

다제내성의 확산에 있어서 integron의 역할

장 숙 진

조선대학교 의과대학 진단검사의학교실

서 론

과거 20년 동안의 활발한 연구 결과 항생제 내성의 기전과 전파에 대한 지식이 상당히 증가되어 왔다. 최근 들어 항생제 내성의 진화에 대한 탐구 방향이 점차 바뀌어 가고 있다. 유전자들에 점돌연변이가 축적되어 연속적으로 변화되면서 생기는 내성 형질들의 clonal transmission에 대해 주로 연구하였던 과거와는 달리 요즘에는 수평적으로 전파되는 유전적 결정인자들의 영향과 내성 유전자의 보충에서 재조합의 역할이 강조되어지는 추세이다[1-3].

내성 유전자들은 세균 집단들간에 교환될 수 있다[4]. 내성 유전자들이 획득되고 파급되는 몇 가지 기전들에 의해 DNA 교환이 일어나고 이런 방식으로 내성 유전자들이 동물과 인간에서 분리되는 세균 집단들 사이에서 효율적으로 전파될 수 있다[5].

수평적인 유전자 운반체에서 내성 유전자를 쉽게 획득할 수 있게 하는 특수한 유전적 구조들이 있음을 발견함으로써 항생제 내성 기전에 대해 더 잘 이해하게 되었다. Integron이라고 불리우는 자연적으로 있는 유전자 표현 요소가 세균이 내성 유전자를 획득할 수 있는 아주 효율적인 유전적 기전으로 기술되어져 왔다. Integron은 동일한 부착 장소 안에 한 개 이상의 유전자 cassette의 획득을 촉진하여 항생제 내성 유전자들의 복합적 군집을 형성한다.

과거 수년간 임상적 및 수의학적으로 분리된 그람 음성 세균 균주들(특히 *Enterobacteriaceae*) 속에서 검출된 많은 항생제 내성 유전자들을 분석한 결과 서로 다른 지역에서 나온 세균성 병원균들 중에서 일어나는 내성 전파에 있어서 integron이 중요하다는 것이 입증되었다.

수평적인 유전자 전달과 integrons : 항생제 내성의 진화

세균들 중에서 수평적 유전자 전달을 촉진하는 주된 기전에는 형질 전환(transformation)과 형질 도입(transduction), 접합(conjugation)이 있다. 세균이 자가 용해된 후에 노출된 DNA를 바로 인접한 환경의 다른 세균이 흡수하여 편입함으로써 생기는 유전적 변형을 형질전환이라고 한다. 이런 출처의 유전적 물질은 자연적으로 형질 전환할 능력이 있는 세균에 의해서 편입되거나 특별한 화학적 또는 물리적 조건하에서 형질 전환할 수 있는 세균에 의해 편입된다[6,7].

phage 입자에 의해 운반되는 외부의 DNA는 수용체(recipient) 세균에게 형질 도입에 의해 전달된다. 이렇게 내성 유전자가 bacteriophage를 매개체로 하여 전달되는 것은 흔히 많은 기전으로 여겨진다. 왜냐 하면 형질 도입 과정이 때로 단일한 세균 clone에 제한되는 등 정상적으로 숙주 범위가 한정되어 있기 때문이다[7].

접합은 수평적 유전자 전달에 있어서 가장 흔히 인지되는 기전이다. 이 기전은 다양한 세균 군종과 속(屬, genera) 내에 존재한다. 이 과정에서 이동가능한 DNA 분자들인 plasmid, episome, 접합 트랜스포손(conjugative transposons)들은 접합-의존적 유전(contact-dependent transmission)을 통해 증여자(donor)로부터 수용체 세포로 전이될 수 있다. *Escherichia coli*의 자가유전 가능한 접합 F-plasmid는 접합에 필요한 모든 요인들에 대한 유전정보를 가지고 있는 자동적으로 복제하는 분자의 가장 잘 알려진 예이다. 접합은 접합 트랜스포손에 의해서도 촉진된다. 접합 트랜스포손은 수용체 세포 내로 자신을 잘라내어 전달하는데 필요한 machinery (즉, 재조합 효소 활성이 작용할 DNA site와 transposase)에 대한 유전정보를 함유한 이동가능한 DNA 구성분자들이다[7].

수평적 전달이 성공적이라면 유전자들이 수용체 세포에 일단 들어온 다음, 그 외부의 DNA가 소실되지 않고 계속 남아있어야 한다. 사실 독립적인 증식능이 없는 DNA 분자들은 그들이 숙주의 염색체에 통합되거나 상동의 또는 변칙적인 재조합에 의해 다른 복제단위(replicon) 안에 통합되지 않는 한 소실된다. 또한 외부 DNA의

이 논문은 2005년도 조선대학교병원 선택진료학술연구비에 의하여 연구되었음.

