

Diversity of Integrons Carrying *bla*_{VIM-2} Cassette in *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.

Jonghwa Yum¹, Hee Bong Shin², Dongeun Yong³, Yunsop Chong³

¹Department of Clinical Laboratory Science, College of Nursing and Healthcare Sciences, Dong-eui University, Busan,

²Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Hospital, Bucheon, ³Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background: Metallo- β -lactamase-mediated carbapenem resistance has been increasingly reported in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and other Gram-negative bacilli (GNB) in many countries. A few studies showed highly variable structure of MBL-gene cassette-carrying integrons. The aim of this study was to determine the structure of *bla*_{VIM-2}-carrying integrons in *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.

Methods: *bla*_{VIM-2}-carrying GNB were isolated at a Korean hospitals during the years 1995-1999 and 2005. The size of *bla*_{VIM-2}-carrying integrons was estimated by the PCR products. Representative integrons were sequenced by the dideoxy-chain termination method. The MICs of antimicrobial agents were tested by the CLSI agar dilution methods.

Results: During the years 1995-1999 and 2005, the approximate size of the *bla*_{VIM-2}-carrying class 1 integrons was 3-7 kb in 35 *Pseudomonas* isolates and 3-5 kb in 24 *Acinetobacter* isolates. The integrons carried one-five resistance gene cassettes in addition

to the *bla*_{VIM-2} cassette. Other resistance gene cassettes found were *bla*_{OXA-1}, *aacA1*, *aac*(6')-I, and *aac*(6')-II. Interestingly, sequences homologous to part of a putative class II intron were inserted into the recombination site of the last cassette in four of nine integrons. The class 1 integron from *P. aeruginosa* isolates had fused *orf*/*Int1* in a downstream leftward inverted repeat (IRi).

Conclusion: According to period, the size and structure of *bla*_{VIM-2}-carrying integrons are quite variable, but an identical one is also present in a different genus, indicating high mobility of the *bla*_{VIM-2} cassette and horizontal transfer of the whole integron. We suggest that the class 1 integron containing the *bla*_{VIM-2} gene is spreading horizontally among Gram-negative bacilli and is undergoing continuous development in Korea. (Korean J Clin Microbiol 2012;15:131-138)

Key Words: Gram-negative bacilli, Integrin, Metallo- β -lactamase

서 론

Carbapenem계 항균제는 그람 음성 막대균이 생성하는 다양한 β -lactamase에 안정하고 세균 세포막 투과성이 우수하여 β -lactamase 내성 세균에 의한 감염증 치료에 유용한 약제이다[1]. 그러나, 근래 carbapenem에 내성인 *P. aeruginosa*와 *Acinetobacter* spp.가 증가하였고, 일부 국가에서는 *Enterobacteriaceae* 중에도 내성 균주가 보고되고 있다[2].

Carbapenem 내성 기전 중에서 중요한 것은 획득성 metallo- β -lactamase (MBL) 생성인데 현재까지 9가지 MBL이 알려져 있다. MBL 중에는 IMP와 VIM형이 흔한데, IMP 효소는 유럽과 아시아에서 흔히 보고되었고, 특히 일본에서는 *Pseudomonas*, *Acinetobacter* 등 다양한 그람 음성 막대균이 생성함이 보고되

었다. 반면에 대부분의 VIM형 효소는 여러 나라에서 분리된 *Pseudomonas* spp.에서 주로 발견되었으나, 국내에서는 *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* 등 다양한 그람 음성 막대균에서 검출이 보고되었다[3].

획득성 MBL 유전자 중 *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM} 및 *bla*_{SIM}은 세균의 chromosome이나 plasmid에 위치한 class 1 인테그론에 이동성 유전자 카세트로 존재하여[4], 인테그레이즈 존재하에 인테그론 내에서 혹은 인테그론 간에 이동할 수 있다[5].

유전자 카세트는 인테그론의 5'과 3'의 보존된 유전자염기서열 사이 어느 위치로도 이동할 수 있다. *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론은 매우 다양한 크기와 구조이며, 대부분 다양한 amino-glycoside 수식효소 유전자를 가지고 있다는 소수의 연구가 있다[6,7]. 그러나, 국내에서 분리한 세균에서 검출된 MBL 유전자 카세트를 가진 인테그론의 구조에 대한 연구는 드물다.

