Characterization of Class 1 Integrons in Metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

Ji Youn Sung, Sun Hoe Koo, Kye Chul Kwon, Jong Woo Park, Chi Seon Ko, So Youn Shin, Jeong Hoon Song

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: The genes of metallo-β-lactamase (MBL), a powerful carbapenemase, are carried as a part of the mobile gene cassettes inserted into integrons playing an important role in rapid dissemination of antibiotic resistance genes among bacterial isolates. In this study, we investigated carbapenemase genes and class 1 integrons integrated into the gene cassettes in imipenem-non susceptible *P. aeruginosa*.
Methods: From July 2006 to March 2008, 81 consecutive, non-duplicate, imipenem-non susceptible *P. aeruginosa* were isolated at Chungnam National University Hospital in Chungcheong province of Korea. The modified Hodge and double disk synergy tests were conducted for the screening of carbapenemase and MBL production, respectively, and PCR and DNA sequencing were performed for the detection of carbapenemase genes and class 1 integron gene cassettes. We also employed the repetitive element sequence-based (Rep)-PCR method for an epidemiologic study.
Results: MBLs were detected in 13.6% (11/81) of imipenem-non susceptible *P. aeruginosa*. Ten isolates were found to carry bla_{IMP-1}, whereas 1 isolate was found to carry a bla_{VIM-2}. All of the IMP-1-producing strains harbored 4.0 kb class 1 integron containing chloramphenicol, aminoglycoside, and β-lactam-resistant genes. However, bla_{IMP-1} was not detected at class 1 integron. A 2.5 kb class 1 integron harboring bla_{VIM-2} was detected in a VIIM-2- producing strain. One identical pattern was observed in ten IMP-1 producing strains.
Conclusion: IMP-1 producing *P. aeruginosa* strains are currently distributed throughout Chungcheong province of Korea. In particular, all of the strains harbored class 1 integrons containing variant antibiotic resistance gene cassettes. **(Korean J Clin Microbiol 2009;12:17-23)**

Key Words: Metallo-β-lactamase (MBL), Class 1 integron, Multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa*

서 론

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 호기성 포도당 비발효 그람음성 간균으로 병원감염의 주요 원인균이다. 녹농균에 의한 감염은 대부분 기회감염이며, 외이도염, 골수염, 뇌수막염, 심내막염, 폐렴, 요로감염, 균혈증 등 다양한 유형의 감염증을 유발한다[1]. 녹농균에 의한 감염증 치료에는 carbapenem계 항균제가 많이 사용되어 왔는데 이는 이 항균제가 작용 범위가 넓고, extended spectrum β-lactamase (ESBL)을 포함한 대부분의 β-lactamase에 의한 가수분해에 저항성을 보여 그람음성균의 치료에 매우 효과적이기 때문이다[2].

그러나 최근 carbapenem에 내성을 보이는 녹농균의 감염이 증가하고 있어 심각한 문제가 되고 있다[3]. 녹농균은 carbapenemase의 생성, 염색체성 AmpC cephalosporinase의 과량 생성 및 porin 변이, penicillin-binding protein의 변화 등에 의해 carbapenem에 대한 내성을 보인다[4,5]. 특히 획득성 carbapenemase에 의한 내성은 다른 균에 그 내성유전자를 전달할 수 있다는 점에서 내성확산의 우려를 낳고 있다[6].

녹농균이 생성하는 대표적인 carbapenemase로는 class A의 GES형 β-lactamase[7], class B의 VIM, IMP, SIM, GIM 및 SPM형 metallo-β-lactamase (MBL)[8-12], class D의 OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-51 및 OXA-58형 β-lactamase[13,14] 등이 있다. 이 중 MBL은 가수분해 범위가 가장 넓으며 bla_{IMP} 및 bla_{VIM}과 같은 내성 유전자의 경우 대개 integron 내에 위치하는 특징이 있다[15,16].

