

## Analysis of Integrations and Antimicrobial Resistances of Multidrug Resistant *Escherichia coli* Isolated in Korea

Yun-Yi Yang and Min-Ho Suh\*

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, 1035 Dalgubeol-daero, Dalseo-Gu, Daegu, 42601, Korea

### Corresponding

Min-Ho Suh, M.D., Ph.D.

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, 1035 Dalgubeol-daero, Dalseo-Gu, Daegu, 42601, Korea

Phone : +82-53-258-7371

Fax : +82-53-258-7363

E-mail : minho@dsmc.or.kr

Received : November 29, 2019

Revised : December 13, 2019

Accepted : December 14, 2019

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Antibacterial drugs are one of the most important therapeutic agents of bacterial infections but multidrug resistant *Escherichia coli* (MDREC) is an increasing problem worldwide. Major resistance mechanism of MDREC is horizontal gene transfer of R plasmids harboring integrons, which the integron integrase (IntI) catalyzes gene cassette insertion and excision through site specific recombination. In this study, resistance profiles of integron harboring *E. coli* isolated in Korea and the genetic environments of integron gene cassettes were analyzed by PCR and direct sequencing to clarify the mechanisms of spread of integron harboring *E. coli*. Resistance rates of integron harboring *E. coli*, including  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones and MDR frequencies were significantly higher than that of *E. coli* without integron ( $p < 0.01$ ). Majority (80%) of integron harboring *E. coli* showed resistance transfer by conjugation. Most (80%) of *E. coli* had *dfrA17-aadA5* cassette array and PcH1 hybrid promoter; 16.7% of *E. coli* had *dfrA12-orfF-aadA2* cassette array and PcW promoter. The higher prevalence of weak Pc variants among most (96.7%) of integron harboring MDREC suggests that a flexible cassette array is more important than enhanced expression. All the integrons had LexA binding motif suggests that SOS responses control the expression of these integrons. In conclusion, the genetic bases of integrons were diverse, and the spread and the expression of prevalent gene cassette arrays may be deeply related with strengths of Pc promoters in integrons. These informations will provide important knowledge to control the increase of integron harboring MDREC.

**Key Words:** Integron, Gene Cassette, Promoter, MDR *Escherichia coli*

## INTRODUCTION

대장균은 임상적으로 흔히 볼 수 있는 병원균이며 근래에 3 계열 이상의 항균제에 동시에 내성인 다 약제 내성 대장균에 의해 초래되는 원내 감염이 전세계적으로 증가하고 있어서 보건의료적으로 큰 문제가 되고 있다 (1, 2). 대장균을 비롯한 그람 음성 세균에서 다 약제 내성의 원인은 주로 R plasmid가 세균 간 horizontal gene transfer (HGT)에 의해 내성유전자를 확산시키기 때문인 것으로 알려져 있다 (3, 4). R plasmid가 내성유전자들을 획득하는 기전으로서 R plasmid에 위치하고 있는 인테그론 integrase (IntI)에 의한 유전자 카세트 포획이 대표적이며 그 외에도 transposon이나 insertion sequence (IS) 등의 이동성 DNA들이 중요한 기능을 수행한다 (3, 5~7). 인테그론은 transposon이나 R plasmid상에 위치하고 있는 자연적인 유전자 포획 및 발현 단위이며, 다양한 내성 유전자 카세트들을 채집하여 축적하고

Copyright © 2019 Journal of Bacteriology and Virology

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

발현시킴으로써 R plasmid가 다 약제 내성을 가지도록 한다 (6, 8, 9). 인테그론 유전자 카세트의 발현을 조절하는 Pc promoter는 발현 강도에 따라 강력한 발현 강도를 가지는 strong Pc (PcS) promoter와 약한 발현 강도를 가지는 weak Pc (PcW) promoter, 그리고 PcW와 PcS가 부분적으로 섞인 hybrid Pc (PcH1) promoter 등 다양한 promoter들이 존재하며, 발현 강도는 promoter의 -35서열과 -10서열에 의해 결정된다는 사실이 보고되었으나 국내 분리 인테그론에 대한 이 분야의 연구보고는 없다 (6, 9, 10). 그리고 유전자 카세트의 재조합은 IntI가 주도하는데 IntI의 발현을 조절하는 Pint promoter는 Pc promoter와 서로 상충관계를 가지고 있어서 Pc promoter의 강도에 따라 IntI의 발현이 변하여 유전자 카세트 재조합에 영향을 미치게 되고 특정 카세트 대열의 유행에 관계한다는 사실이 보고되었다 (6, 10, 11).

이 연구에서는 다 약제 내성 대장균의 인테그론 보유와 다 약제 내성빈도와의 상호 관계 및 접합에 의한 인테그론 R plasmid의 전달성을 분석하여 다 약제 내성 대장균의 확산의 원인을 조사하고자 하였으며, 인테그론의 IntI의 기능에 영향을 미치는 Pc promoter서열, SOS반응 억제 기능을 하는 LexA 결합 서열 (6) 및 *attC* bottom strand의 extra-helical base (EHB) (6) 등을 분석함으로써 특정 유전자 카세트 대열을 보유한 인테그론이 더 흔한 유행을 보이는 분자적 배경 해석과 인테그론 보유 대장균의 증가를 최소화하기 위한 대책수립에서 활용될 분자유전학적 정보를 제공하고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### 균주 분리 및 동정

2016년 10월에서 2017년 2월 사이에 대구지역 1개 3차병원에서 분리 배양된 후 군주센터에 보관되어 있던 대장균 117 주를 분양 받아 재확인 동정을 거친 후 실험에 사용하였으며, 117주중에서 37주는 선행연구에서 *bla*<sub>CTX-M</sub> 보유 균으로 확인된 균주이다 (3). 모든 실험 균들은 IRB 심의 면제대상임을 확인하였다. 대장균 동정은 선행연구에서 기술한 방법에 따라 API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)와 전통적 동정 법을 사용하여 동정하였다 (3).

### 항균제 감수성 검사

$\beta$ -lactam계열의 ampicillin, cefotaxime, cefotaxime-clavulanate, ceftazidime, ceftazidime-clavulanate, aztreonam 및 imipenem과 aminoglycoside계열의 streptomycin, amikacin, tobramycin, kanamycin 및 gentamicin과 quinolone계열의 nalidixic acid 및 ciprofloxacin과 sulfamethoxazole-trimethoprim, chloramphenicol, tetracycline 등 17종의 항균제(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 대한 감수성 검사를 실시하였으며, 검사방법은 선행연구에서 기술한 agar dilution법으로 검사하였다 (3). 정도 관리를 위한 균주로서 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853을 함께 검사하였으며 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 기준에 의하여 내성 균 여부를 판정하였다 (12). 다 약제 내성 균의 판정은 Magiorakos 등의 기준에 따라 3계열 이상의 항균제에 내성 혹은 비 감수성인 균을 다 약제 내성 균으로 판정하였다 (13).