Lee [8]는 국내 *bla*_{VIM-2}를 가지는 인테그론이 다른 나라와는 달리 여러 균종의 임상 분리주에 있고, 크기와 구조가 다양함

Received 6 August, 2012, Revised 6 October, 2012

Accepted 8 October, 2012

Correspondence: Jonghwa Yum, Department of Clinical Laboratory Science, College of Nursing and Healthcare Sciences, Dong-eui University, 995, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 614-714, Korea. (Tel) 82-51-890-2682, (Fax) 82-51-890-1469, (E-mail) auxotype@deu.ac.kr

을 보고한 바 있다. 이에 본 연구에서는 국내 임상검체 분리 *Pseudomonas* spp.에서 검출된 *bla*_{VIM-2}를 가진 새로운 구조의 2 가지 인테그론을 포함하여 시기에 따라 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp. 등 그람음성 막대균에서 검출된 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 시기에 따른 구조의 차이를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. MBL 유전자 검출

국내 3차 의료기관에서 분리된 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp. 중 디스크 확산법으로 imipenem에 비감수성인 균주를 대상으로 Hodge 변법과 imipenem-EDTA+Sodium mercaptoacetic acid (SMA) double disk synergy법으로 MBL 생성 균주를 선별하였다.

*bla*_{VIM-2} 유전자는 Poirel 등[7]이 사용한 시발체와 방법을 약간 수정한 PCR법으로 검출하였다.

2. 대상 균주 및 항균제 감수성시험

1995년부터 1999년까지 분리된 *bla*_{VIM-2} 양성 *P. aeruginosa* 43주, *P. putida* 9주, *Acinetobacter* spp. 13주와, 2005년에 분리된 *P. aeruginosa* 7주와 *Acinetobacter* spp. 11주를 시험에 사용하였다. 항균제 감수성은 CLSI 한천희석법으로 시험하였다[9].

3. 유전자 분석

PCR을 위한 시발체, INT/5'CS와 INT/3'CS으로[6] imipenem

비 감수성 균주에서 class 1 인테그론을 검출하였으며, 유전자 증폭 방법은 Levesque와 Roy의 방법을 약간 변경하여 시행하였다[7,9]. 즉, DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 추출한 주형 DNA 1 µL, 각 시발체 20 pmol, LA Taq DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan) 0.6 µL, 전체 100 µL를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후, DNA extraction kit (Qiagen)로 회수하였다.

인테그론의 염기서열은 이들 PCR 증폭산물이나 재조합 plasmid를 자동화 염기서열분석기(ABI 3700, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)를 이용하여 dideoxy-chain termination법으로 분석하였다.

Southern blot hybridization은 *aac*(6')-I, *aac*(6')-II, *aadA1* 및 *aadA2*로부터 얻은 PCR 산물을 digoxigenin으로 표지하여 시행하였다. Probe의 표지와 검출은 DIG DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 생산회사가 권장하는 방법에 따라 시행하였다.

4. GenBank accession numbers

GenBank에 등록한 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 염기서열은 *P. aeruginosa* YMC95/1/2105 (In107), AF418284, *P. aeruginosa* YMC05/5/1103, EF207718, *P. aeruginosa* YMC05/5/1361, EF206349, *P. aeruginosa* YMC05/5/1785, EF207717, *P. aeruginosa* YMC05/5/2030, EF207719, *P. putida* YMC99/10/431, AY065966이었다.

Table 1. Characteristics of *P. aeruginosa*, *P. putida* and *Acinetobacter* isolates with *bla*_{VIM-2} carrying integrons

Species	Size (kb) of integron	No. of isolates	IPM MIC (mg/L)	Phenotype					Hybridization		
				STR/SPT	KAN	AMK	GEN	ISP/NET/TOB	<i>aadA1/2</i>	<i>aac</i> (6'-I)	<i>aac</i> (6'-II)
<i>P. aeruginosa</i> (42)	6.0	14	8-256	R	R	R	R	R	+	-	-
		3		R	R	S	R	I, R	+	+	NT
		8		R	R	I, R	R	I, R	+	+	NT
	5.6	3	16-256	R	R	S	R	R	+	+	NT
		9		R	R	I, R	R	R	+	+	NT
		4		R	R	R	R	R	+	+	NT
<i>P. putida</i> (7)	6.0	1	32	R	R	R	R	R	-	-	NT
		2	32-64	I, R	R	I, R	R	R	+	+	NT
		1	32	R	R	R	R	R	+	+	NT
	5.0	1	64	R	R	R	R	R	NT	+	NT
		1	128	R	R	R	R	R	+	+	NT
		1	32	R	R	R	R	R	+	NT	+
<i>Acinetobacter</i> spp. (13)	3.0	12	8-32	R	R	I, R	R	R	+	NT	+
	5.0	1	16	R	R	R	R	R	+	+	NT

Abbreviations: STR, streptomycin; SPT, spectinomycin; KAN, kanamycin; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; ISP, isepamicin; NET, netilmicin; TOB, tobramycin; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; NT, not tested because probably due to presence of the gene in other genetic elements.