접 수 일: 05/2/16 게재승인일: 05/3/14

교신저자: 장숙진

(501-759) 광주광역시 동구 서석동 588

조선대학교병원 진단검사의학과

TEL : 062)220-3259, 3272 FAX : 062)232-2063

E-mail : sjbjang@chosun.ac.kr

흡수를 제한하는 DNA 제한 체계들이 존재한다. 이 체계들은 여러 세균 균종들 안에 있으며 들어온 외부의 DNA를 빠르게 잘라낼 수 있다. 그럼에도 불구하고 bacteriophages와 접합 plasmids는 새로운 숙주 안에서 생존하기 위해 도피 전략을 발달시켜 왔다. 이러한 방어 기전에는 제한효소들의 인지대상 장소들의 수를 줄이거나 antirestriction 체계(methylation systems)에 대한 유전정보를 함유하는 방법들이 있다[8]. 새로 획득된 DNA 분자가 생존에 유리하게 선택될 수 있는 기능성 유전정보를 함유하고 있고, 선택되는 것이 숙주세포에게 이익을 주면 그 episome의 확률적인 손실(stochastic loss)이나 외부 유전자의 변이로 인한 불활성화는 회피될 것으로 기대된다.

항생제 내성 유전자의 수평적 전이는 항생제 치료에 노출되는 어떤 세균 집단에 대해서도 생태학적 충격으로부터 보호해줄 잠재력을 제공한다. 그러나 전이된 내성 유전자는 수용체 세균에게 혜택을 주는 방식으로 발현되어야만 한다.

항생제 내성 유전자가 수평적으로 전이되는 DNA 전달 매체 즉, conjugative plasmid에 어떻게 편입되고 발현되는지 그 기전을 알기 위해 많은 연구들이 수행되어 왔다. 그 결과 항생제 내성의 분자생물학적 기반에 대한 최근 연구들은 integron이라 불리우는 DNA 단위에 들어있는 내성 유전자들과 넓은 숙주 범위를 가진 plasmid들이 서로 관련되어 있다는 것을 강조해 왔다[9].

Integron은 자연적인 생물 복제 및 표현 vector이다.

Integron은 이동가능한 유전자 cassette를 인지하고 포획할 수 있는 장소-특이적인 재조합 체계의 구성요소를 가진 유전자라고 정의된다. Integron은 open reading frame (ORF)들을 편입하여 기능적인 유전자들로 변환시키는 유전자 표현 체계이다. Integron의 필수적인 요소들은 integrase 유전자(*intI*)와 결합 장소(*attI*), promoter를 포함한다. *IntI*의 유전정보에 의해 합성된 integrase는 장소-특이적 재조합 효소이다. 이는 특정한 재조합 site를 함유한 항생제 내성 유전자나 ORF를 인지하여 잘라낸 다음 integron의 결합 장소(*attI*)에 붙여준다. Promoter는 적절히 통합된 유전자들은 그 어느 것이나 발현을 촉진한다. 유전자 cassette는 꼭 integron의 일부인 것은 아니나 통합되면 integron의 일부가 된다.

Integron은 기능상 내성 integron (resistance integron=RI)과 superintegron (SI)이라는 두 가지 주된 군으로 분류된다. RI는 주로 항생제와 소독제에 대한 내성을 암호화한 유전자 cassette를 지니고 있으며 염색체나 plasmid 위에 위치할 수 있다. SI 군에 속한 integron은 염색체에 위치해 있는 큰 integron으로서 다양한 기능을 가진 유전자 cassette를 함유하고 있다[10]. 본고에서는 RI를 위주로 integron의 특성을 살펴보고자 한다.

RI에 삽입된 유전자는 다양한 항생제 내성 기전에 대한 유전정보를 함유하고 있다. 삽입된 유전자 cassette는 aminoglycoside와 chloramphenicol, macrolide, penicillin, trimethoprim, sulphonamide 등 다양한 항생제들과 소독제들에 대한 내성을 부여한다[11]. 이들 각 항생제군에 대해 서로 다른 유전자 cassette들이 있는 것으로 보고되어 왔다. 최근 들어, 근래에 도입된 항생제에 대한 내성을 부여하는 광범위 β -lactamase나 carbapenemase들에 대한 유전정보를 함유하고 있는 몇 가지 유전자 cassette들도 있는 것으로 기술되어져 왔다[12].

1. Integron 구조와 분류

Integron은 integrase 단백질의 상동성(40-60% 아미노산 동일성)에 근거를 두어 최소한 6종류의 class로 분류한다[11]. 그중 Class 1은 가장 흔한 구조이고 이 class에 속해 있는 대부분의 요소들은 2개의 보존적 분절인 5'-보존 영역(5'-CS)과 3'-보존 영역(3'-CS)을 가지고 있다. 5'-CS에는 *intI* 유전자와 *attI* 위치, promoter가 있고 3'-CS에는 *sulI* 유전자와 *qacE*Δ1 유전자가 있다. 항생제 내성 유전자 cassette는 5'-CS와 3'-CS 사이에 있는 receptor *attI1* 위치에 삽입되어 있다(Fig. 1). In0라고 지칭되는 integron은 삽입된 유전자가 없어 5'-CS와 3'-CS 영역이 서로 인접해 있다. 한 개의 class 1 integron에 서로 다른 유전자 cassette가 7개나 들어 있다는 보고도 있다. 내성 유전자 cassette는 종류가 다양하여 이미 60개 이상의 서로 다른 내성 유전자 cassette가 밝혀졌으며 앞으로도 계속 증가될 전망이다. 동일한 세균 세포내에 1개 이상의 class 1 integron이 관찰되어 왔다[13].