### R plasmid의 내성전달검사와 plasmid DNA 분석

접합에 의한 내성전달검사는 선행연구에서 사용된 방법 (3)을 따랐으며  $\text{NaN}_3$ 에 내성인 *E. coli* J53을 피 전달 균으로 사용하였다. Transconjugant는 cefotaxime 2 mg/L 혹은 ampicillin 32 mg/L와  $\text{NaN}_3$  150 mg/L가 포함된 선택 배지를 이용하여 확인하였다. Plasmid DNA는 선행연구 (3)에서 기술한 대로 Kado와 Liu의 알칼리 용해법 (14)으로 분리하였으며 분리된 plasmid DNA는 0.7% agarose gel과 1X Tris-Borate-EDTA 완충액에서 40 V로 20 시간 전기 영동 시킨 후 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ethidium bromide로 gel을 염색하고 증류수로 씻은 후 Gel Doc-it TS 장치(UVP, Upland, CA, USA)로 촬영하여 판독하였다.

### DNA 추출과 PCR에 의한 인테그론, 유전자 카세트 및 plasmid replicon형별 검사

DNA 추출과 PCR실험은 선행연구에서 기술한 방법 (3)에 준하였는데, 분리된 DNA는 1.5 mL 미량원심분리관(SPL Lifesciences Co., Pocheon, Korea)에 넣고 -20 °C에 보관하면서 사용하였고, PCR 실험은 GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA)와 Thermal cycler (C1000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 20  $\mu\text{L}$  scale로 실시하였다. PCR에 사용한 primer들의 oligonucleotide서열, GenBank 정보 및 annealing 온도는 Table 1과 같다. PCR 조건

은 최초에 94 °C에서 5분간 예열 후, 94 °C에서 1분, annealing 온도에서 30초, 72 °C에서 1분으로 35회 반응시킨 다음, 72 °C에서 5분간 처리 후 실험에 사용하였다. PCR된 DNA 10 µL를 GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) 염색 액을 섞은 1.2% agarose gel과 1X Tris-Borate-EDTA 완충액에서 100 V로 15 분간 전기 영동 시킨 후 Gel Doc-it TS 장치(UVP)로 촬영하여 판독하였다. Plasmid의 replicon형별 분류는 PCR을 기반으로 한 Carattoli 등의 방법 (15)에 의하여 검사를 실시하였다.

**Table 1.** Sequences of primers used for PCR amplification and DNA sequencing for integrons

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	GenBank accession no.	Position of primer	Annealing temperature (°C)
5'-CS	GGC ATC CAA GCA GCA AGC	AF458080	544-561	55
3'-CS	AAG CAG ACT TGA CCT GAT	AF458080	2903-2887	55
intl1-L	GCC TTG CTG TTC TTC TAC GG	X12870	898-879	57
intl1-R	GAT GCC TGC TTG TTC TAC GG	X12870	341-360	57
intl1-A	CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC	AF458080	386-405	57
intl1-B	CCC GAG GCA TAG ACT GTA	AF458080	545-528	57
intl2-A	AAA TCT TTA ACC CGC AAA CGC	AJ001816	1475-1495	57
intl2-B	ATG TCT AAC AGT CCA TTT TTA AAT TCT A	AJ001816	1914-1887	57
intl3-A	GTG GCG CAG GGT GTG GAC	D50438	194-211	59
intl3-B	ACA GAC CGA GAA GGC TTA TG	D50438	959-940	59
qacEd1-F1	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	AM040708	2153-2172	56
qacEd1-R1	CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC	AM040708	2378-2359	56
qacEd1-F2	TCG CAA CAT CCG CAT TAA AA	AM040708	2175-2194	52
qacEd1-R2	TTT TAA TGC GGA TGT TGC GA	AM040708	2194-2175	52
sul1-F1	CTT CGA TGA GAG CCG GCG GC	AM040708	2514-2533	65
sul1-R1	GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC	AM040708	2950-2931	65
Sull-rev-R	GCT CAA GAA AAA TCC CAT CCC C	AM040708	3012-2991	57
intl1-up1	CCG TAG AAG AAC AGC AAG GC	X12870	879-898	57
intl1-up2	GAC TTC GCT GCT GCC CAA GG	AY816215	281-300	57
attL-R	GAC TGC CCT GCT GCG TAA CAT	AY816215	585-565	57

5'-CS, 5'-conserved segment; 3'-CS, 3'-conserved segment; *intl*, integron integrase gene; *qacEdelta*, quaternary ammonium compound efflux gene; *sul1*, sulfonamide resistance gene; *attL*, site specific recombination region of integron.

## DNA 염기서열 조사, 정렬 및 DNA서열 folding분석

DNA 염기서열은 PCR된 DNA를 대상으로 ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing법(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 조사하였고, DNA 유사성 검사는 BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) 프로그램을 이용하여 분석하였으며, Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 이용하여 DNA 염기서열들을 정렬한 후 유전자들을 분석하였다. 인테그론 유전자 카세트 *attC*서열의 DNA 2차구조 folding연구는 Mfold web server(<http://www.bioinfo.rpl.edu/applications/mfold/>)와 DINAMelt web server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quikfold>)를 이용하여 분석하였다 (16).