결 과

1995-1999년에 분리된 *P. aeruginosa* 42주, *P. putida* 7주 및 *Acinetobacter* spp. 13주 모두에서는 각각 1개의 인테그론이 검출되었고, 크기는 각각 3-6 kb, 3-6 kb 및 3-5 kb이었다(Table 1). 반면, 2005년에 분리된 *P. aeruginosa* 7주 중 4주에서는 2개의 인테그론이 검출되었다. *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 크기는 3-6 kb로 다양하였다. *Acinetobacter* spp. 11주 중 10주에서는 2-3개의 인테그론이 검출되었고, 그 크기는 2-3.0 kb이었다(data not shown).

1995-1999년 분리 6주와 2005년 분리 5주, 총 11주의 *bla*_{VIM-2} 유전자를 가진 인테그론 중, 1997년과 1998년에 분리된 *A.*

*baumannii*와 *P. putida*, 2005년 분리 *A. baumannii*는 그 구조가 동일하였고(In105), 나머지 8주는 모두 다른 구조이었다. 이들 인테그론에는 3-6개의 항균제 내성유전자 카세트가 있었다. 인테그론 중 *bla*_{VIM-2}의 위치는 군중에 따라 달랐는데(Fig. 1), 11주 중 8주는 첫 번째 카세트 위치에, 2주와 1주는 각각 두 번째와 세 번째 카세트 위치에 있었다.

VIM-2 유전자를 가진 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp.에 대한 ceftazidime과 imipenem의 MIC 범위는 각각 32-128 μ g/mL와 8-256 μ g/mL로 높은 수준의 MIC를 보였으나, *bla*_{VIM-2} 위치에 따른 차이는 없었다(Table 2).

*bla*_{VIM-2} 유전자 외에는 aminoglycoside 수식효소 유전자, 특히 *aac*(6')-I, *aadA1* 및 *aadA2*가 흔하였다. 1995-1999년 분리주