Integron은 장소-특이적인 재조합 기전에 의해 유전자 카세트를 인지하고 포획하여 이동시킬 수 있는 구성요소를 가진 효율적인 유전적 기구로 많은 항균제 내성 유전자 카세트들을 종합적으로 축적할 수 있다. 특히 integron에 위치한 내성 유전자

Received 3 July, 2008, Revised 13 August, 2008
Accepted 20 October, 2008
Correspondence: Sun Hoe Koo, Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, 640, Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea. (Tel) 82-42-280-7798, (Fax) 82-42-257-5365, (E-mail) shkoo@cnu.ac.kr

들은 발현되거나 전파되기가 쉬우므로 integron을 가지고 있는 감염균들은 항균제에 더욱 강한 내성을 보이게 된다[17,18]. 이러한 integron은 integrase 단백질의 상동성에 근거를 두어 최소한 6종류의 클래스로 분류된다. 그 중 class 1은 가장 흔한 구조로 2개의 보존적 분절인 5'-보존 영역(5'-CS)과 3'-보존 영역(3'-CS)을 가지고 있다[19].

본 연구에서는 충청지역의 한 대학병원에서 분리된 imipenem 비감수성 녹농균을 대상으로 이들이 생성하는 carbapenemase의 유전형을 분석하였다. 또한 이 유전자들이 class 1 integron에 위치하는지를 확인하여 내성세균의 확산 방지책을 마련하는 데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2006년 7월부터 2008년 3월까지 충남대학교병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체로부터 분리된 녹농균 중 imipenem에 비감수성을 보인 81주를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek II GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 시험

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라[20] amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, ceftazidime, imipenem, piperacillin, ticarcillin 및 ciprofloxacin (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)과 aztreonam, cefepime 및 meropenem (Oxoid, Cambridge, UK)에 대한 감수성을 Mueller-Hinton 한천 (Difco, Cockeysville, MD, USA)을 사용하여 디스크 확산법으로 확인하였다.

정도관리를 위해서 *Escherichia* coli ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위에 드는지를 확인하였다.

3. β-lactamase 생성 검사

1) Carbapenemase 생성 선별 검사: Hodge 변법을 이용하여 carbapenemase 생성균주를 선별하였다[21]. *E. coli* ATCC 25922의 탁도를 0.5 McFarland로 맞춘 후 멸균된 면봉을 이용하여 Mueller-Hinton 한천(Difco)에 고르게 접종하였다. 그 위에 시험균주를 백금이로 평판의 가운데로부터 가장자리로 향하여 한 줄로 굵게 접종한 다음 배지의 중앙에 imipenem 디스크(10 μg, BBL)를 놓고 35°C에서 18시간 배양하였다. 시험균주를 접종한 선의 중앙쪽 말단부에 생기는 억제 영역이 다른 부위에 비해서 더 넓게 생기면 양성으로 판정하였다.

2) Metallo-β-lactamase 생성 선별 검사: Carbapenemase 생성균주를 대상으로 double disk synergy시험[21]을 이용하여 MBL 생성균주를 선별하였다. 먼저 대상 균주의 탁도를 0.5 McFarland로 맞춘 후 멸균된 면봉을 이용하여 Mueller-Hinton 한천(Difco)에 고르게 접종하였다. Imipenem 디스크(10 μg, BBL)와 EDTA (750 μg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA) 및 sodium mercaptoacetic acid (2 mg, Sigma Chemical Co.)가 포함되어 있는 디스크를 간격이 10 mm가 되도록 하여 놓은 후 35°C 항온기에 18시간 배양하였다. 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

4. β-lactamase 유전형 확인

β-lactamase의 유전형을 분석하기 위해 이미 보고된 바 있는 기존의 시발체를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 시행하였다(Table 1). 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 배양액으로부터 DNA를 추출하였다. DNA 추출액(5 μL), 10× Taq buffer (2.5 μL), 10 mM dNTP mix (0.5 μL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (바이오니아, 대전, 한국) 및 증류수를 혼합하여 25 μL의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 20초, 59°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 분리 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

5. Class 1 integron의 검출과 유전자 카세트의 유전형 확인

Class 1 integron을 검출하기 위해 이미 보고된 바 있는 기존의 5' 보존영역(GGCATCCAAGCAGCAAG)과 3' 보존영역(AAGCAGACTTGACCTGA)의 분절을 시발체로 하여 PCR을 수행하였다[30]. β-lactamase 유전형을 분석할 때와 같은 조성의 반응용액 25 μL를 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 4분씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 10분간 연장 반응시켰다.