## RESULTS

### 인테그론 보유와 다 약제 내성과의 관계

실험에 사용된 117주의 대장균 중에서 30주(25.6%)가 인테그론을 보유하고 있었으며, 인테그론 보유 균들은 모두가 *intl1* 유전자를 가지고 있어서 class 1 인테그론임을 확인할 수 있었다. 117주의 대장균 중에서 extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생산하는 대표적인 유전자인 *bla*<sub>CTX-M</sub>을 보유한 균이 37주(31.6%)였고, *bla*<sub>CTX-M</sub> 비 보유 균이 80주(68.4%)였다. *bla*<sub>CTX-M</sub> 보유 대장균 37주 중 14주(37.8%)가 인테그론을 가지고 있었고, *bla*<sub>CTX-M</sub> 비보유 대장균 80주 중 16주(20.0%)가 인테그론을 가지고 있

었으며,  $bla_{CTX-M}$  보유 대장균의 인테그론 분리 빈도가  $bla_{CTX-M}$  비 보유 균의 빈도에 비해 1.9배 높았다( $p < 0.01$ ). 인테그론 보유 균들은 모두(100%)가 3계열 이상의 항균제에 내성인 다 약제 내성 균 (13)이었으며, 최소 3종에서 최대 15종의 항균제에 내성을 나타내었다(Fig. 1). 인테그론 보유 균들은 평균 7.1종의 항균제에 내성을 가지고 있었으며 비 내성 균은 한 주도 없었다. 인테그론 비 보유 균들은 87주중에서 45주(51.7%)가 다 약제 내성 균이었고, 17종 항균제 모두에 감수성인 균이 26주(29.9%)였다. 인테그론 비 보유 균들은 최소 0에서 최대 14종의 항균제에 내성을 나타내었고, 평균 3.3종의 항균제에 내성을 가지고 있었다. 인테그론 보유에 따른 다 약제 내성 빈도와 내성 항균제 수를 비교한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 다 약제 내성 빈도는 1.9배 이상 높았고( $p < 0.001$ ), 내성 항균제 수는 2.2배 많았다( $p < 0.001$ ). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생산하는 대표적인 유전자인 인테그론과  $bla_{CTX-M}$ 을 모두 보유한 균들은 평균 8.4종의 항균제에 내성을 가지고 있었고 인테그론과  $bla_{CTX-M}$ 을 모두 보유하지 않은 균에 비해 다 약제 내성 빈도는 2.9배 이상 높았고( $p < 0.001$ ), 내성 항균제 수는 4.5배 이상 많았다( $p < 0.001$ ).

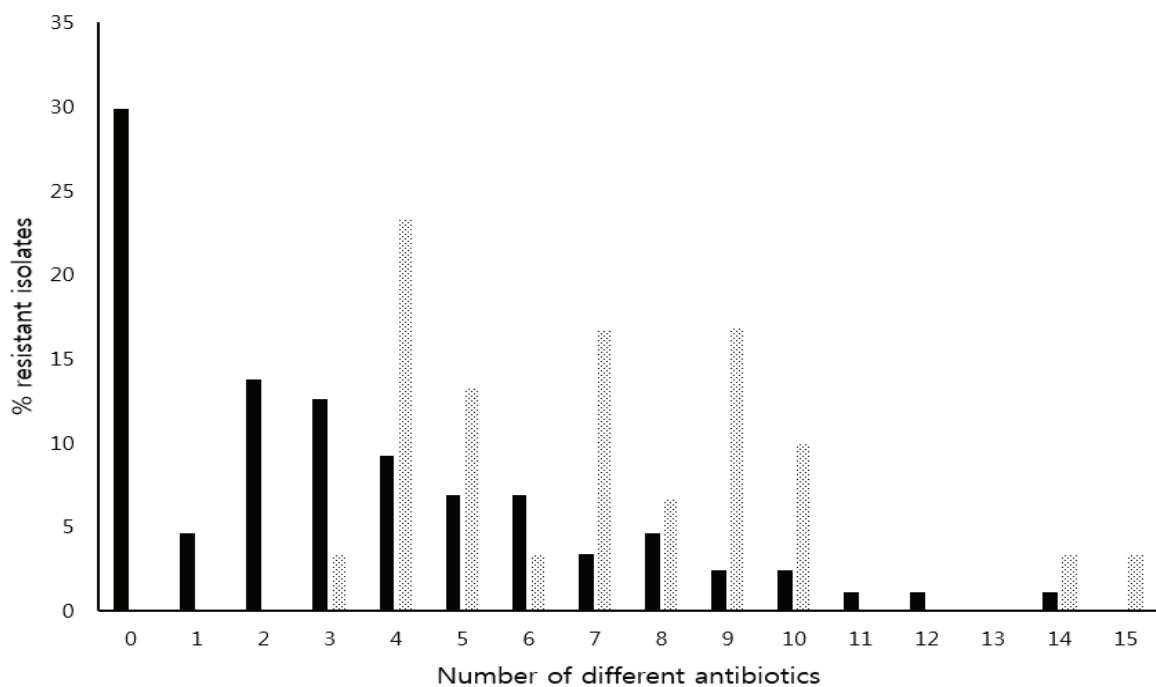


Fig. 1. Incidences of multiple resistance to increasing numbers of antimicrobial agents in integron-positive (▨) and integron-negative (■) *Escherichia coli* isolated in Korea. Total 117 isolates (30 integron-positive and 87 integron-negative isolates) were tested.

## 인테그론 보유와 항균제감수성과의 관계

인테그론 보유에 따른 항균제감수성의 차이를 조사하기 위해 인테그론 보유 균과 비 보유 균의 17종 항균제에 대한 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, MIC 범위, 그리고 감수성 율과 내성 율을 각 항균제 별로 비교하였다(Table 2). 인테그론 비 보유 균에 비해 보유 균의 내성 율이 유의하게 높았고, 감수성 율이 유의하게 낮았으며, MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>에서는 현저하게 큰 차이를 보였고, MIC범위에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았다. Cephalosporin계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 cefotaxime 내성 율이 2.1배 높았고( $p = 0.001$ ), MIC<sub>50</sub>이 32배 이상 높았으며, cefotaxime-clavulanate 내성 율이 4.7배 높았고( $p = 0.004$ ), MIC<sub>90</sub>이 10배 이상 높았으며, ceftazidime 내성 율은 2.6배 높았고( $p = 0.024$ ), MIC<sub>50</sub>은 4배 높았으며, ceftazidime-clavulanate 내성 율은 15.2배 높았고( $p = 0.004$ ), MIC<sub>90</sub>은 16배 높았다. Carbapenem계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 imipenem 중등도 내성 율이 8.7배 높았고( $p = 0.004$ ), 감수성 율은 1.2배 낮았으며( $p = 0.004$ ), MIC<sub>90</sub>은 2배 높았으나 실험한 모든 균 중에서 imipenem에 내성인 균은 없었다. Monobactam계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 aztreonam 내성 율은 2.5배 높았고( $p = 0.046$ ), MIC<sub>50</sub>은 4배 높았다. Penicillin계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 ampicillin 내성 율은 1.6배 높았고( $p = 0.001$ ), MIC<sub>50</sub>은 차이가 없었다. Quinolone계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 nalidixic acid 내성 율이 1.8배 높았고( $p < 0.001$ ), MIC<sub>50</sub>은 4배 이상 높았으며, ciprofloxacin 감수성 율은 1.6배 낮았고( $p = 0.029$ ), MIC<sub>50</sub>이 256배 이상 높았다. Tetracycline계 항균제 내성