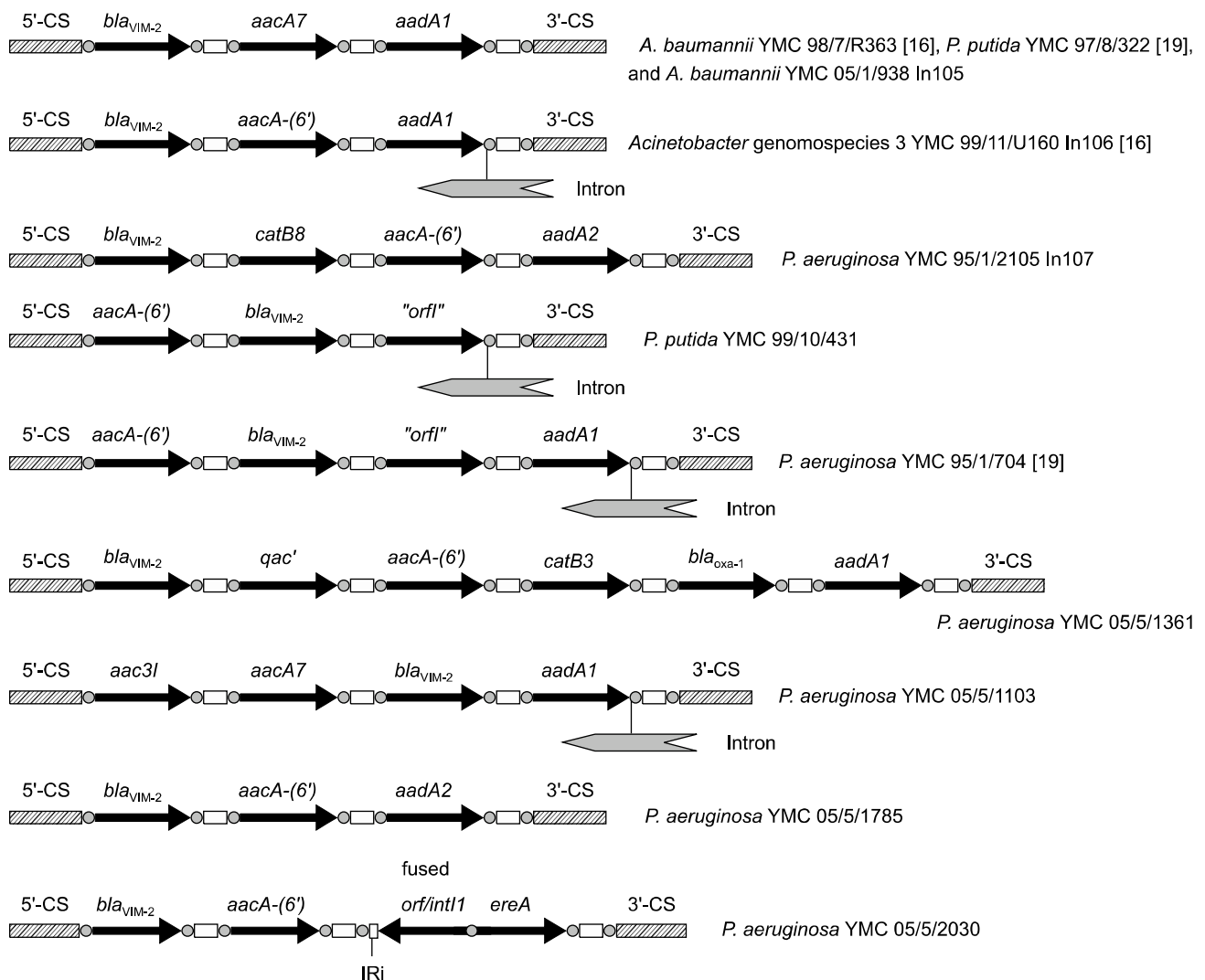


Fig. 1. Comparison of the structures of variable regions of class 1 integrons determined in this study. Hatched rectangles indicate the 5'- and 3'-conserved segments (5'-CS and 3'-CS), black arrows the cassette-borne resistance genes, empty rectangles the *attC* sites of the cassettes, small rectangle the IRI sites of the integron, and gray circles the recombination core sites and inverse core sites. The insertion and orientation of part of putative class II intron in the recombination site of the last cassette of In106 and integron in *P. putida* YMC 99/10/431, *P. aeruginosa* YMC 95/1/704, and *P. aeruginosa* YMC 05/5/1103 are indicated.

Table 2. MIC of antimicrobial agents for *bla_{VIM-2}*-positive gram-negative bacilli with different position of *bla_{VIM-2}* cassette in class 1 integrons

Study No.	Strains	Position of <i>bla_{VIM-2}</i> cassette	MIC (mg/L) of					
			PIP	CTX	CAZ	ATM	IPM	MEM
1	<i>A. baumannii</i> YMC 98/7/R363	First	32	128	32	32	8	4
2	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3 YMC 99/11/U160	First	64	>128	64	32	32	8
3	<i>P. putida</i> YMC 97/8/322	First	128	>128	64	32	32	64
4	<i>P. putida</i> YMC 99/10/431	Second	>256	>128	>128	32	64	32
5	<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/12/2105	First	>256	>128	128	32	32	8
6	<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/704	Second	>256	>128	>128	32	256	64

Abbreviations: PIP, piperacillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

<i>K. pneumoniae</i>	MTEHDLAMLYEWLNRSIHVEWWGGEEARPTLADVQEYQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPIGYAQSYVALGSGDGWWEET 80
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/704 AY029772	
<i>P. putida</i> YMC 99/10/431 AY065966	
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3 YMC 99/11/U160 AF369871	
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/2105 AF418284	
<i>K. pneumoniae</i>	DPGVRGIDQLLANASQLGKGLTKLVRALVELLFNDPEVTIKIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPDGPVAVYMQ 160
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/704 AY029772	S.....
<i>P. putida</i> YMC 99/10/431 AY065966	
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3 YMC 99/11/U160 AF369871	S.....
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/2105 AF418284	S.....S.....
<i>K. pneumoniae</i>	TRQAFERTRSA 172
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/704 AY029772	
<i>P. putida</i> YMC 99/10/431 AY065966	
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3 YMC 99/11/U160 AF369871	
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/2105 AF418284	D.

Fig. 2. Deduced amino acid changes of *aac(6')-I* detected in this study, compared to *aac(6')-I* deduced amino acid reported by Nobuta et al. [10]. *P. aeruginosa* YMC 95/1/2105 and *P. putida* YMC 99/10/431 had a mutation T269C and deduced amino acid change of L90S. *P. aeruginosa* YMC 95/1/2105 also had G298A and T512A mutations, resulting in amino acid changes of G100S and V171D. Isolates with mutations in this study: Study No. 3, 6 in Table 2. *P. aeruginosa* YMC 95/1/704 and *P. putida* YMC 99/10/431; No. 2. *Acinetobacter* genomospecies 3 YMC 99/11/U160; No. 4. *P. aeruginosa* YMC 95/1/2105.

