, 1998.
- 2) Bergogne-Berezin E, Tower K: *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **9**: 148-165, 1996.
- 3) Bouvet PJM, Jeanjean S, Vieu J-F, Dijkshoorn L: Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* **28**: 170-176, 1990.
- 4) Bouvet PJM, Grimont PAD: Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 228-240, 1986.
- 5) Deng S, Hiruki C, Robertson JA, Stemke GW: Detection by PCR and differentiation by restriction fragment length polymorphism of *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Mycoplasma*, and *Ureaplasma*, based upon 16S rRNA genes. *PCR Methods Applications* **1**: 202-204, 1992.
- 6) Dijkshoorn L, Aucken HJ, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J, Pitt TL: Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* **31**: 702-705, 1993.
- 7) Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Multi-Bragadin C: Identification of *Acinetobacter* isolates in *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol* **33**: 1108-1113, 1995.
- 8) Ehrenstein B, Bernards A, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner K, Bouvet P, Daschner F, Grundmann H: *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol* **34**: 2414-2420, 1996.
- 9) Ferreira M, Vieu J, Klein B: Phage-types and susceptibility to 26 antibiotics of nosocomial strains of *Acinetobacter* isolated in Portugal. *J Int Med Res* **12**: 364-368, 1984.
- 10) Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J: Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* **29**: 277-282, 1991.
- 11) Gerner-Smidt P: Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex.

- J Clin Microbiol* **30**: 2680-2685, 1992.
- 12) Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L: Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **33**: 1567-1572, 1995.
 - 13) Juni E: Genus III. *Acinetobacter* In Krieg NR, Holt JG (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp303-307, 1984.
 - 14) Schreckenberger PC, von Graevenitz A: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American society for microbiology, Washington, D.C., pp540-543, 1999.
 - 15) 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* **32**: 2677-2681, 1994.
 - 16) Tjernberg I, Ursing J: Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**: 595-605, 1989.
 - 17) Tjernberg I: Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* strains identified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **98**: 320-326, 1990.
 - 18) Traub WH, Spohr M: Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter* species (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, genospecies 3, and genospecies 6). *Antimicrob. Agents Chemother* **33**: 1617-1619, 1989.
 - 19) Vaneechoutte M, De Beenhouwer H, Claeys G, Verschraegen G, De Rouck A, Paepe N, Elaichouni A, Portaels F: Identification of *Mycobacterium* species with amplified rDNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **31**: 2061-2065, 1993.
 - 20) Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G: Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **33**: 11-15, 1995.