Integron class에 따라 integrase와 *attI* 위치 염기서열에 차이가 있음에도 불구하고 흔히 나오는 integron인 class 1, 2, 3 integron 모두가 동일한 유전자 cassette를 획득할 수 있다고 여겨지고 있다. 왜냐 하면 동일한 유전자 cassette가 class 1과 2 [14, 15], 그리고 class 1과 3 [16, 17]에서 관찰되기 때문이다. 이것으로 보아 분명히 class-specific integrase가 공통적인 내성 유전자 cassette의 공동이용자(pool)에 작용하는 것으로 보인다.

2. 이동성 유전자 cassette

유전자 cassette는 하나의 완전한 ORF 뒤에 *attC*라고도 불리우는 재조합 위치인 59-base 요소가 뒤따라오는 독특한 단위(unit)로 정의된다. gene cassette는 coding sequence 앞에 promoter가 없으며 이는 integron의 5'-CS에 있는 promoter가 그 cassette의 발현에 필수적이라는 것을 의미한다. class 1 integron은 5'-CS에 P₁과 P₂라는 두 개의 잠정적 promoter가 들어 있다. Promoter의 바로 뒤에 위치한 gene cassette에 대해 가장 높은 수준의 발현이 일어나는 반면 뒤쪽에 있는 cassettes는 선행하는 gene cassette의

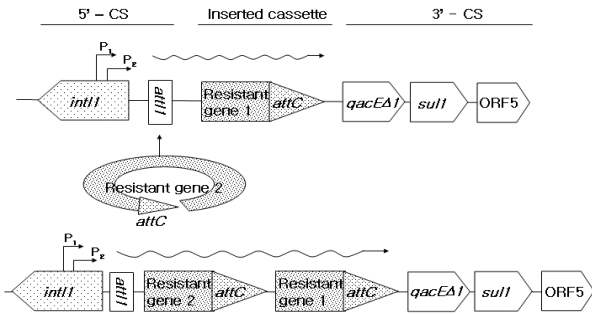


Fig. 1. Schematic representation of a class 1 integron and a model for gene cassette acquisition. The process by which a circularized gene cassette (resistance gene 2) is inserted at the *attI* site in a class 1 integron containing a resident gene cassette (resistance gene 1) is outlined in the figure. The basic structure is shown in the upper aspect of the figure. The integrase gene (*intI1*) is located upstream of the *attI* site. Downstream of *attI* lie open reading frames conferring resistance to quaternary ammonium compounds (*qacE* Δ 1) and sulfonamides (*sulI*) in addition to an open reading frames (ORF5) of unknown function. Incoming cassettes are circularized open reading frames that integrate into the integron by an integrase catalyzed interaction between *attI* and the *attC*. The integrated cassettes were transcribed from a promoter P_1 and P_2 which are integron-associated promoters located within the *intI1*. Figure is modified from reference 13.

attC (59-base 요소)내에서 일어나는 조기 전사 종결(pre-mature transcription termination) 때문에 약하게 발현된다[18].

유전자 cassette는 그들 자신의 이동에 관여하는 산물에 대한 유전정보를 함유하고 있지 않지만 이동 가능한 요소로 간주된다. 사실 이전에 통합된 cassette가 *IntI*에 의해 절단됨으로서(IntI-mediated excision) 유전자 cassette는 integron으로부터 분리되어 공유결합적으로 단려진 원형의 분자가 되어서 자유로이 존재한다[14, 19]. 원형의 중간물질(intermediate)은 *IntI*에 의해 매개된 통합과정에 의해 integron내로 편입된다.

유전자 cassette들의 주요한 출처에 대해 아직 확실히 알기는 어렵지만 아마도 내성 세균이나 항생제를 생성하는 세균들이 가지고 있는 내성유전자들이 integron에서 파생된 유전자 cassette들의 주요한 출처일 것으로 생각되고 있다. Integron이 이들 유전자들을 잘라내어 제거할 수도 있고 그들을 세균성 병원균들 사이에 전이될 수 있는 복제단위들로 통합할 수도 있다. Housekeeping 유전자들이 항생제들을 변형시키기 위해 진화해 왔고 그들을 보충(recruitment)하여 또다른 근원의 내성 유전자들을 제공할 수 있다는 가설을 지지해주는 몇 가지 증거들이 있다[20, 21]. 내성에 대한 유전정보를 함유한 모든 DNA들이

내성 유전자 공동이용자원(pool)을 수립하는 것으로 보이며 이것이 integron들 내로 통합되는 유전자 cassettes들의 잠정적 원천을 나타낸다[5].

Integron mobilization

세균성 병원균들 내에서 다양한 전위가능한 요소(transposable element)들이 검출되어져 왔고 이들이 원래 있던 장소로부터 다른 비상동성 target site로 DNA 분절들을 잘라서 삽입함으로써 세균 유전체의 진화에 기여해 왔다.