의 aminoglycoside 수식효소 유전자 보유를 추정하기 위해, *aadA1*, *aadA2*, *aac(6')-I* 및 *aac(6')-II* 탐침자로 hybridization을 시행한 결과, *P. aeruginosa* 42주 중 27주는 amikacin, kanamycin, tobramycin, netilmicin 등의 내성과 관련된 *aac(6')-I*을, 1주는 gentamicin, tobramycin, netilmicin 등의 내성과 관련된 *aac(6')-II*를 가지고 있었으며, streptomycin과 spectinomycin 등의 내성과 관련된 *aadA1* 혹은 *aadA2* 유전자는 *P. putida* 1주를 제외하고 모두 가지고 있었다.

본 연구에서 구조를 새로 규명한 7개의 인테그론에는 *bla_{VIM-2}*와 aminoglycoside 수식 효소 유전자 외에도 *catB* 유전자가 2주

에, *bla_{OXA-1}* 유전자가 1주에 있었다. Class II intron은 국내 분리주 11주 중 4주에서 검출되었는데, 그 위치는 인테그론의 3'의 보존서열의 바로 상류에 위치했으며, *P. aeruginosa* YMC05/5/2030의 인테그론(약 5.3 kb)에는 *intI1* 다음에 *bla_{VIM-2}*가, 그 다음에 *aac(6')-I*과 *ereA*가 있었으며, leftward inverted repeat (IRi) 바로 다음에 융합된 *orf/IntI1*이 있었다.

본 연구에서 *P. aeruginosa* 2주와 *P. putida* 1주 및 *Acinetobacter* genomospecies 31주에 있는 인테그론의 *aac(6')-I* 유전자 서열 분석으로 아미노산서열을 추정한 결과, 이들은 서로 달랐다(Fig. 2). *K. pneumoniae*에서[10] 최초로 검출된 *aac(6')-I*

Table 3. Amino acid substitutions in *aac*(6')-I type aminoglycoside modifying enzymes

Isolates with <i>aac</i> (6')-I	Amino acid at position		
	90	100	171
<i>K. pneumoniae</i>	Leu	Gly	Val
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/704	Ser		
<i>P. putida</i> YMC 99/10/431			
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3 YMC 99/11/U160	Ser	Ser	Asp
<i>P. aeruginosa</i> YMC 95/1/2105			

Abbreviations: Leu, leucine; Gly, glycine; Val, valine; Ser, serine; Asp, asparagine.

의 유전자 서열로 추정한 아미노산서열과 비교하면, *P. aeruginosa* YMC 95/1/704, *P. aeruginosa* YMC 95/1/2105 및 *P. putida* YMC 99/10/431에서 검출된 *aac*(6')-I 유전자 서열로 추정한 아미노산위치 90의 leucine이 serine으로 치환되었다. 또한 *P. aeruginosa* YMC 95/1/2105에서 검출된 *aac*(6')-I은 아미노산 위치 90, 100 및 171이 각각 Leu에서 Ser으로, Gly에서 Ser으로, 그리고 Val에서 Asp로 치환되었다(Table 3).

고 찰

Carbapenem은 그람음성 막대균 감염 환자 치료에 중요한 항균제이나 지난 10여 년 동안 이 항균제에 내성인 세균이 현저히 증가하였다. 이들 내성은 비교적 흔히 획득성 metallo- β -lactamase (MBL)에 의한다. 획득성 MBL은 IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, AIM, DIM, NDM 및 KHM형이 보고되었다[11-15]. 국내에서 분리된 *Pseudomonas* spp. 49주와 *Acinetobacter* spp. 13주는 획득성 MBL에 의해 carbapenem에 내성을 보였다. 국내에서도 1990년 후반에는 VIM-2 생성 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*를 보고된 바 있으며[16], 그 후 VIM-2 생성 *S. marcescens* 1주와 *E. cloacae* 1주가 보고되었다[17,18].

Carbapenem 내성과 관련된 획득성 MBL인 *bla*_{VIM-2}는 *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *S. marcescens* 및 *E. cloacae* 등 임상 검체에서 분리된 그람음성 막대균에서 검출되고 있다. 또한 *bla*_{VIM-2}는 인테그론에 위치하는데, 그 인테그론은 유전자 카세트의 이동으로 인해 크기와 구조가 다양하다.