**Table 2.** Antibiotic susceptibility of integron-positive and integron-negative *Escherichia coli* isolated in Korea

Antibiotic	Integron-positive isolates (n=30)						Integron-negative isolates (n=87)						p value		
	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	S	I	R
cefotaxime	>32	>32	0.023- >32	8 (26.7)	3 (10.0)	19 (63.3)	1	>32	0.023- >32	52 (59.8)	9 (10.3)	26 (29.9)	0.002	1.000 <sup>†</sup>	0.001
cefotaxime- clavulanate	2	>32	0.023- >32	11 (36.7)	11 (36.7)	8 (26.6)	1	3	0.023- >32	56 (64.4)	26 (29.9)	5 (5.7)	0.008	0.491	0.004 <sup>†</sup>
ceftazidime	4	>32	0.25- >32	16 (53.3)	5 (16.7)	9 (30.0)	1	>32	0.016- >32	75 (86.2)	2 (2.3)	10 (11.5)	0.000	0.012 <sup>†</sup>	0.024 <sup>†</sup>
cefazidime- clavulanate	1	16	0.25- >32	23 (76.7)	2 (6.7)	5 (16.7)	0.5	1	0.023- >32	84 (96.6)	2 (2.3)	1 (1.1)	0.003 <sup>†</sup>	0.271 <sup>†</sup>	0.004 <sup>†</sup>
imipenem	0.5	2	0.125-2	24 (80.0)	6 (20.0)	0 (0)	0.5	1	0.023-1	85 (97.7)	2 (2.3)	0 (0)	0.004 <sup>†</sup>	0.004 <sup>†</sup>	
aztreonam	2	>32	0.125- >32	17 (56.7)	6 (20.0)	7 (23.3)	0.5	16	0.064- >32	71 (81.6)	8 (9.2)	8 (9.2)	0.006	0.116	0.046
ampicillin	>32	>32	0.5->32	2 (6.7)	1 (3.3)	27 (90.0)	>32	>32	0.125- >32	36 (41.4)	1 (1.1)	50 (57.5)	0.000	0.449 <sup>†</sup>	0.001
nalidixic acid	>256	>256	4->256	1 (3.3)	1 (3.3)	28 (93.4)	64	>256	4->256	40 (46.0)	1 (1.1)	46 (52.9)	0.000	0.449 <sup>†</sup>	0.000
ciprofloxacin	>64	>64	0.008- >64	11 (36.6)	2 (6.7)	17 (56.7)	0.25	>64	0.004- >64	52 (59.8)	1 (1.1)	34 (39.1)	0.029	0.161 <sup>†</sup>	0.046
chloramphenicol	2	16	0.5- >256	26 (86.7)	1 (3.3)	3 (10.0)	2	4	0.25- >256	81 (93.1)	1 (1.1)	5 (5.8)	0.227	0.449 <sup>†</sup>	0.421 <sup>†</sup>
tetracycline	8	>256	1->256	13 (43.3)	4 (13.4)	13 (43.3)	8	>256	0.5- >256	43 (49.4)	23 (26.4)	21 (24.2)	0.565	0.142	0.046
streptomycin	32	>256	8->256	4 (13.3)	9 (30.0)	17 (56.7)	8	>256	1->256	53 (60.9)	13 (14.9)	21 (24.2)	0.000	0.069	0.001
amikacin	4	8	0.25- >256	28 (93.3)	0 (0.0)	2 (6.7)	4	8	0.25- >256	82 (94.2)	2 (2.3)	3 (3.5)	1.000 <sup>†</sup>	1.000 <sup>†</sup>	0.601 <sup>†</sup>
tobramycin	1	32	0.064- 128	18 (60.0)	5 (16.7)	7 (23.3)	0.5	32	0.064- >256	69 (79.3)	4 (4.6)	14 (16.1)	0.037	0.047 <sup>†</sup>	0.373
kanamycin	32	128	8->256	13 (43.4)	10 (33.3)	7 (23.3)	16	128	4->256	63 (72.4)	11 (12.7)	13 (14.9)	0.004	0.011	0.292
gentamicin	2	>256	0.125-> 256	16 (53.3)	1 (3.3)	13 (43.3)	0.5	>256	0.064- >256	70 (80.5)	1 (1.1)	16 (18.4)	0.004	0.449 <sup>†</sup>	0.006
Sulfamethoxazol- trimethoprim	>320	>320	20- >320	1 (3.3)	0 (0.0)	29 (96.7)	20	>320	10- >320	72 (82.8)	2 (2.3)	13 (14.9)	0.000	1.000	0.000

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. The p value was computed using the chi-square test. †, Fisher's exact test.

을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 tetracycline 내성율이 1.8배 높았고( $p=0.046$ ), MIC<sub>50</sub>은 차이가 없었다. Aminoglycoside계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 streptomycin내성율이 2.3배 높았고( $p=0.001$ ), MIC<sub>50</sub>은 4배 높았으며, tobramycin감수성율이 1.3배 낮았고( $p=0.037$ ), MIC<sub>50</sub>은 2배 높았으며, kanamycin감수성율은 1.7배 낮았고( $p=0.004$ ), MIC<sub>50</sub>은 2배 높았으며, gentamicin내성율은 2.4배 높았고( $p=0.006$ ), MIC<sub>50</sub>은 4배 높았다. Amikacin에는 인테그론 보유 균과 비 보유 균 사이에 내성율이나 감수성율에 차이가 없었으며, 93~94%의 균이 amikacin에 감수성을 나타내었다. Sulfonamide계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 sulfamethoxazole-trimethoprim내성율이 6.5배 높았고( $p=0.000$ ), MIC<sub>50</sub>은 16배 이상 높았다. Chloramphenicol계 항균제 내성을 조사한 결과 인테그론 보유 균과 비 보유 균 사이에 내성율이나 감수성율에 차이가 없었으며, 87~93%의 균이 chloramphenicol에 감수성을 나타내었다.

## 접합에 의한 내성 전달 및 plasmid특성 분석

인테그론 보유 균 30주 중에서 24주(80%)가 접합에 의해 피전달균 J53으로 내성이 전달되었고, 인테그론 보유 균 중에서 *bla*<sub>CTX-M</sub>를 보유한 대장균들은 14주중에서 13주(92.9%)가 접합에 의해 피전달균으로 내성이 전달되었으며 분리된 plasmid DNA들의 분자량은 120~170 Mega Dalton 사이의 크기였다(Table 3). PCR을 기반으로 한 replicon검사 결과 Frep, FIA, FIB 등의 F계열의 plasmid가 대부분이었고 B/O가 1주 관찰되었다(Table 3).