Integron 자체는 이동할 수 없으나 그들은 가끔 transposons의 일부본인 상태로 발견된다[22]. 일부 transposon들은 integron 이동성(mobility)에 기여하는 것으로 알려져 있다. class 1과 2 integrons은 흔히 Tn21- 및 Tn7-transposable element들에 의해 각각 운반된다. 이들 transposon은 일반적으로 plasmid에 위치해 있다. 이동할 잠재력이 있는 plasmid에 transposon이 위치해 있으면 유전자 cassette의 전파가 더 증강된다. Tn21내에 있는 integron을 염기서열 분석한 자료에 의하면 좌우 측면에 5 bp direct repeats로 둘러싸인 불완전한 25 base pair repeat가 integron의 경계부에 있음이 밝혀졌다[23]. 이들 25 base pair repeat들은 다양한 장소에서 나온 integron의 3' 말단에서도 검출된다. Radstrom 등은 integron이 transposon이거나 적어도 transposon derivative라는 의견을 제안하였다[24]. 이런 제안에 대한 증거가 Brown에 의해 제공되었는데 그는 integron In0, In2, In5가 결합있는 transposon이라는 것을 보여 주었다[25].

그러나 integron은 많은 다른 장소에서도 발견된다. 어떤 integron은 insertion sequence (IS) 에 아주 가깝거나 나란히 놓여진(juxtapose) 상태로 검출된다[26]. 이런 소견은 integron들이 비록 그럴 수 있는 분명한 효소 machinery가 결여되어 있음에도 불구하고 위치를 바꾸며 돌아다니는 것을 강하게 제시한다.

고도로 효율적인 유전자-포획 및 표현 체계의 연합이 수직적 및 수평적 이동능력과 함께 작용하여 내성 유전자들의 자연적 변천(flux)에 중대한 영향을 미친다. 더 나아가 transposon에 있는 integron이 접합 plasmid 내로 선택적으로 편입되는 것으로 알려져 있는데 그것이 광범위한 숙주들 내로 내성 결정인자들이 수평적으로 전이되도록 해준다.

1. Tn21 군의 transposon

Tn21은 그람음성과 그람양성 세균 내에 널리 분포되어 있는 아마도 가장 성공적인 이동성 DNA 요소 군인 Tn3 family의 전위가능한 요소(transposable element)의 일원이다. Tn21 transposon은 전위(transposition)에 필요한 유전자와 위치들(*tnpA*, *tnpR*, *tnpM*, *res*, *IRs*)에 대한 유전정보를 함유하고 있다. 또한 Tn21은 여러 군들의 항생제에 대

한 내성에 주된 역할을 하는 부수적 유전자(accessory gene)들에 대한 유전정보도 가지고 있다. 이 transposon은 *mer operon*과 In2라고 불리는 integron을 운반한다. *mer operon*은 독성 수는 이온들을 독성이 덜한 금속성 수은으로 변환시키는 효소에 대한 유전정보를 가지고 있다[27]. In2 integron은 *mer operon*과 전위 체계 사이에 위치해 있다. 또한 In2 integron은 streptomycin과 spectinomycin에 대한 내성을 전할 수 있는 *aadA* 유전자 cassette를 함유하고 있다.

Tn21 아군(subgroup)의 요소들이 서로 다른 균주들과 세균의 속(genera)에서 나타나는 것은 인상적이다: 계통 발생학적으로 상동적인 transposon 군중 다른 어떤 것도 이처럼 다양한 representative element를 가지지 못했다. 그 성공적인 파급은 아마도 integrase 체계를 획득한 것에 기인할 것으로 보인다. 이 체계가 이 요소들이 확산하는데 선택적인 이점을 주었을 것이다.

병원성 조류 *E. coli*의 다제 내성을 매개하는 유전적 요소들에 대한 역학적 연구에서 검사된 백여 개의 분리주 중 절반 이상이 Tn21 transposon 파생물을 가진 것으로 보고되었다[28]. 전 세계적으로 퍼져 있는 Tn21과 유사한 transposon이 공생균(commensal) 및 환경 분리주들 중에서도 또한 발견되고 있다[29, 30].

Tn21 유사 transposon이 이렇게 파급된 이유들에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나 이 종류의 transposon이 항생제들에 대한 내성을 부여할 잠재력이 있다는 사실이 아마도 중요한 요인일 것이다. Tn21과 그 파생물들은 그람 음성 세균내 수는 내성의 파급에 주요한 요소(agent)이다. 동시에 이들 전위가능한 요소들은 integron에 함입된 내성 유전자 cassette들을 통해 다양한 항생제에 대해 내성을 부여한다. Tn21의 유전자 cassette인 *aadA1*은 세계적으로 가장 널리 퍼진 내성유전자중 하나로서 streptomycin에 대해 내성을 일으킨다. 이러한 소견들은 오염된 환경에서 살아가는 세균들과 동물, 인체 병원균들에서 Tn21이 양성적으로 선택됨으로서 integron의 파급에 기여해왔을지도 모른다는 것을 제시해준다.