본 연구에서 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp.에서 검출된 6개의 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론은 전에 보고된 바 없는 새로운 구조였으며, *S. marcescens* [17]와 *E. cloacae* [18]에서 검출된 인테그론과도 구조가 달랐다. Yum 등[16]과 Lee 등[19]의 연구에서 임상 검체에서 분리된 *A. baumannii*와 *P. putida*에서 동일한 구조의 인테그론이 검출된 바 있는데, 이는 이중 균주 간에 인테그론이 수평 전달되었기 때문으로 판단된다. 따라서,

이들 결과로, *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 구조는 지역과 시기에 따라 다양한 것으로 판단된다.

1995-1999년에 분리된 균주들은 11주 모두가 한 개씩의 인테그론만을 가지고 있었으나, 2005년에 분리된 18주 중에서는 14주가 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론 외에도 *bla*_{VIM-2}를 안 가진 인테그론도 1 내지 2개가 검출되었다. 이는 시간의 경과에 따라 항균제 압력 때문에 다양한 인테그론을 가지는 세균이 출현하는 것으로 생각된다.

Yum 등과 Lee 등이 2002년에 보고한[16,19] 임상 검체에서 분리된 균주에서 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론과 유사한 크기의 4.0 kb와 4.5 kb 인테그론이 검출되었다(Fig. 1). 그러나, *P. aeruginosa* YMC95/1/2105에서 검출된 약 4.0 kb의 인테그론은 첫 번째에 위치한 *bla*_{VIM-2} 외에 *catB8*, *aac*(6')-I 및 *aadA2*를 가지고 있었고, *P. putida* YMC99/10/431는 *bla*_{VIM-2} 외에 *aac*(6')-I 및 기능을 알 수 없는 “*orfT*”과 class II intron이 있었다. 2005년에 분리된 균주에서는 3.0 kb, 5.3 kb 및 5.5 kb 크기의 새로운 인테그론이 검출되었다.

Hall과 Collis [5]에 의하면, 인테그론이 여러 개의 유전자 카세트를 가지고 있을 때, 인테그론 내의 유전자 카세트 위치에 따라 그 유전자의 발현 정도가 달라진다. 즉 promoter 가까이 위치한 유전자 카세트가 더 강하게 발현된다. 본 연구에서 *bla*_{VIM-2} 유전자의 인테그론 내 위치는 균주에 따라 달랐다. 즉, *P. aeruginosa* YMC05/5/1785에서는 첫 번째 카세트에, *P. putida* YMC99/10/431에서는 두 번째에, *P. aeruginosa* YMC05/5/1103에서는 세 번째에 있었다. *bla*_{VIM-2}가 인테그론의 첫 번째에 위치한 *P. aeruginosa*와 두 번째에 위치한 *P. aeruginosa*에 대한 imipenem의 MIC는 각각 32 μ g/mL와 256 μ g/mL이었고, 첫 번째에 위치하는 *P. putida*와 두 번째에 위치하는 *P. putida*에 대한 MIC는 각각 32 μ g/mL와 64 μ g/mL이었다(Table 3). 일반적으로, *Acinetobacter*보다 *Pseudomonas*에 대한 β -lactam 제제의 MIC는 높지만, 본 연구에서는 균종 간 차이는 없었고, *bla*_{VIM-2}의 위치에 따른 imipenem의 MIC에 차이가 크지 않았던 것은 세균의 efflux 펌프발현이나 막 불투과성 등 다른 기전의 차이로 인한 영향인 것으로 판단된다.

임상 검체에서 분리되는 *Acinetobacter*와 *P. aeruginosa*는 aminoglycoside 내성률이 비교적 높은 것으로 알려져 있다. Lee [8]의 연구에 의하면 2009년 국내 대학병원 및 종합병원 환자에서 분리된 *Acinetobacter*와 *P. aeruginosa*의 aminoglycoside 내성률은 각각 48-64%와 19-29%이었다. 또한 임상 검체에서 분리된 *P. aeruginosa*의 인테그론에는 흔히 *aac*(6')-I, *aadA* 및 *aadB* 등의 aminoglycoside 수식효소 유전자가 있음이 보고된 바 있다[10,20]. 즉, *bla*_{VIM-2}를 가진 폴란드 분리주의 인테그론은 aminoglycoside 내성에 관여하는 *aac*(6')-I을[21,22], 이태리 분리주의 In72는 *aacA*-(6')를[4], 프랑스 분리주의 In58은 *aac*(6')-II과 *aacA29a*, In59는 *aacC1*과 *aac*(6')-I 혹은 *aacA29b*를 가지고

있었다[23]. 프랑스 분리주의 In56에는 *bla_{VIM-2}*만 있었다[7].

aadA1, *aadA2*, *aac(6')-I* 및 *aac(6')-II*를 탐침자로 hybridization을 시행한 결과, 국내에서 분리된 임상검체 분리 균주의 *bla_{VIM-2}*를 가진 인테그론은 흔히 *aadA1*, *aadA2*와 *aac(6')-I*를 가지고 있었다(Table 1). *aac(6')-I*를 가진 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp. 4균주는 amikacin에 대해 내성이었으나 *aac(6')-I* 탐침자를 이용한 hybridization에 양성인 6균주는 감수성이었다. 이는 *aac(6')-I* 탐침자를 이용한 hybridization으로 접변이 유전자를 구별하기 어렵기 때문으로 생각된다.