## 인테그론 구조 분석

PCR 및 DNA 염기서열분석법을 이용하여 *bla*<sub>CTX-M</sub> 보유 균 14주와 *bla*<sub>CTX-M</sub> 비 보유 균 16주 등 총 30주의 대장균들이 보유하고 있는 30개의 인테그론의 유전적 구조를 조사하였다. 인테그론은 보유하고 있는 유전자 카세트의 수에 따라 3종류로 분류할 수 있었는데, 단일 유전자 카세트를 가진 것(A형)이 1개, 2개의 유전자 카세트를 가진 것(B형)이 24개, 그리고 3개의 유전자 카세트를 가진 것(C형)이 5개로서 평균 2.1개의 유전자 카세트를 가지고 있었다. Fig. 2는 3종류의 인테그론의 구조를 schematic diagram으로 정리한 그림이다. 모든 인테그론은 5'-보존 서열(5'-CS)과 3'-CS가 잘 보존되어 있었고, 그 중간에 1~3개의 유전자 카세트를 가지고 있었다. 5'-CS에는 *int1* 유전자와 *attI* 서열이 잘 보존되어 있었고, 3'-CS는 *qacE-delta1*과 *sulI* 유전자를 갖고 있었다(Fig. 2). A형 인테그론은 *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 가지고 있었고, B형 인테그론은 *dfrA17* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 *aadA5* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 가지고 있었고, C형 인테그론은 *dfrA12* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 *orfF* 유전자 카세트와 *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 가지고 있었다. 실험한 모든 인테그론 내부에서 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자는 관찰되지 않았다.

## 유전자 카세트 구조 분석

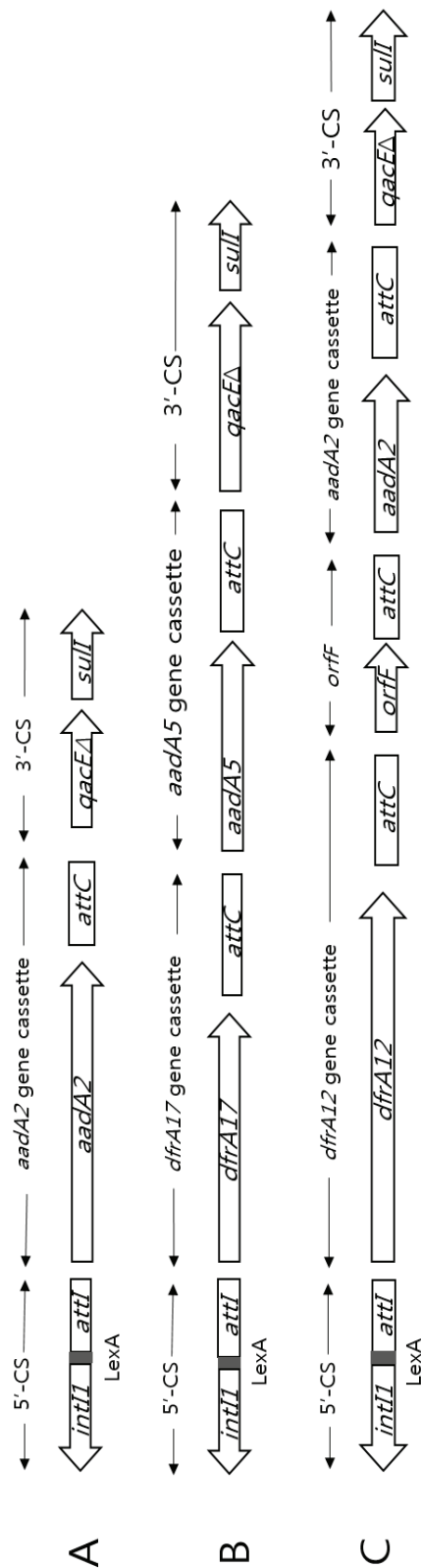
A형 인테그론은 streptomycin과 spectinomycin 내성 유전자인 *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 단일 유전자 카세트를 가지고 있었다. *aadA2* 유전자 카세트는 5'-CS의 *attB*의 G서열과 *attC*의 TTAGAC서열이 연결되어 있었고, *attC*의 G서열과 3'-CS의 *attB*의 TTAGAT서열이 연결되어 있었다(Fig. 3A). B형 인테그론은 trimethoprim 내성 유전자인 *dfrA17* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와, streptomycin과 spectinomycin 내성 유전자인 *aadA5* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 가지고 있었다. *dfrA17* 유전자 카세트는 5'-CS의 *attB*의 G서열과 *attC*의 TTAGCC서열이 연결되어 있었고, *attC*의 G서열과 *aadA5* 유전자 카세트의 *attC*의 TTAGGC서열이 연결되어 있었으며, *aadA5* 유전자 카세트의 *attC*의 G서열과 3'-CS의 *attB*의 TTAGAT서열이 연결되어 있었다(Fig. 3B). C형 인테그론은 trimethoprim 내성 유전자인 *dfrA12* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와, *orfF* 유전자 카세트와, streptomycin과 spectinomycin 내성 유전자인 *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 가지고 있었다. *dfrA12* 유전자 카세트는 5'-CS의 *attB*의 G서열과 *attC*의 TTAGCC서열이 연결되어 있었고, *attC*의 G서열과 *orfF* 유전자 카세트의 *attC*의 TTAGCA서열이 연결되어 있었으며, *orfF* 유전자 카세트의 *attC*의 G서열과 *aadA2* 유전자 카세트의 *attC*의 TTAGAC서열이 연결되어 있었으며, *aadA2* 유전자 카세트의 *attC*의 G서열과 3'-CS의 *attB*의 TTAGAT서열이 연결되어 있었다(Fig. 3C). 이 실험에서 확인한 5종의 유전자 카세트에는 AGG, AGC 혹은 AAG 등의 리보솜 결합 서열(Ribosomal Binding Site, RBS)과 ATG, GTG 혹은 TTG 등의 시작 codon, 그리고 TGA 혹은 TAA 등의 정지 codon이 잘 보존되어 있었다(Fig. 3).