2. 내성 유전자들의 군집화: 다약제 내성의 유전정보가 항생제 resistance islands에 수록되어 있나?

plasmid나 세균 염색체 위에 있는 항생제 내성 유전자의 위치를 조사(localization)한 여러 연구들은 다제 내성을 부여하는 유전자들이 물리적으로 연결된 요소들의 복합체 형태(configuration)로서 존재할 수 있음을 제시하였다. 물리적 및 기능적으로 연관된 내성 유전자들 군집(cluster)의 한 예를 든다면 복합적으로 배열된 유전자 cassettes를 set로 운반하는 integron을 제시할 수 있다. 어떤 경우들에서는 integron은 다른 내성 유전자들과 연관됨으로서 잘 밝혀진 pathogenicity island와 비슷한 더 큰 유전적 구조의 집합(assembly)을 이루는 것이 발견되었다. 이

러한 구조들은 항생제 resistance island로 여겨질 수도 있다.

서로 다른 종류의 항생제에 대한 내성을 주는 유전자들의 군집화는 숙주에게 선택적인 이점을 준다. 특히 몇 가지 항생제들을 동시에 투여할 때 그 효과는 더 뚜렷하다. 서로 다른 내성 유전자들간의 상승작용(synergism)이 수용체 숙주가 각 개별 항생제 군에 의해 양성적으로 선택되게 해준다. 더 나아가 다제 내성 유전자를 함유한 유전자 locus가 다른 유전체로 통째로 전이될 수 있다[2, 31]. 또한 integron에 의해 매개된 다제 내성이 분리주의 clonal dissemination을 유리하게 하는 경향이 있어서 다양한 임상적 분야들로부터 환자들을 통해 널리 전파되기 쉽다.

class 1 integron 위에 aminoglycoside 내성 유전자 cassettes들인 *aac(3)-I*와 *aac(6')*의 융합이 *bla_{GES-1}*과 함께 나타난 것이 프랑스에서 보고되었다. 그 연구에서 두 가지 분리된 별개의 cloned 유전자들뿐만 아니라 융합된 유전자 산물까지도 다양한 aminoglycosides에 대해 내성을 부여했다. 그러나 융합된 유전자 산물이 별개의 두 유전자들보다 더 많은 수의 aminoglycoside에 대해 내성을 나타냈다. 이러한 현상은 integron-borne aminoglycoside 내성에 있어 미래의 발달 경향을 시사하는 것일 수도 있다[32].

내성 유전자들이 integron 안에 존재함으로써 나타나는 co-resistance와 co-expression은 서로 무관한 항생제 내성 유전자들을 더 안정화시킬 수도 있다. 예를 들면 rifampicin, aminoglycoside 또는 sulphonamide를 함유한 항생제 처방이 광범위 cephalosporin과 carbapenem을 포함한 구조적으로 무관한 항생제 분자에 대한 내성 유전정보를 수록하고 있는 유전자들의 prevalence를 증강시킬 수도 있다[33].

Integron 역학

1. 병원감염에서의 integron 역학

integron은 항생제 내성인 그람음성 간균 임상분리주중에 널리 퍼져 있다. 유전자 cassette의 어떤 조합은 국부적으로 분포된 반면 다른 것들은 널리 분포된 것으로 보이는 것도 있다[10]. 병원감염 환자에서 분리된 그람음성 세균이나 병원 돌발감염에 관여하는 균주들에서 integron이 검출된다고 흔히 보고된다. Sallen 등은 프랑스의 한 지역에서 분리된 49주의 세균을 검색한 결과 서로 다른 6 가지 균종의 *Enterobacteriaceae*중 59%가 integron을 가지고 있었다고 하였으며 그중 일부는 다수의 integron을 가졌다고 하였다[34]. 칠레의 병원들에서 분리된 다제 내성 *Acinetobacter baumannii* 균종에 대한 integron 유무에 대한 연구 결과 가장 우세한 형이었던 biotype 9 분리주의 81.4%에서 integron이 검출되었고 흔치 않은 biotype들에서는 integron이 검출되지 않았으며, integron 함유 분리주

는 더 넓은 항생제 내성 양상을 보이고, 다양한 항생제에 대해 더 높은 내성 수준을 나타냈다고 한다[35]. Jones 등은[36] 네덜란드에서 분리된 7종의 *Enterobacteriaceae* 군종에 속한 135균주 중 절반 이상에서 integron이 있었다고 하였다. Integron은 널리 퍼져있을 뿐만 아니라 많은 분리주들이 다수의 integron을 가지고 있었다. 이런 현상은 서부 및 중부 유럽의 나머지 영역에서도 관찰되고 있다[37].

비슷한 환자들에서 얻어진 세균들을 비교해볼 때 integron이 없는 분리주보다 integron을 함유한 분리주가 항생제 내성을 보이는 약제 범위가 더 넓은 경향이 있다[10]. 유럽의 23개 center에서 얻어진 8 균종에 속한 867 분리주의 분석 결과 이들 균종들에서 integron의 존재와 다제 내성이 유의하게 연관된다는 것이 밝혀졌다[38].