Amikacin, kanamycin, tobramycin 및 gentamicin 등의 aminoglycoside 내성과 관련된 16S rRNA methylase는 국내 그람 음성 간균에서 흔히 검출되는 것으로 보고한 바 있다[24]. 또한, *aac(6')-I*는 유전자는 amikacin, tobramycin, netilmicin, kanamycin, dibekacin 및 isepamicin 등의 aminoglycoside 내성과 관련되어 있다. 그러나, 본 연구에서 *P. putida* 1주에 있는 6.0 kb인 인테그론 내에 *aac(6')-I*는 없었으나, amikacin에 대해 내성이었다. 이는 다른 내성 인자가 관여하였거나 *arm*이나 *rmt*와 같은 16S rRNA methylase 유전자 있기 때문으로 추정된다.

Jeong 등[18]이 보고한 class II intron을 가진 인테그론과 비슷한 구조의 인테그론이 본 연구의 *P. putida* YMC99/10/431와 *P. aeruginosa* YMC05/5/1103에서 검출되었다. 이들 균주에서는 인테그론의 마지막 유전자 카세트의 재조합 위치에서 이들과 매우 유사한 class II intron이 검출되었다.

본 연구에서 검출된 class II intron은 특히 국외의 인테그론에서는 발견되지 않은 구조이다. IRi 혹은 class II intron이 검출된 인테그론은 그 유래를 추정할 수 있는 구조로 인테그론의 분자역학적 지표로 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나, *bla_{VIM-2}*를 가진 인테그론에서 class II intron의 기능과 역할에 대해서는 앞으로 연구가 필요할 것으로 보인다.

결론적으로, *bla_{VIM-2}*를 가진 class 1 인테그론의 구조는 모두 7가지이었다. 임상 검체에서 분리된 *Pseudomonas* 56균주는 3.0-7.0 kb의 인테그론을 가지고 있었으며, 이들 중 6.0 kb인 것이 가장 흔하였다. 그러나, *Acinetobacter* spp. 24균주 중 22균주는 3.0 kb 인테그론을, 1균주는 5.0 kb인 것을 가지고 있었다. 인테그론에 존재하는 class II intron과 IRi의 염기서열은 국외에서는 보고된 바 없는 것으로 분자역학적 표지자로 이용될 수 있는 염기서열이었다. *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*의 *bla_{VIM-2}*를 가진 인테그론에는 새로운 접변이 *aac(6')-I*이 흔하였다. 새로운 구조의 인테그론 6가지의 출현과 종이 다른 세균간에 동일한 구조의 인테그론이 있음은 전체 인테그론의 수평전달과 *bla_{VIM-2}* 카세트의 강한 이동성 때문인 것으로 판단된다. 또한, 인테그론은 이들 항균제 내성 유전자 카세트의 이동에 의해 시기에 따라 구조가 진화하여 계속적으로 다양한 구조를 갖는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2010-0005389).

참 고 문 헌

1. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4943-60.
2. Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:201-6.
3. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4485-91.
4. Pallecchi L, Riccio ML, Docquier JD, Fontana R, Rossolini GM. Molecular heterogeneity of *bla_{VIM-2}*-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiol Lett* 2001;195:145-50.
5. Hall RM and Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15:593-600.
6. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla_{IMP}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1229-35.
7. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891-7.
8. Lee K. Trend of bacterial resistance for the past 50 years in Korea and future perspectives-Gram-negative bacteria. *Infect Chemother* 2011;43:458-67.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. Document M100-S15. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
10. Nobuta K, Tolmasky ME, Crosa LM, Crosa JH. Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 1988;170:3769-73.
11. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.
12. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:131-43.
13. Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2420-4.
14. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene,

- bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:5046-54.
15. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:4194-7.
 16. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. J Antimicrob Chemother 2002;49:837-40.
 17. Yum JH, Yong D, Lee K, Kim HS, Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;42:217-9.
 18. Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo-beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother 2003;51:397-400.
 19. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla*_{VIM-2} cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1053-8.
 20. Levesque C and Roy PH. PCR Analysis of Integrons. In: Persing DH, Smith TF, et al., eds. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington, DC; American Society for Microbiology, 1993:590-4.
 21. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:727-37.
 22. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2003;52:116-9.
 23. Poirel L, Lambert T, Türkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:546-52.
 24. 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.