Class 1 integron 내에 존재하는 유전자 카세트의 유전형은 primer walking 방법으로 확인하였다. 5' 보존영역과 3' 보존영역의 분절을 시발체로 하여 얻어진 각각의 PCR 산물을 염기서열 분석한 뒤, 말단 부분에서 다시 새로운 시발체를 디자인하

여 PCR을 수행하고 염기서열 분석을 하는 일련의 과정을 되풀이 하여 전체 염기서열을 분석하였다.

6. Repetitive element sequence-based (Rep)-PCR에 의한 역학적 연관성 조사

DNA purification kit (Promega)로 대상 균주의 염색체 DNA를 추출하여 주형 DNA로 사용하였다. Primer로는 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')와 REP2-Dt (5'-NCGN-CTTATCNGGCCTAC-3')로 명명된 장내세균의 반복 서열을 이용하였다[31]. 증폭반응은 DNA 추출액 (5.0 μL), 10× Taq buffer (5.0 μL), 10 mM dNTP mix (1.0 μL), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (바이오니아) 및 증류수를 혼합하

Table 1. Oligonucleotide primers for amplification and sequencing

Enzyme class	Primer pairs	Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Class A	PER1 F	*bla*$_{PER1}$	GTTAATTTGGGCTTAGGGCAGA	855	22
	PER1 R		CAGCGCAATCCCCACTGT		
	PSE F	*bla*$_{PSE}$	AATGGCAATCAGCGCTTC	700	23
	PSE R		GCGCGACTGTGATGTATA		
	VEB F	*bla*$_{VEB}$	CGACTTCCATTTCCCGATGC	650	24
	VEB R		GGACTCTGCAACAAATACGC		
	GES F	*bla*$_{GES}$, *bla*$_{IBC}$	GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT	903	25
	GES R		TGTCCGTGCTCAGGATGAGT		
Class B	IMP F	*bla*$_{IMP}$	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488	26
	IMP R		ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
	VIM F	*bla*$_{VIM}$	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780	26
	VIM R		TGCTACTCAACGACTGAGCG		
	SIM F	*bla*$_{SIM}$	GTACAAGGGATTCGGCATCG	569	27
	SIM R		TGGCCTGTTCCCATGTGAG		
	SPM F	*bla*$_{SPM}$	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798	27
	SPM R		CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
	GIM F	*bla*$_{GIM}$	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72	27
	GIM R		CGGAACGACCATTTGAATGG		
Class D	OXA-23F	*bla*$_{OXA-23,\ 27,\ 49}$	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	1,058	26
	OXA-23R		TCACAACAACTAAAAGCACTG		
	OXA-24F	*bla*$_{OXA-24,\ 25,\ 26,\ 40,\ 72}$	GTACTAATCAAA GTTGTGAA	825	26
	OXA-24R		TTCCCCTAACATGAATTTGT		
	OXA-51F	*bla*$_{OXA-51like}$	TGAACATTAAAICACTCTT	825	28
	OXA-51R		CTATAAAATACCTAATTGTT		
	OXA-58F	*bla*$_{OXA-58}$	CGATCAGAATGTTCAAGCGC	528	29
	OXA-58R		ACGATTCTCCCCTCTGCGC		

Abbreviations: F, forward; R, reverse.

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Antimicrobial agents	% susceptibility			
	Total isolated *P. aeruginosa* (n=81)		IMP-1 producing *P. aeruginosa* (n=10)	
	Intermediate	Resistant	Intermediate	Resistant
Amikacin	3.7	56.8	0.0	100.0
Gentamicin	14.8	70.4	0.0	100.0
Netilmicin	12.3	65.4	0.0	100.0
Tobramycin	0.0	60.5	0.0	100.0
Aztreonam	28.4	42.0	70.0	30.0
Ceftazidime	12.3	54.3	0.0	100.0
Cefepime	19.8	51.9	0.0	100.0
Imipenem	23.5	76.5	0.0	100.0
Meropenem	30.9	48.1	0.0	100.0
Piperacillin	0.0	43.2	0.0	60.0
Ticarcillin	0.0	69.1	0.0	100.0
Ciprofloxacin	2.5	76.5	0.0	100.0