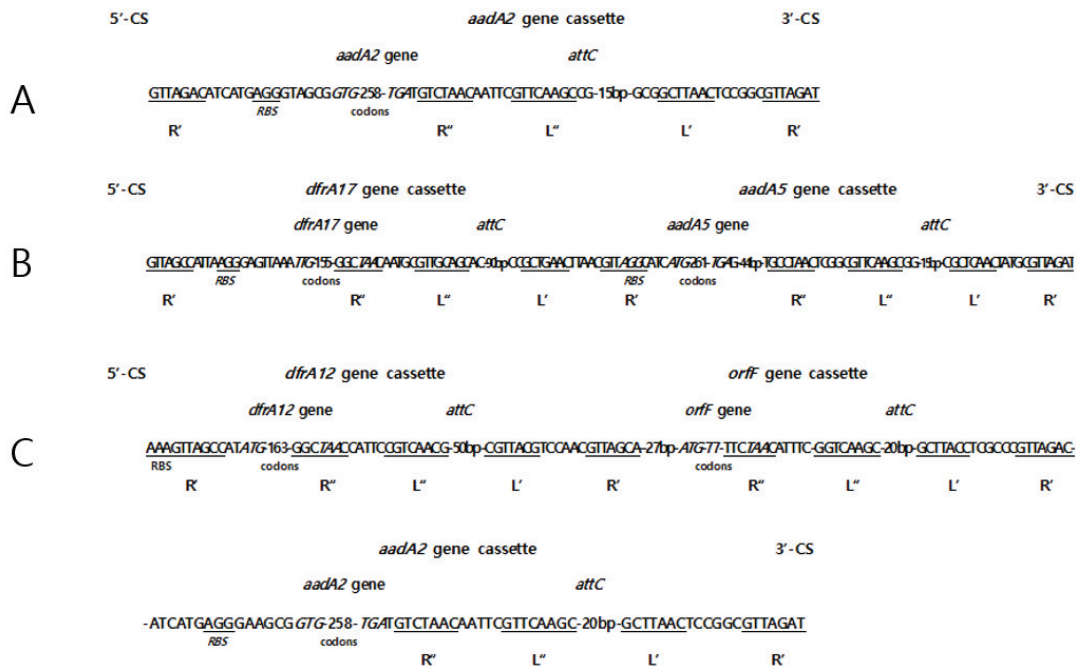
**Table 3.** Integron structures of CTX-M producing *Escherichia coli* isolated in Korea

CTX-M	No. of isolates (n=14)	Resistance		Incompatibility <sup>a</sup>	Transfer by Conjugation	size (kb)	Integron structure						
		CTX	CAZ				5'-CS	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA17</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA5</i>	<i>orfF</i>	3'-CS
CTX-M3	1	+	-	Frep	+	1.9	+	+	-	+	-	+	+
CTX-M3	1	+	-	Frep, F1B	+	1.0	+	-	-	+	-	-	+
CTX-M15	1	+	-	Frep, F1A, F1B	+	1.7	+	-	+	-	+	-	+
CTX-M15	1	+	+	Frep, F1A, F1B	+	1.7	+	-	+	-	+	-	+
CTX-M14	3	+	-	Frep, F1A, F1B	+	1.7	+	-	+	-	+	-	+
CTX-M14	1	+	-	-	+	1.9	+	+	-	+	-	+	+
CTX-M14	1	+	-	Frep, F1A, F1B, B/O	+	1.9	+	+	-	+	-	+	+
CTX-M14	1	+	-	Frep, F1A, F1B	-	1.7	+	-	+	-	+	-	+
CTX-M27	4	+	+	Frep, F1A, F1B	+	1.7	+	-	+	-	+	-	+

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; a, Incompatibilities were identified by PCR-based replicon typing; 5'-CS, 5'-conserved segment; *dfr*, dihydrofolate reductase; *aad*, aminoglycoside-3'-adenyltransferase; *orfF*, open reading frame F; 3'-CS, 3'-conserved segment.



**Fig. 2.** Schematic representation of integrons from multidrug resistant *Escherichia coli* isolated in Korea. A, Integron (n=1 isolate) with *aadA2* gene cassette. B, Integrons (n=24 isolates) with *dfrA17* and *aadA5* gene cassettes. C, Integrons (n=5 isolates) with *dfrA12*, *orfF* and *aadA2* gene cassettes, 5'-CS, 5'-conserved segment, 3'-CS, 3'-conserved segment. *intI1*, integron integrase gene. LexA box, LexA repressor binding motif. *attI*, site specific recombination region of integron. *attC*, site specific recombination region of gene cassette. *qacEde/ta*, quaternary ammonium compound efflux gene. *sulI*, sulfonamide resistance gene.



**Fig. 3.** The DNA sequences of class 1 integrons and their gene cassettes from multidrug resistant *Escherichia coli* isolated in Korea. A, Integron with *aadA2* gene cassette containing the *aadA2* aminoglycoside adenylyltransferase gene and its *attC*. B, Integron with *dfrA17* gene cassette containing the *dfrA17* dihydrofolate reductase gene and its *attC*, and *aadA5* gene cassette containing the *aadA5* aminoglycoside adenylyltransferase gene and its *attC*. C, Integron with *dfrA12* gene cassette containing the *dfrA12* dihydrofolate reductase gene and its *attC*, *orfF* gene cassette and its *attC*, and *aadA2* gene cassette containing the *aadA2* aminoglycoside adenylyltransferase gene and its *attC*. The putative initiation codons and stop codons are in italics. R'', L'', L' and R' indicate imperfect inverted repeat sequences (underlined). RBS, ribosomal binding site.

### 유전자 카세트 *attC* 영역 분석

모든 카세트들의 *attC* 영역에는 *Int1*의 결합에 관여하는 7-8 염기 쌍의 불완전 역 반복 서열들(R'', L'', L', R')이 관찰되었다(Table 4와 Fig. 3). *attC* 영역의 bottom strand DNA의 불완전 역 반복 서열들이 intra-strand pairing되어 *attC* folding이 형성될 때 pairing을 이루지 않고 DNA helix 외부로 돌출되는 EHB들을 조사한 결과 L box에서는 1~2개씩의 EHB가 발견되었는데 G가 62.5%였고 C와 T가 37.5%였으며 C는 *dfrA17* 카세트에서만 관찰되었고 T는 *aadA5* 카세트에서만 관찰되었다(Table 4). Stem loop에서도 1~2개씩의 EHB가 발견되었는데 T가 84.4%로 가장 많았고 G가 15.6%, C가 7.8%였으며 G는 *dfrA12*와 *orfF* 카세트에서만 관찰되었고 C는 *dfrA12* 카세트에서만 관찰되었다(Table 4). Stem loop의 말단에 존재하는 variable terminal structure (VTS)들을 조사한 결과 ACG가 82.8%로 가장 많았고 ATG가 9.4%로서 *aadA2*에서만 관찰되었으며, AAG가 7.8%로서 *orfF*에서만 관찰되었다(Table 4).