그러나 integron에 연관된 유전자 cassette는 그람 음성 세균에만 한정되는 것이 아니다. Kazama 등의 연구는[39] *Staphylococci*와 *Enterococci* 분리주 양자에서도 *qacE* Δ 1이 있음을 보여주었다. 인간 분리주뿐만 아니라 영장류에서 나온 그람 음성분리주에서도 발견된다[40]. 이런 모든 자료들은 integron이 세계적으로 흔하며 특히 *Enterobacteriaceae*에서 흔하고 그들이 내성에 기여한다는 것을 제시해 준다.

병원 환경내 integron의 근원은 잘 알려져 있지 않다. 54명의 새로 입원한 환자들의 20%가 integron을 함유한 분리주를 가졌으므로 지역사회가 잠재적인 저장소(reservoir)라는 것이 나타났다. 농장에서 항생제를 사용하는 것이 항생제 내성에 기여하는 중요한 요인으로 여겨져 왔다. integron을 함유한 분리주는 사람뿐만 아니라 양, 가금류, 애완 동물, 말, 여러 지역의 육지에서 나오는 고기에서 얻어지며 이들 저장소들 사이에 분명히 연결이 되어 있다고 생각된다. integron을 가지고 있는 분리주는 병원균에 국한되는 것이 아니라 어장에서 얻은 물 검체와 강의 하구나 만 또는 다른 환경 검체에서 얻은 세균들에서도 발견되어져 왔다. *Vibrio cholerae*의 몇 가지 돌발감염에서 균에 class 1 integron이 있음이 나타났다. 이들 균주들은 다제 내성인 것이 흔하였으나 다른 경우들에서와 마찬가지로 모든 내성 유전자들이 integron에 위치한 것은 아니다. 어떤 분리주들은 2개의 integron을 가지기도 하였는데 그 중 한 분리주가 해산물에서 나온 것이었으며 태국의 소아 병원에서 얻은 3 균주도 같은 integron을 가지고 있었다. 이런 자료들은 식량 생산과 병원 환경내에서 내성 세균이 나오는 문제 사이에는 밀접한 연결이 있다는 것을 더 뒷받침해준다[10].

2. 자연적인 생태계내에서의 integron

환경이 명백히 농업의 근원이자 쓰레기터(sink)로 작용하기 때문에 자연적 생태계 내에서 integron이 나온다는 것은 중요한 사실이다. 자연환경 내에서 integron 유전자 sequence의 prevalence에 대한 연구는 아직까지는 제한적

이다.

영국의 한 강의 하구에서 나온 세균을 대상으로 class 1 integron 유전자 sequence의 prevalence와 특징을 조사한 결과 총 3000 균주중 3.6%가 colony blot hybridization 기법으로 *intI1* 탐색자에 보합결합하였다. class 1 integron을 가진 85 균주에 대해 class 1 integron 가변(variable) 영역에서 흔히 발견되는 유전자 cassette에 대한 primer를 사용하여 검사한 결과 가변 영역 내에 있는 유전자 cassette의 광범위한 다양성을 발견하였다. 자연의 지표수(surface water) 내에 class 1 integron이 있고 이들이 다양한 세균 군종 중에 분포함이 나타났다. 흙에서도 integron sequence가 발견되었다[41].

세척수(irrigation water) 및 관련된 침사에서 얻어진 *E. coli* 322주중 32주(10%)가 2종 이상의 항생제에 내성이었다. 이들 다제 내성균 32주중 4주(13%)가 class 1 integron에 특이한 sequence (class 1 integron 가변 영역과 class 1 integrase 유전자)를 가지고 있었다. 핵산 연쇄 분석상 class 1 integron 함유균이 보존된 780 bp *aadA* 유전자 cassette를 가지고 있었는데 *aadA* sequence를 가진 모든 integron 함유 균주들중 streptomycin에 내성인 균주는 하나도 없었다. 이 결과들은 대변 폐기물(fecal waste)로 오염된 세척수(irrigation water)와 침사들이 이 class 1과 class 2 integron 함유 *E. coli*의 출처가 될 수 있다는 것과, 환경 인자들이 이들 균주들에서 내성 유전자들의 형질학적 발현이 결여되게 할 수 있다는 것을 제시해 준다. 결론적으로 농장이나 처리 공정, 가금 판매소를 거치는 단계에서 가금(poultry) 산물들은 항생제 내성 균종들과 이들 유전자들을 파급할 가능성이 있는 유전 인자들을 함유할 수 있다는 것이 여러 연구들에서 밝혀졌다. 항생제 내성의 형질학적 검사에만 의존하면 세균이 항생제에 저항할 수 있는 정확한 유전적 잠재력을 과소평가할 수도 있다. 배양으로부터 독립적인 분석법, 예를 들면 내성정보를 함유한 유전자에 대한 전체 미생물군집 핵산 분석 등의 방법이 항생제 내성 유전자를 획득하고 전파하는 미생물 군집의 유전적 잠재력에 대해 보다 나은 추산을 제공할 것이다. 항생제 내성 유전자 결정인자들의 핵산 sequence를 분석해보면 어떤 농지관리법(agronomic)이나 처리 공정법이 특이한 유전형을 선택하는지 여부를 동정하는데 도움이 될 것이다[41].