=국문초록=

임상 검체분리 *Pseudomonas* spp. 및 *Acinetobacter* spp.에서 검출된 *bla*_{VIM-2} 카세트 보유 인테그론 구조의 다양성

¹동의대학교 의료보건대학 임상병리학과, ²순천향대학교 부천병원 진단검사의학과,
³연세대학교 의과대학 진단검사의학과 세균내성연구소

염종화¹, 신희봉², 용동은³, 정윤섭³

배경: 여러 나라에서 분리된 *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. 및 다른 그람음성 막대균 중에 metallo- β -lactamase (MBL) 생성에 의한 carbapenem 내성 균주가 증가하고 있다. 대부분의 MBL형은 그 유전자가 인테그론 안에 위치한다. 인테그론 중의 MBL 유전자 카세트는 쉽게 이동되므로 인테그론의 구조는 다양하다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter* spp.의 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 구조를 밝히고자 하였다.

방법: 1995년부터 1999년까지 국내의 한 대학 병원에서 분리된 *bla*_{VIM-2}를 가진 *P. aeruginosa* 28주, *P. putida* 6주, *Acinetobacter* spp. 13주와, 2005년 분리 *P. aeruginosa* 7주와 *Acinetobacter* spp. 11주를 대상으로 하였다. *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 구조는 hot start PCR법, 클로닝 및 dideoxy-chain termination법으로 분석하였다. 항균제 감수성은 CLSI 한천회 석법으로 시험하였다.

결과: 1995년부터 1999년까지 분리한 균주의 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론은 모두 class 1이었고, 그 크기별 균주 수는 *Pseudomonas* spp.의 경우 약 3.0 kb가 1주, 4.0 kb가 4주, 5.0 kb가 9주, 5.6 kb가 11주, 6 kb가 3주이었고, *Acinetobacter* spp.의 경우 약 3.0 kb가 12주, 5.0 kb가 1주이었다. 2005년에 분리한 *Pseudomonas* spp.에서 검출된 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론의 크기별 균주 수는 약 5.5 kb가 5주, 6.0 kb와 7.0 kb가 각 1주이었고, *Acinetobacter* spp. 11주 모두에서는 약 3 kb의 것이 검출되었다. 1995년부터 1999년까지 검출된 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론 6개 중 5개는 그 구조가 달랐다. 2005년에 분리한 *bla*_{VIM-2}를 가진 인테그론 5개 중 4개 다른 구조를 보였다. 그러나, *A. baumannii*와 *P. putida*의 인테그론은 동일한 구조를 보여서 인테그론 전체가 전달된 것으로 추정되었다. 이들 인테그론은 *bla*_{VIM-2} 카세트 외에 *bla*_{OXA-1}, *aacA1*, *aac(6')-I*, *aac(6')-II*, *aadA1*, *aadA2*, *catB3*, *catB8*, *ereA* 혹은 *qac'* 유전자 카세트 중의 1-5개를 가지고 있었다. 검출된 인테그론 9가지 중 4개는 재조합부위에 class II intron추정 서열이 삽입되어 있었다. *P. aeruginosa* 분리 1주의 class 1 인테그론은 leftward inverted repeat (IRi) 하류에 *orfInt11*이 융합되어 있었다. 인테그론 중 *bla*_{VIM-2}의 위치가 7주는 *int11* 바로 아래 첫 번째, 2주는 두 번째, 1주는 세 번째이었다.

결론: *bla*_{VIM-2} 카세트를 가진 인테그론은 병원성이 비교적 큰 *P. aeruginosa*뿐 아니라 *P. putida* 및 *Acinetobacter* spp.에서 관찰되지만, 그 크기와 구조는 세균 분리 시기에 따라 다양했다. *bla*_{VIM-2}를 가진 대부분의 인테그론은 여러 가지 amino-glycoside 수식효소 유전자도 가지고 있었다. 국내 분리 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*의 인테그론은 class 1이고, 수평 전달이 일어나는 것으로 판단된다. [대한임상미생물학회지 2012;15:131-138]

교신저자 : 염종화, 614-714, 부산시 부산진구 엄광로 995
동의대학교 의료보건대학 임상병리학과
Tel: 051-890-2682, Fax: 051-890-1469
E-mail: auxotype@deu.ac.kr