여 50 μL의 혼합액으로 시행하였다. 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 70°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10 μL)은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동한 후 BioDoc-14™ Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 81주의 imipenem 비감수성 녹농균이 의뢰된 임상검체에서 분리되었다. 이 균주들을 대상으로 항균제 감수성 시험을 한 결과 imipenem과 ciprofloxacin에 대한 내성률이 각각 76.5%로 가장 높았으며 그 다음으로 gentamicin (70.4%)이 높았다. 반면에 aztreonam은 42.0%로 가장 낮은 내성률을 보였다(Table 2).

2. β-lactamase 생성 검사

대상 균주 81주 중 11주(13.6%)가 carbapenemase 생성 선별검사(cloverleaf test)에서 양성반응을 보였으며 이 균주들을 대상으로 double disk synergy 시험을 수행한 결과 11주 모두에서 상승효과가 관찰되었다. 따라서 대상 균주가 생성하는 carbapenemase는 모두 MBL인 것으로 확인되었다.

3. β-lactamase 유전형 확인

MBL 생성 선별검사에서 양성반응을 나타낸 11주를 대상으로 β-lactamase 유전자 검출을 위한 PCR을 수행한 결과 1주만이 VIM형이었고 그 외 10주는 모두 IMP형이었다. 이들을 대상으로 염기서열을 분석한 결과 bla_{VIM}에 대한 증폭산물은 bla_{VIM-2}의 염기서열과 일치하였으며 bla_{IMP}에 대한 증폭산물은 bla_{IMP-1}의 염기서열과 일치하였다.

한편 81주의 imipenem 비감수성 녹농균에서 Ambler class A와 D에 속하는 carbapenemase 유전자는 검출되지 않았다.

4. Class 1 integron의 검출과 유전자 카세트의 유전형 확인

MBL을 생성하는 11주 모두에서 2.5 kb 또는 4.0 kb 크기의 class 1 integron이 검출되었다. VIM-2 생성균주는 2.5 kb 크기의 integron을, IMP-1 생성균주는 4.0 kb 크기의 integron을 각각 가지고 있었다.

검출된 integron의 염기서열 분석결과 VIM-2 생성균주에서 검출된 2.5 kb 크기의 integron 내에는 VIM-2 유전자가 위치해 있었으나 IMP-1 생성균주에서 검출된 4.0 kb 크기의 integron 내에는 IMP-1 유전자가 위치해 있지 않았다(Fig. 1).

5. Repetitive element sequence-based PCR (Rep-PCR)에 의한 역학적 연관성 조사

11주의 MBL 생성균주를 대상으로 Rep-PCR을 수행한 결과 10주의 IMP-1 생성균주는 모두 동일한 밴드 패턴을 보였으나 VIM-2 생성균주는(P28) IMP-1 생성균주와는 다른 밴드 패턴을 보였다(Fig. 2).

고 찰

최근 carbapenem에도 내성을 보이는 다제내성 녹농균의 감염이 증가하고 있어 임상적으로 많은 문제가 되고 있다. 2003년 KONSAR surveillance 조사에 의하면 imipenem 내성인 녹농균의 비율이 20%로 높았고 그 중 대부분은 다제내성이었다[32]. 이와같이 carbapenem 내성 녹농균의 분리율이 점차 증가하고 있으나, carbapenem 내성에 관여하는 유전자의 국내 보유 현황에 대한 정보는 아직 많이 부족하다.