검 출

integron에 기인한 내성 유전자 cassette의 검출은 전통적으로 임상 미생물 검사실에서보다는 전문적인 연구기관에 위탁되어 왔다. 그 이유는 필요한 인력과 비용 부담이 크고, 진단 과정의 경과시간이 길기 때문이다. 가장 최신의 분자적 기법을 사용하더라도 integron 구조내에 삽입된 모든 cassette를 특이적으로 동정하려면 수일에서 수주 이상 걸릴 수도 있다. 이 느린 동정 과정으로는 ICU에

있는 개별 환자들에게 임상적 혜택을 거의 주지 못하리라는 것은 분명하다. *Enterobacteriaceae*와 포도당 비발효 그람 음성 간균으로부터 class 1 integron을 실시간 PCR로 검출하는 기법의 개발이 이 특정한 연구 분야에 혁신을 가져올 수 있다. 다양한 세균 균종으로부터 class 1 integron의 유전적 구조를 검출하는데 있어 class 1 integron의 5'-말단의 보존적 영역 300-base pair (bp)에 특이적인 primer 쌍을 사용하는 PCR 기법의 민감도와 특이도가 높은 것으로 나타났다[42]. LightCycler 장비를 사용한 그 연구 결과는 class 1 integron의 통상적인 PCR 검출법보다 더 유리하게 나타났다[42]. class 1 integron의 5'- 및 3'-보존적 말단에 대한 primer가 class 1 integron의 일부 구조물인 β -lactamase 및 여타의 co-resistance 유전자들을 검출하기 위한 유용한 검색 도구로 입증될 수도 있다. 특히 integron이 매개한 내성이 존재할 가능성을 드러내주는 co-resistance 요인들의 형질형적 표현과 함께 사용될 때 더 유용할 것이다. integron을 검출할 때 *bla*_{VEB}, *bla*_{GES/IBC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VM}과 같은 더 흔한 class A와 B, β -lactamase 유전자들을 검출하기 위해 고안된 일련의 primer들을 이용한 표준적인 PCR 조건이 특정한 유전자들을 동정하는데 사용할 수도 있다. 지역내에서 유포되고 있는 균주들과 내성 양상을 철저하게 아는 지식은 분자적 접근의 목표 대상을 정하기 위해 비용효과적인 검색을 수행하는데 극히 유용하게 사용될 것이다. 불행히도 PCR 산물의 염기서열분석기법이 여전히 내성 유전자들을 서로 감별하는데 선호되는 방법이기 때문에 검색 프로그램의 비용이 상당히 높아서 대부분의 개발도상국에서는 비용을 감당하기가 어렵다. integron 동정을 임상 미생물 검사실의 영역으로 가져올 수 있는 신속하고 단순화되고 비용효과적인 분자적 방법 개발에 향후의 연구가 집중되어야 할 것이다[33].

결 론

동물 축산학 (husbandry)에서 항생제를 무차별적으로 사용하여 다수의 항생제에 대한 내성의 전파가 촉진되었다. 항생제 내성 연구의 최근 진전으로 인해 integron을 매개로 한 재조합에 의한 내성 유전자 획득의 분자적 기전에 대해 발견하게 되었다.

Integron은 내성 유전자의 보충과 발현에 관여되어 왔고 병원과 지역사회에서 유포되어 있는 내성 세균들 간에 널리 분포되어 있는 것으로 발견되었다. 세균 유전체 안에 그들이 존재 발생했던 증거는 수년전으로 거슬러 올라가 찾아볼 수 있다. Integron은 세균 유전체 안에 내성 유전자를 단기 축적하기 위한 주요 수단으로 여겨진다. 더 나아가 유전자를 획득하는 그들의 역할이 숙주 범위가 넓은 접합 plasmid에 의해 운반되어 내성 유전자들을 수평적 전이시키는 과정과 결합될 때 특히 중요한 영향을 미친다. 이동성 요소들과 integron의 연합은 plasmid로부터 세균 염색체로 그리고 서로 다른 복제단위들간의

수직적 전이를 촉진하여 내성 유전자의 파급에 기여한다. 다제 내성의 진화는 산재되어 있는 내성 유전자들 integron에 의해 획득하고 군집화하는 과정을 통해 가차 없이 진행될 것으로 여겨진다. 세균 내에서 이 과정을 통제하는 일이 공중 보건에 있어서 중대한 도전 과제라고 생각된다.

Integron에 관련되어 있는 항생제의 선택적 압력에 대한 지식을 얻기 위한 향후 연구가 병원감염의 환경내에서 세균 내성의 조류를 거슬러 나아가기 위해 절대적으로 중요하다. 미래의 내성조절을 위해 지금부터 항생제 내성 기전을 더 잘 이해하기 위한 집중적인 연구를 계획하고 실행하는 것이 필수적이라고 본다.

