

## Phenotypic and Genotypic Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*

Byoung-Seon Yang<sup>1</sup>, Keun-Seok Hong<sup>1</sup>, Seung-Bong Jung<sup>1</sup>, Young-Hoon Kwon<sup>1</sup>, Jong-Yoon Jeong<sup>1</sup>, Min-Joo Lee<sup>1</sup>, Hye-In Lee<sup>1</sup>, Mi-Seon Park<sup>1</sup>, and Seung-Gu Choi<sup>2</sup>

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea<sup>1</sup>

Department of clinical laboratory, Science, Shinheung College, Uijeongbu 480-701, Korea<sup>2</sup>

This study was undertaken to evaluate phenotypic and genotypic methods for detection of Metallo-Beta-Lactamases (MBLs) among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*. Of the 50 *P. aeruginosa* isolates from clinical specimens, 20 were evaluated for carbapenem resistance and screened for MBL by double-disk synergy test and combined-disk test. Nineteen strains (95%) were found to be MBL producers among the 20 *P. aeruginosa*. MBL positives were further confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR). For the IMP and VIM types of MBLs, PCR analysis was performed on 19 of the 20, and 10 were positive for VIM MBL type. This study reports the validation of a simple and accurate MBL detection method that can be easily incorporated into the daily routine of a clinical laboratory. Early detection of MBL-carrying organisms, including those with susceptibility to carbapenems, is of paramount clinical importance, as it allows rapid initiation of strict infection control practices as well as therapeutic guidance for confirmed infection. Key Words : Hepatitis A virus (HAV), Anti-HAV, Hospital workers, Prevalence, Vaccination

Key Words : Metallo- $\beta$ -Lactamases, Double-disk synergy test, Combined-disk test

### 서론

*Pseudomonas aeruginosa*은 호기성 포도당 비발효 그람 음성간균으로 원내 감염의 20% 정도를 차지하며, 인공호흡기를 사용하는 환자의 호흡기계 감염, 화상 감염, 섬유성 낭종 환자에서의 폐렴, 면역이 저하된 환자에서 전신성 감염과 요로 감염의 중요 원인균이다. 중환자실에서 *P. aeruginosa*은 *Staphylococcus aureus*에 이어 두번째로 흔한 원내

감염균이다. 더욱이 *P. aeruginosa*은 많은 항균제에 대해 자연 내성과 획득내성을 가지므로 이 세균 감염증은 치료가 어렵다(Behera 등, 2008). Metallo- $\beta$ -Lactamase(MBL) 생성 *P. aeruginosa*은 1991년 일본에서 처음으로 보고되었다. 그 이후 아시아, 유럽, 호주, 북아메리카 및 남아메리카에서 발견되었다. 대부분의 국가에서 MBL생성 *P. aeruginosa*은 병원감염의 원인균이다. MBL생성 *P. aeruginosa*은  $\beta$ -Lactam계, aminoglycosides와 quinolones계 항생제에 내성을 보인다(Gales 등, 2003). MBL생성 *P. aeruginosa*은 다제내성유전자를 가지고 있어 독성이 강한 polymyxinB와 colistin항생제로 치료해야 한다(Bush, 1999). MBL생성 *P. aeruginosa*은 촉매활성에 아연(Zn)이 요구된다. MBL활성은 EDTA또는 Thiol화합물과 같은 금속킬레이트(metal chelate)에 의해 억제된다(Castanheira 등, 2009). MBL 생성 균주는 aztreonam(ATM)을 제외하고 penicillins, cepha-

Corresponding Author : Yang, Byoung Seon, Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea.  
Tel: 010-2835-7191, E-mail: ybseon@hanmail.net

Received : 9 March 2012

Return for modification : 21 March 2012

Accepted : 21 June 2012

losporin과 carbapenem계 항생제에 내성이다. MBL생성 *P. aeruginosa*검출방법으로 여러 가지 표현형 및 유전형 방법이 있다(Cirioni 등, 2007). 표현형double disk synergy test(DDST)나 combined disk test(CDT)방법은 단순하고 경제적인 방법이다. CLSI가이드라인에서는 DDST 및 CDT 등 여러 가지 방법을 추천하고 있다. 표준화된 MBL생성세균 검출방법으로 MBL Etest방법을 있으나 비용이 많이 들어 일반 미생물실험실에서 사용하기 어렵다(Lee 등, 2003; Tsakris 등, 2006).