### 인테그론의 promoter 영역과 LexA box 영역 분석

유전자 카세트 발현에 관여하는 Pc promoter 영역을 조사한 결과 모든 인테그론에서 5'-CS의 *int1* 유전자 서열 안에 promoter 기능에 필요한 -35서열과 -10서열이 관찰되어 전형적인 promoter 구조를 갖추고 있었다. *aadA2* 카세트를 보유한 A형 인테그론은 -35 (TTGACA)와 -10 (TAAACT)로 구성된 강력한 PcS promoter를 가지고 있었고, *dfrA12-orfF-aadA2* 카세트 대열을 가진 C형 인테그론은 -35 (TGGACA)와 -10 (TAAGCT)로 구성된 약한 PcW promoter를 가지고 있었으며, *dfrA17-aadA5* 카세트 대열을 가진 B형 인테그론은 PcW의 -35 (TGGACA)와 PcS의 -10 (TAAACT)으로 구성된 Pch1 hybrid promoter를 가지고 있었다(Table 5). 인테그론 *int1* 발현에 관여하는 Pint promoter 영역을 조사한 결과 거의 모든(96.7%) 인테그론이 -35 (TTGCTG)와 -10 (TAGACT)로 구성된 promoter를 가지고 있었으며 C형 인테그론 중의 하나에서 -35 (TTACTG) 서열이 관찰되었다(Table 5).



**Table 4.** DNA sequences<sup>a</sup> associated with site specific recombination of integron gene cassettes from *Escherichia coli* isolated in Korea

Cassette type	No. of cassette (n=64)	Inverted repeat sequences <sup>b</sup> in <i>attC</i> site						EHB <sup>c</sup>			VTS <sup>d</sup>
		R <sup>+</sup>	Space 1	L <sup>+</sup>	Stem (bp)	L <sup>-</sup>	Space 2	R <sup>-</sup>	L box	Stem	
<i>aadA2</i>	6	CAGATTG	TTAAG	CAAAGTTG	20	CGAATTG	AGGCCG	CAATCTG	G	T	ATG
<i>aadA5</i>	24	CGGATTG	AGCCG	CAAGTTG	18	CGAGTTG	ATACG	CAATCCG	G T	T	ACG
<i>dfrA12</i>	5	CCGATTG	GTAAG	GCAGTTG	50	GCAATGC	AGGTTG	CAATCGG	G	G C	ACG
<i>dfrA17</i>	24	CCGATTG	TTACG	CAACGTCG	94	CGACTTG	AATTG	CAATCGG	C	T	ACG
<i>orfF</i>	5	AAGATTG	TAAAG	CCAGTTG	20	CGAATGG	AGCGGG	CAATCGT	G	G	AAG

a, All the DNA sequences are bottom strand sequences of 3'→5' direction; b, Inverted repeat sequences R<sup>+</sup> pairs with R<sup>-</sup> and L<sup>+</sup> pairs with L<sup>-</sup> to form R and L boxes, respectively, and DNA folding occurs within the sequences between L<sup>+</sup> and L<sup>-</sup> to form stem loop; c, EHB, Extra helical bases generated in the folded *attC* site; d, VTS, Variable terminal structure of stem loop.

**Table 5.** DNA sequences associated with expression and SOS regulation of integrons from *Escherichia coli* isolated in Korea

Integron type	Cassette array	No. of isolate (n=30)	Pc promoter			RBS <sup>b</sup>		Pint promoter		LexA box <sup>c</sup>		
			Type <sup>a</sup>	-35	Space	-10		-35	space		-10	
A	<i>aadA2</i>	1	PcS	TTGACA	17	TAAACT	AGG	TTGCTG	17	TAGACT	+	
B	<i>dfrA17-aadA5</i>	24	PcH1	TGGACA	17	TAAACT	AGG	TTGCTG	17	TAGACT	+	
C1	<i>dfrA12-orff-aadA2</i>	4	PcW	TGGACA	17	TAAACT	AAG	AGC	AGG	17	TAGACT	+
C2	<i>dfrA12-orff-aadA2</i>	1	PcW	TGGACA	17	TAAACT	AAG	AGC	AGG	17	TAGACT	+

a, PcS with strong activity, PcW with weak activity, PcH1 with hybrid of PcS and PcW; b, ribosome binding sites in integron gene cassettes; c, SOS repressor LexA binding region with incomplete palindromic motif of 16 base pairs (CTGTCAAAAAAAAAACAG).

SOS repressor인 LexA가 결합함으로써 *intI1* 유전자 발현 조절에 관여하는 LexA box 존재여부를 조사한 결과, 실험한 모든 인테그론에서 5'-CS의 *intI1* 유전자 시작 codon과 Pint promoter의 -10서열 사이에 CTGTACAAAAAACAG 서열을 가지는 16 염기 쌍의 palindromic motif가 관찰되어 LexA 결합 서열이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 2와 Table 5).

## DISCUSSION

다 약제 내성 대장균, 특히 인테그론을 보유하고 있는 CTX-M형 ESBL 생산 대장균들은 집단 발생 혹은 산발적 감염을 일으키고 있으며 치료제 선택에 큰 어려움을 주고 있다 (2, 17). 이 연구에서도 다 약제 내성 대장균의 빈도가 64.1%로서 매우 높았으며 선행 연구들의 보고 (18, 19)와 유사하였고, 인테그론을 보유한 대장균은 30주(25.6%)로서 22~59%의 빈도를 보인 국내외 선행 연구들의 보고 (6, 20~23)와 유사하거나 다소 낮았는데, 국가나 지역별로 빈도에 차이가 있을 것으로 생각된다 (24, 25). *bla*<sub>CTX-M</sub>을 보유한 대장균의 인테그론 보유율이 *bla*<sub>CTX-M</sub> 비 보유 균에 비해 유의하게 높았으며( $p < 0.01$ ) 선행 연구들의 보고와 유사하였다 (26, 27). 인테그론 보유 균들은 30주 모두(100%)가 다 약제 내성 균이었고, imipenem과 tetracycline 이외의 모든 항균제에 내성을 나타내는 고도 내성균도 있었다. 인테그론 보유에 따른 다 약제 내성 빈도와 내성 항균제 수를 비교해 보면 인테그론 보유 균이 비 보유 균에 비해 다 약제 내성 빈도는 1.9배 이상 높았고( $p < 0.001$ ), 내성 항균제 수는 2.2배 많아서( $p < 0.001$ ) 인테그론 보유 균들의 다 약제 내성 율이 인테그론 비 보유 균에 비해 유의하게 높다는 것을 보여주며( $p < 0.001$ ), 선행연구들의 보고도 이와 유사하였다 (23, 25, 27).