참 고 문 헌

1. de la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends Microbiol 2000 Mar;8:128-33.
2. Lawrence J. Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. Curr Opin Genet Dev 1999;9:642-8.
3. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 2000;405:299-304.
4. Courvalin P. The Garrod Lecture. Evasion of antibiotic action by bacteria. J Antimicrob Chemother 1996;37: 855-69.
5. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994;264:375-82.
6. Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in fresh water: Escherichia coli is able to develop natural competence. Appl Environ Microbiol 1996;62:3673-78.
7. Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid 1999;42:73-91.
8. Belogurov AA, Delver EP, Rodzevich OV. Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. J Bacteriol 1993;175:4843-50.
9. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions : integrons. Mol Microbiol 1989;3:1669-83.
10. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect 2004;10:272-88.
11. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. Clin Chem Lab Med 2000;38:483-7.

12. Lee K, Chong Y. Integron and mobile gene cassettes. *Korean J Clin Microbiol* 2000;3:83-8.
13. Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 2001;32:243-59.
14. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15:593-600.
15. Sundstrom L, Skold O. The dhfrI trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific sites in other genetic surroundings. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:642-50.
16. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612-15.
17. Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frere JM, et al. Structure of In31, a blaIMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:890-901.
18. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:155-62.
19. Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992;174:1574-85.
20. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P. Characterization of the chromosomal aac(6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1896-903.
21. Paye KG, Clarke AJ. Characterization of gentamicin 2' - N-acetyltransferase from *Providencia stuartii*: its use of peptidoglycan metabolites for acetylation of both aminoglycosides and peptidoglycan. *J Bacteriol* 1997;179:4106-14.
22. Parent R, Roy PH. The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of cat. *J Bacteriol* 1992;174:2891-97.
23. Grinsted J, de la Cruz F, Schmitt R. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 1990;24:163-189.
24. Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the ret elements. *J Bacteriol* 1994;176:3257-68.
25. Brown HJ, Stokes HW, Hall RM. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol* 1996;178:4429-37.
26. Villa L, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple-antibiotic resistance mediated structurally related IncL/M plasmids carrying an extended spectrum beta-lactamase gene and a class I integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2911-14.
27. Misra TK. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 1992;27:4-16.
28. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, et al. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2925-9.
29. Dahlberg C, Hermansson M. Abundance of Tn3, Tn21, and Tn501 transposase (tnpA) sequences in bacterial community DNA from marine environments. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3051-6.
30. Wireman J, Liebert CA, Smith T, Summers AO. Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4494-503.
31. Lawrence JG. Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol* 1997;5:355-9.
32. Dubois V, Poiriel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class I integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:638-45.
33. Weldhagen GF. Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:556-62.
34. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1995;1:195-202.
35. Gonzalez G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 1998;161:125-28.
36. Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. Wide-spread occurrence of integrons causing multiple resistance in bacteria. *Lancet* 1997;349:1742-43.
37. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:689-96.
38. Leverstein-van Hall MA, Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or

- isolate origin. *J Infect Dis* 2003;187:251-59.
39. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE* delta1 in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1998;165:295-99.
40. Wireman J, Liebert CA, Smith T, Summers AO. Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4494-503.
41. Roe MT, Pillai SD. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poult Sci* 2003;82:622-6.
42. Maguire AJ, Brown DF, Gray JJ, Desselberger U. Rapid screening technique for class 1 integrons in Enterobacteriaceae and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1022-9.

The Role of Integrons in the Spread of Multi-drug Resistance

Sook-Jin Jang

Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, Gwangju, Korea

The liberal use of antibiotics in human medicine and animal husbandry has promoted the spread of multiple antibiotic resistance. Molecular mechanisms for the acquisition of resistance genes by integron-mediated recombination was discovered recently during an intensive study of antibiotic resistance. Integrons are best known as the genetic agents responsible for the capture and spread of antibiotic resistance determinants among diverse Gram-negative clinical isolates. These DNA elements, mobilized by broad-host-range conjugative plasmids, have the ability of horizontal transfer of antibiotic resistance genes between interspecies of bacteria. The association of integrons with mobile elements promotes their vertical transmission from plasmids to the bacterial chromosome and among different replicons, contributing to the dissemination of resistance genes. Integrons have been found widely distributed among resistant bacteria circulating in hospitals and in the community and have been reported from all continents. The evolution of multi-drug resistance seems to proceed continuously through the acquisition and clustering of dispersed resistance genes by integrons. For public health, proper strategies should be instituted to reduce the potential for dissemination of these genes. (*Korean J Clin Microbiol* 2005;8(1):1-9)

Keywords: Integron, Antimicrobial resistance, Plasmid, Transposon, Horizontal gene transfer, Epidemiology

Address reprint requests to : Sook Jin Jang, M.D. Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chosun University
375 Seoseok-dong, Dong-gu, Gwang-Ju 501-759, Korea.
Tel. 82-62-220-3259 Fax. 82-62-232-2063 E-mail: sjbjang@chosun.ac.kr