유전형 PCR방법은 민감하고 정확한 방법이나 실험자의 숙련된 기술이 요구된다. 그러나 PCR방법은 임상 분리균주의 검출과 분석에 특이적이고, 시간적인 소모가 적고 분석력과 재현성이 좋은 방법이다. 본 연구에서는 C대학병원으로부터 MBL균주를 분리하여 미생물실험실에 사용이 가능하며 간편하고 비용이 적게 드는 DDST와 CDT실시하였다. 또한 IMP과 VIM유전자를 대상으로 duplex PCR 방법을 실시하여 MBL생성 *P. aeruginosa* 검출하여 표현형과 유전형형을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

C 대학병원에서 VITEK기기로 MBL 생성 *P. aeruginosa*세균으로 동정된 20균주를 대상으로 하였다. 표준화된 생화학적 방법 및 Kirby Bauer디스크확산법으로 imipenem(IPM), meropenem (MEM)디스크를 사용하여 MBL 생성 *P. aeruginosa*균주를 확인하였다.

분리균주 동정 및 항생제 감수성 검사 정도관리 균주로 *Escherichia coli* ATCC 25922 와 *P. aeruginosa* ATCC 27853 사용하였다.

### 2. Double disk synergy test

세균 부유액을 Mueller-Hinton Agar (MHA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 imipenem(10 µg)디스크와 meropenem(10 µg)디스크를 EDTA(0.5 M)디스크와 20 mm 간격으로 놓았다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후

결과를 판독하였다. imipenem 디스크나 meropenem 디스크에 의한 억제대가 EDTA 디스크 쪽으로 커지거나 디스크 간 억제대 차이가 5 mm이상 보이면 양성으로 판정하였다.

### 3. Combined disk test

세균 부유액을 Mueller-Hinton Agar(MHA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 imipenem(10 µg)디스크와 imipenem + EDTA(0.5M)디스크나 meropenem(10 µg)디스크와 meropenem+EDTA(0.5M)있는 디스크를 20 mm간격으로 놓았다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였다. imipenem 디스크와 imipenem+EDTA(0.5M) 디스크나 meropenem디스크와 imipenem+EDTA(0.5M) 간에 억제대의 차이가 7 mm이상 보이면 양성으로 판정하였다.

### 4. 균주로 부터의 DNA 분리

20개의 *P. aeruginosa* 균주를 QIAamp DNA Mini kit(Cat. No. 51304)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 순수 분리된 20개 균주를 TSB media(BD, Detroit, USA)를 이용하여 37°C shaking incubator에서 하루 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 후 상등액은 버리고 침전물을 이용하여 QIAamp DNA Mini Kit가 제시한 방법으로 DNA를 추출하였다.

### 5. Duplex PCR을 위한 Primer의 합성

MBL 생성 *P. aeruginosa*의 유전자특성을 분석하기 위한 primer를 다음과 같이 제작하였다(Table 1).

**Table 1.** Primer sets used in charactering Metallo-β-Lactamase

Gene	Primer sequence	PCR product(bp)
IMP	5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' 5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3'	587
VIM	5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' 5'-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG-3'	382

### 6. Duplex PCR을 이용한 MBL 유전자의 증폭

Duplex PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각기 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 uL, primer 2쌍(IMP, VIM) 10 pmol 각각 1 μL씩 넣었고, genomic DNA(25 μg) 1 μL, Taq DNA polymerase(2 unit) 1 μL, 최종 반응액은 증류수로 20 μL 되게끔 실시하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer, Wellesley, USA)에서 94°C에서 1분간 변성, 58°C에서 1분간 접합, 72°C에서 1분간 확장의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 10분간 최종확장 하였다.

### 7. PCR 산물의 확인

PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel에 Midori Green(2 μL)

을 넣어 1× TAE buffer에서 70 volt, 100 mA로 45분 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 UV transilluminator로 관찰하고, Gel Doc이미지 분석장치로 사진 촬영 하였다.

## 결 과

### 1. Double disk synergy 시험

MBL 생성 *P. aeruginosa*는 IPM+EDTA 또는 MEM+EDTA의 디스크확산법에서 억제존이 5mm이상 차이를 보이거나 상승효과를 보였다.

DDST 시험에서 IPM+EDTA 디스크에서는 P6~P8,

**Table 1.** Genotyping of MBL producing *P. aeruginosa* from university hospital isolates

Strains	Phenotype				Genotype	
	DDST		CDT		IMP	VIM
	(IPM +EDTA)	(MEM +EDTA)	(IPM+IPM-EDTA)	(MEM+MEM-EDTA)		
P1	-	-	+	+	-	+
P2	-	-	+	+	-	+
P3	-	+	+	+	-	+
P4	-	+	+	+	-	+
P5	-	+	+	+	-	+
P6	+	+	+	+	-	+
P7	+	+	+	+	-	+
P8	+	-	+	+	+	-
P9	-	-	+	+	-	-
P10	-	-	+	+	-	-
P11	+	+	+	+	+	-
P12	+	+	+	+	-	-
P13	+	-	+	+	+	-
P14	-	-	+	-	-	+
P15	-	+	+	+	-	-
P16	-	+	+	-	-	-
P17	-	-	+	+	-	+
P18	-	+	+	-	-	+
P19	+	+	+	-	-	-
P20	-	+	-	-	-	-