본 연구에서는 imipenem 비감수성 녹농균을 대상으로 carbapenem 내성획득에 중요한 역할을 하는 carbapenemase의 유전형을 조사하였다. 대상 균주 81주 중 총 11주(13.6%)가 carbapenemase 유전자를 가지고 있었고 그 중 10주가 IMP-1을 생성하였다. 반면, VIM-2를 생성하는 균주는 한 주 뿐이었다. VIM-2 생성 녹농균은 1998년 국내에 처음으로 보고되었으며[33] 2003년 국내에서 분리된 carbapenem 비감수성 녹농균 중

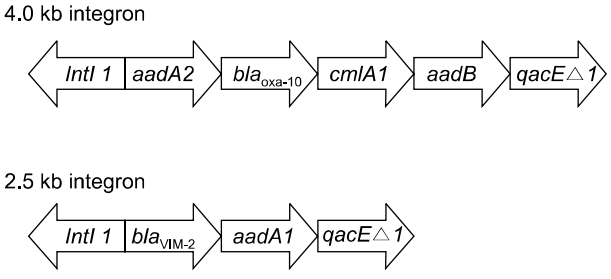

Fig. 1. Schematic representation of gene cassette structure located in the class 1 integron isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. The horizontal arrows indicate the translation orientation of the genes.

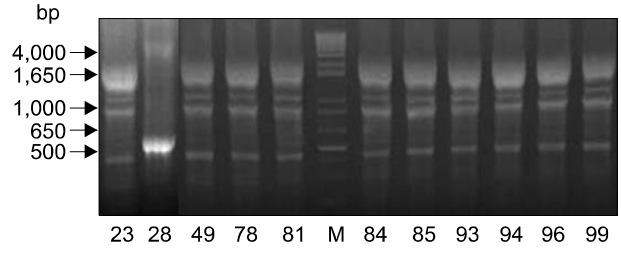

Fig. 2. Repetitive element sequence-based (Rep)-PCR patterns of genomic DNA from eleven MBL producing *Pseudomonas aeruginosa*. Lane M is 1 kb DNA size marker.

11.4%를 차지하였다[34]. 2005년의 보고에서도[35] 18.1%에 해당하는 carbapenem 비감수성 녹농균이 VIM-2를 생성하는 것으로 나타나 국내에는 VIM-2가 흔한 것임이 밝혀졌다. 이에 반해 IMP-1 생성균주의 분리는 드물었다. 그러나 2005년 Yoon 등에 의해 IMP-1형이 imipenem내성 녹농균 사이에서 확산되고 있음이 보여졌다[14]. 본 연구에서도 IMP-1형의 검출률이 12.3%로 나타나 전체 검출된 MBL 중 90.9%를 차지한 반면 VIM-2를 생성하는 균주는 단 한 주 뿐이었다. 이는 국내에서 IMP-1형 MBL을 생성하는 녹농균이 빠르게 확산되고 있음을 시사한다.

IMP-1 및 VIM-2 등의 MBL 유전자는 대부분은 class 1 integron에 유전자 카세트로 존재하는데 이런 특징은 이들 내성 유전자가 다른 균종으로 쉽게 전달될 수 있음을 뜻한다. 특히 MBL 유전자 카세트를 가진 integron은 aminoglycoside 내성 유전자 등 다양한 내성유전자 카세트도 함께 가진 것이 많아 integron 보유가 다제내성의 원인이 된다[36]. 본 연구에서도 MBL 생성균주 모두가 class 1 integron을 가지고 있는 것으로 나타나 integron이 녹농균 사이에 광범위하게 확산되어 있음을 확인할 수 있었다. VIM-2를 생성하는 균주는 2.5 kb 크기의 class 1 integron을 가지고 있었는데 이 integron은 VIM-2 유전자 외에도 aminoglycoside 내성유전자인 *aadA1*을 가지고 있었다. 이러한 integron의 구조는 2006년 러시아에서 분리된 녹농균에서 처음 보고되었으며 국내에서도 유사한 구조가 *Enterobacter cloacae*에서 보고된 바 있다[37,38].