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; +, positive; -, negative; DDST, Double-disk synergy test; CDT, Combined-disk synergy test; IPM, imipenem; MEM, meropenem

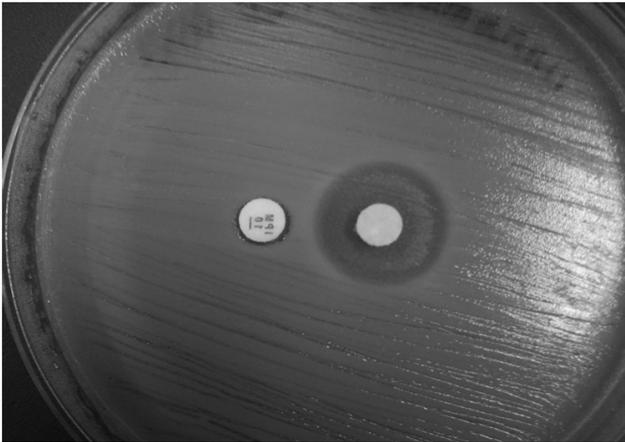


Fig. 1. Detection of MBL producing *P. aeruginosa* 18 strain in IPM+EDTA double disk test.

P11~P13, P19 7균주(35%)가 양성으로 나타났으며, MEM+EDTA 디스크에서는 P3~P7, P11, P12, P15, P16, P18~P20 12균주(60%)가 양성으로 나타났다 (Fig. 1).

## 2. Combined disk 시험

CD 확인 시험에서는 IPM+IPM-EDTA 디스크에서는 P1~P19 19 균주(95%)가 양성으로 나타났으며, P20균주가 음성으로 나타났다. MEM+MEM-EDTA 디스크에서는 P1~P13, P15, P17 15균주(75%)가 양성으로 나타났으며 P14, P16, P18~P20 5균주(25%)가 음성으로 나타났다 (Fig. 2).

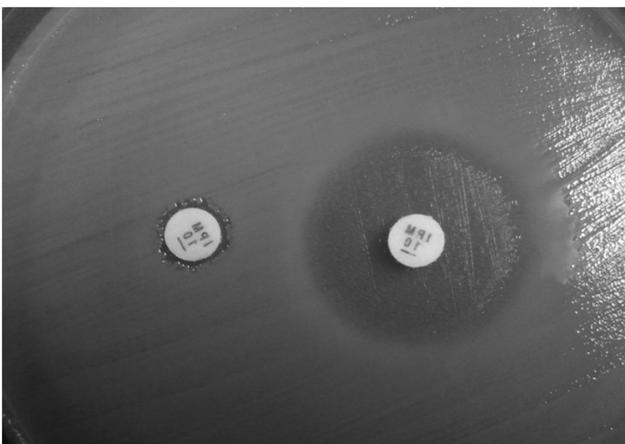


Fig. 2. Detection of MBL producing *P. aeruginosa* 19 strain in IPM+IPM-EDTA combined disk test.

## 3. MBL유전형

Duplex PCR에서는 IMP MBL생성 *P. aeruginosa*는 P8, P11, P13 3균주(15%)가 양성으로 나타났으며, VIM MBL생성 *P. aeruginosa*는 P1~P7, P14, P17, P18 10균주(50%)가 양성으로 나타났다 (Fig. 3).

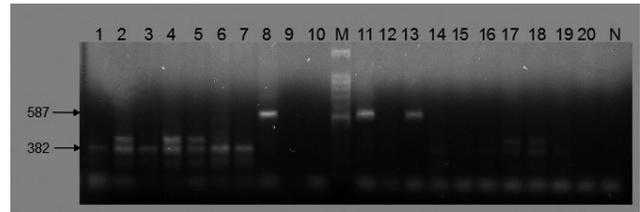


Fig. 3. Electrophoresis of the amplified products of IMP (587bp), VIM(382bp) genes. By a duplex PCR in a 1.5% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; lanes 1 to 20, C university hospital isolates; lane N, negative control. The amplified products and their sizes are indicated on the left.

## 고 찰

최근에  $\beta$ -lactam 항균제에 내성인 세균에 의한 감염의 증가가 중요한 문제로 대두되고 있고 세균이  $\beta$ -lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은  $\beta$ -lactamase 생성, penicillin-binding protein의 변성,  $\beta$ -lactam 항균제의 세포막 투과성 저하, 세포 외로의 항균제 유출 등 다양하며, 장내세균은 흔히  $\beta$ -lactamase 생성에 의하여  $\beta$ -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다(Pitout 등, 2005). 호흡기감염, 요로감염증, 패혈증, 수막염 등 다양한 감염증의 발생 원인이며, 화학요법에 저항성이 강하기 때문에 기회감염증과 균교대증의 원인이 되는 *P. aeruginosa*는 현재 지난 20년 동안 가장 현저하게 증가한 원내감염 원인균으로 대두되고 있으며, carbapenem계 내성을 나타내는 MBL이 증가되고 있는 추세이다(Walsh 등, 2005). Imipenem은분자량이 작기 때문에 친수성이며 세균세포막의 porin을 잘 통과한다. *P. aeruginosa*균주의 경우 D2단백질이 imipenem을 특이적으로 통과시키는 것이다. 이와같이 porin이 항생제 감수성에 많은 영향을 미치며, porin의 소실 혹은 변화되면 항생제에 대한 내성 정도가 높아진다. 그러나 porin이 완

전히 없는 세균은 영양물질을 받아들일 수 없기 때문에 존재할 수 없으며, 소량의 porin만 있어도 항생제는 투과하므로 porin의 소실만으로 항생제에 고도 내성이 되기는 어렵다. 또한 세포내로 유입된 항생제를 능동적으로 세포외로 유출하는 세균도 있다. *P. aeruginosa* 세포외막에 OprK 단백질은 세포 내의 독성 성분을 세포외로 유출하는 기능을 가지고 있으며, 이 단백질이 다량 발현하여 여러 항생제에 내성을 가지게 된다. 이와같이 능동적인 유출에 의해서 여러 가지 항생제에 대한 내성을 획득하는 기전은 다제내성펌프(multidrug resistance pump)라 불린다(Pitout 등, 2005).

지금까지의 MBL생성 *P. aeruginosa*의 검출에는 표현형 특성을 이용하여 검출하는 방법이 널리 알려져 있다. 그러나 표현형적 방법은 검출에 시간이 많이 소요된다는 것과 접종량이 정확하지 않으면 정확한 결과를 얻기가 힘들다. 또한, MBL 매개 화학요법제 내성 유전자의 정확한 동정은 병원에서의 원내감염의 감시와 역학에 대단히 중요한 역할을 할 수 있다(Yong 등, 2002). 본 실험 결과 표현형적 방법으로 분리된 MBL 생성 *P. aeruginosa* 20균주중 DDST결과 IPM에서는 35%(7균주)양성, MEM에서는 60%(12균주)양성으로 나왔으며, CDT결과 IPM에서 95%(19균주), MEM에서 75%(15균주)가 양성으로 나타났다. duplex PCR에서 IMP MBL생성 *P. aeruginosa*는 15%(3균주)가 양성으로 나왔으며, VIM MBL생성 *P. aeruginosa*는 50%(10균주)가 양성으로 나왔다. 그리고 대부분의 MBL 생성 *P. aeruginosa*ae 균주에서는 VIM유전자를 포함하고 있는 것으로 나타났으며 이는 MBL 유전자의 검출과 이 유전자의 monitoring에 중요한 역할을 할 것이라 생각되어진다. 따라서 분자 생물학적 기법인 duplex PCR을 이용한 MBL 내성 유전자의 검출은 이런 표현형적 방법에서의 문제점의 해결이나, 원내감염의 역학에 아주 유용한 방법이라 사료된다.

## 참고문헌

1. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol*. 2008, 26: 233-7.
2. Bush K.  $\beta$ -Lactamases of increasing clinical importance. *Curr Pharm Des*. 1999, 839-45.
3. Castanheira M, Bell JM, Tumidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Strains from India: Evidence for Nationwide Endemicity of Multiple Metallo- $\beta$ -Lactamase Clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the Newly Characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009, 53: 1225-7.
4. Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C, kamysz W, Orlando F, Mochegiani F, et al. Efficacy of tachyplexinIII, colistin, and imipenem against a multiresistance *Pseudomonas aeruginosa* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51: 2005-10.
5. Gales AC, Menezes LC, silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM Metallo- $\beta$ -Lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003, 52: 699-702.
6. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003, 9: 868-76.
7. Pitout JD, Gregson DB, poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005, 43: 3129-35.
8. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S et al. VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg infect Dis*. 2006, 12: 981-3.
9. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005, 18:306-25.
10. Yong D, Lee K, Yum JH et al. Imipenem-EDTA disc method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2002, 40: 3798-801.