한편 IMP-1을 생성하는 균주는 모두 동일한 4.0 kb 크기의 class 1 integron을 가지고 있었는데 이 integron에는 IMP-1 유전자가 위치해 있지 않았다. 지금까지 보고된 IMP-1 생성 녹농균에서 IMP-1 유전자는 대부분 class 1 integron에 위치해 있었으나[39] 본 연구에서는 IMP-1 유전자를 증폭된 class 1 integron에서 찾을 수 없었다. 반면 OXA형 β-lactamase 유전자인 bla_{oxa-10}, aminoglycoside 내성 유전자인 *aacA2* 및 *aadB*, 그리고 chloramphenicol 내성 유전자인 *cmlA1* 등이 integron에 위치해 있었다. 이러한 내성 유전자들은 녹농균이 다양한 항균제에 대해 내성을 갖게 하는 요인이 된다. 본 연구에서도 IMP-1을 생성하는 녹농균의 항균제 내성률이 aztreonam과 piperacillin을 제외한 모든 시험대상 항균제에 대해 100%인 것으로 나타나 이를 뒷받침 하였다(Table 2).

MBL 생성균주를 대상으로 Rep-PCR을 시행한 결과, IMP-1을 생성하는 10개의 균주가 유사한 패턴을 보였다. 이는 IMP-1 생성균주들이 유전적으로 매우 유사하며 이 균주들에 의해 돌발감염이 일어났음을 의미한다.

본 연구에서 imipenem 비감수성 녹농균을 대상으로 carbapenemase 유전형을 분석하였으나 실제로 carbapenemase를 가지고 있었던 균주는 총 81주 중 11주(13.6%) 뿐이었다. 이는 carbapenem내성 원인이 MBL 생성에 이외의 다른 요인들, 즉 염색체성 cephalosporinase를 과량생성 또는 항균제의 유출, 세포막의 투과성 감소 등에 의한 것임을 추측하게 한다[4,5]. 따라서 내성기전을 정확히 밝히려면 이들에 관한 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

이상의 결과에서 충청지역의 한 대학병원에서 분리된 imipenem 비감수성 녹농균에 확산되어 있는 carbapenemase는 주로 IMP-1형 MBL로 과거에 비하여 분리율이 증가되고 있는 것으로 나타났다. 또한 IMP-1 생성 녹농균은 다양한 항균제 내성유전자 카세트가 포함된 integron의 보유를 통해 많은 항균제에 대해 내성을 나타낼 수 있음이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2007 충남대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Bergogne-Berezin E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram-negative bacilli. In: Cohen J and Powerly WG, eds. Infectious Diseases. New York; Mosby, 2004:2203-26.
2. Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1697-704.
3. Song W, Woo HJ, Kim JS, Lee KM. In vitro activity of β-lactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2003; 21:8-12.
4. Fernández-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between β-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003;51:565-74.
5. Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. J Antimicrob Chemother 1996;38:245-51.
6. Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. J Med Microbiol 2004;53:653-6.
7. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2598-603.
8. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147-51.
9. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. bla_{VIM-2} cassette-containing novel integrons in metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1053-8.
10. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the

SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002;50:673-9.
11. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β-lactamase gene, bla_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4654-61.
12. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91.
13. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D β-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000;44: 1556-61.
14. Yoon WS, Lee BY, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Jeong TJ, et al. Prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates and mechanisms of resistance. Korean J Clin Microbiol 2005; 8:26-33.
15. Kim IS, Oh WI, Song JH, Lee NY. Screening and identification of metallo-β-lactamase gene in clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Korean J Lab Med 2004;24:177-82.
16. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:891-7.
17. Recchia GD and Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology 1995;141:3015-27.
18. Richet HM, Mohammed J, McDonald LC, Jarvis WR. Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. Emerg Infect Dis 2001;7:319-22.
19. 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.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100-S10(M2). Wayne, Pensylvania: CLSI, 2006.
21. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003;41: 4623-9.
22. Kim JM, Kang HK, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho BK, et al. Prevalence of PER-1 extended-spectrum β-lactamase-clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:20-6.
23. De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, et al. Prospective survey of β-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3031-4.
24. Naas T, Benaoudia F, Massuard S, Nordmann P. Integron-located VEB-1 extended-spectrum β-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. J Antimicrob Chemother 2000;46: 703-11.
25. Park JH, Lee SH, Jeong SH, Kim BN, Kim KB, Yoon JD, et al. Characterization and prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing an extended spectrum β-lactamase from Korean hospitals. Korean J Lab Med 2003;23:18-24.
26. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23-β-lactamase in Korea. J Clin Microbiol 2005;43:2241-5.
27. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-β-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2007;45:544-7.
28. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. J Antimicrob Chemother 2006;57:557-61.
29. Heritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. J Antimicrob Chemother 2005;55:115-8.
30. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:185-91.
31. Shannon KP and French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. J Antimicrob Chemother 2004;53:818-25.
32. Lee K, Park KH, Jeong SH, Lim HS, Shin JH, Yong D, et al. KONSAR group. Further increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, amikacin- and fluroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: 2003 KONSAR surveillance. Yonsei Med J 2006;47:43-54.
33. Lee K, Chong Y, Shin HB, Yong D. Rapid increase of imipenem-hydrolyzing *Pseudomonas aeruginosa* in a Korean hospital. Abstr E-85, 38th ICAAC, 1998.
34. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y, et al. VIM- and IMP-type metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. Emerg Infect Dis 2003; 9:868-71.
35. Kim IS, Lee NY, Ki CS, Oh WS, Peck KR, Song JH. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo-β-lactamase producers in a Korean hospital. Microb Drug Resist 2005;11:355-9.
36. Jang SJ. The role of integrons in the spread of multi-drug resistance. Korean J Clin Microbiol 2005;8:1-9.
37. Shevchenko O, Edelstein M, Kretchikov V, Stratchounski L. Characterization of class 1 integrons carrying the genes for VIM- and IMP-type metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* strains from Russia. Abstr P-1407, 16th ESCMID, 2006.
38. 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.
39. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksal I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-β-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. Microb Drug Resist 2007;13:191-8.

=국문초록=

Metallo-β-lactamase 생성 녹농균에서 Class 1 Integron의 유전형 분석

충남대학교 의과대학 진단검사의학교실

성지연, 구선회, 권계철, 박종우, 고지선, 신소연, 송정훈

배경: 강력한 carbapenemase인 metallo-β-lactamase (MBL) 유전자는 세균간의 내성유전자 확산에 중요한 역할을 하는 integron에 존재하는 경우가 많다. 본 연구에서는 imipenem 비감수성 녹농균을 대상으로 carbaepenmase의 유전형을 분석하고 이 유전자들이 class 1 integron에 위치하는지를 확인하였다.

방법: 2006년 7월부터 2008년 3월까지 충남대학교병원에서 분리된 imipenem 비감수성 녹농균 81주를 대상으로 하였다. Hodge 번법과 double disk synergy 시험을 이용하여 각각 carbapenemase와 MBL의 생성여부를 결정하였고 PCR과 염기서열 분석을 통하여 carbapenemase 유전자와 class 1 integron의 유전형을 분석하였다. 역학연구는 repetitive element sequence-based (Rep)-PCR로 하였다.

결과: Imipenem 비감수성 녹농균 81주 중 13.6%에 해당하는 11주가 MBL을 생성하는 것으로 나타났다. 이들 중 10주가 bla_{IMP-1}을 가지고 있던 반면 bla_{VIM-2}를 가지고 있던 균주는 단 한 주 뿐이었다. IMP-1 생성주의 경우 모두 4.0 kb의 integron을 가지고 있는 것으로 나타났으며 이 integron에는 chloramphenicol, aminoglycoside 및 β-lactam 항균제 내성유전자가 위치해 있었다. 그러나 bla_{IMP-1}은 integron 상에 위치해 있지 않았다. 반면 VIM-2 생성균주에서는 bla_{VIM-2}가 2.5 kb의 integron 상에 위치해 있었다. 10주의 IMP-1 생성균주는 Rep-PCR에서 한 가지의 동일한 밴드패턴을 보였다.

결론: IMP-1 β-lactamase를 생성하는 녹농균이 충청지역에 확산되어 있으며 특히 이 균주들은 모두 다양한 항균제 내성유전자 카세트가 포함된 class 1 integron을 가지고 있었다. **[대한임상미생물학회지 2009;12:17-23]**

교신저자 : 구선회, 301-721, 대전시 중구 대사동 640
충남대학교병원 진단검사의학과
Tel: 042-280-7798, Fax: 042-257-5365
E-mail: shkoo@cnu.ac.kr