대부분의 aminoglycoside계 항균제들과  $\beta$ -lactam계, quinolone계 및 sulfonamide계 항균제들에 있어서 인테그론 보유와 항균제 내성 율 증가와는 통계학적으로 유의한 관계가 있었다. Streptomycin과 gentamicin에 대한 인테그론 보유 균들의 내성 율은 인테그론 비 보유 균에 비해 2.3~2.4배 높았고( $p = 0.001 \sim 0.006$ ), MIC<sub>50</sub>도 4배 높았으며, kanamycin과 tobramycin에 대한 감수성 율은 인테그론 비 보유 균에 비해 1.3~1.7배 낮았고( $p = 0.004 \sim 0.037$ ), MIC<sub>50</sub>는 2배 높았으나, amikacin에는 인테그론 보유 균과 비 보유 균 사이에 내성 율이나 감수성 율에 차이가 없었으며 93~94%의 높은 감수성을 나타내었는데, 선행연구들도 이와 유사한 보고를 하였으나 항균제 별로 약간의 차이를 보였다 (20, 23, 28). 인테그론 보유 균들이 amikacin을 제외한 aminoglycoside계 항균제에 높은 내성 율을 보이는 이유는 대부분의 인테그론이 *aadA* 혹은 *aadB*와 같은 aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 보유하고 있기 때문으로 생각된다 (8, 23). 이 연구에서도 모든 인테그론이 *aadA2* 혹은 *aadA5* 등의 aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트를 보유하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 2). Aminoglycoside adenyl transferase는 streptomycin, spectinomycin, gentamicin, kanamycin, tobramycin 등은 파괴할 수 있으나 amikacin은 파괴할 수 없기 때문에 인테그론 보유 균들이 amikacin에 높은 감수성을 나타낸 것으로 생각된다 (8, 23). 인테그론 보유 균들은 sulfonamide계 항균제에도 인테그론 비 보유 균에 비해 sulfamethoxazole-trimethoprim 내성 율이 6.5배 높았고( $p = 0.000$ ), MIC<sub>50</sub>는 16배 이상 높았으며, 선행연구들도 이와 유사한 보고를 하였다 (20, 22, 28). 인테그론 보유 균들이 sulfonamide계 항균제에 높은 내성 율을 보이는 이유는 대부분의 인테그론이 *dhfrA* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 *su1* 유전자를 보유하고 있기 때문으로 생각된다 (6, 9). 이 연구에서도 거의 모든 인테그론이 *dhfrA12* 혹은 *dhfrA17* 등의 dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 *su1* 유전자를 보유하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 2). 그뿐 아니라 인테그론 보유 균들은 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, ampicillin 등의  $\beta$ -lactam계 항균제에 대한 내성 율도 인테그론 비 보유 균에 비해 1.6~15.2배 높았고( $p = 0.001 \sim 0.046$ ), MIC<sub>50</sub>도 4~32배 높았으며, 선행연구들의 보고와 유사하였으나 항균제 별로 약간의 차이를 보였다 (20, 23, 28). 인테그론 보유 균들이 cefotaxime을 비롯한 extended spectrum cephalosporin에 높은 내성 율을 보이는 이유가 인테그론이 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자 카세트를 보유하고 있기 때문인지 혹은 인테그론과 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자가 동일한 plasmid내에 위치하고 있기 때문인지 여부를 규명하기 위해 인테그론 카세트들의 염기서열을 분석한 결과 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자 카세트는 관찰되지 않았으며, *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자 보유 균 14주 중 13주(92.9%)가 인테그론과 함께 접합에 의해 피전달균으로 전달됨이 확인되어 인테그론과 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자가 동일한 plasmid내에 위치하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3와 Table 4). Imipenem에는 인테그론 보유 여부에 관계없이 실험한 모든 균이 비 내성이어서 고도 내성 대장균의 치료제로 효과가 있을 것으로 기대되나 인테그론 보유 균 중에서 imipenem에 비 감수성을 나타내는 균이 6주(20%)가 관찰되어서 자칫 남용하여 내성 균이 발생하지 않도록 하기 위하여 엄격한 사용 지침이 필요할 것으로 생각된다 (29). 인테그론 보유 균들은 nalidixic acid와 ciprofloxacin 등의 quinolone계 항균제에도 인테그론 비 보유 균에 비해 내성 율이 1.5~1.8배 높았고( $p = 0.000 \sim 0.046$ ), MIC<sub>50</sub>도 4~256배나 높았으며, tetracycline에도 내성 율이 1.8배 높았는데( $p = 0.046$ ), 선행연구들의 보고와 유사하였다 (20, 23, 28).

이 연구에서 인테그론 보유 균들은 분리 빈도가 높고 모두가 다 약제 내성 균으로서 임상에서 흔히 사용되는 대부분의 항균제에

내성을 가지고 있기 때문에 항균제 선택에 제한이 많을 것으로 생각된다 (17). 실제로 다 약제 내성 대장균, 특히 인테그론을 보유한 CTX-M 생산 대장균 감염 시 사용할 수 있는 항균제가 매우 제한적이어서, 비교적 효과가 우수한 imipenem이나 meropenem 등의 carbapenem계 항균제에 의존할 수 밖에 없는 상황이 초래된다 (17, 30). 그러나 carbapenem계 항균제 처방이 증가하게 되면 필연적으로 내성이 증가하게 되며, *Acinetobacter* 감염 치료에서 관찰된 바와 같이, imipenem에도 듣지 않는 고도 내성 균의 출현을 촉진 시키게 되어 인테그론을 보유한 CTX-M형 다 약제 내성 대장균 감염 시에 치료가 더욱 어려워지는 현상이 발생할 가능성이 높을 것으로 생각된다 (3, 31, 32).

항균제 내성의 확산에 중요한 역할을 하는 R plasmid는 염색체 외성 소형 환상 DNA로서 pili를 이용한 접합을 통해 타 세균으로 쉽게 전달되는 성질을 가지고 있다 (3, 4). 이 연구에서 인테그론 보유 균 30주 중 24주(80%)가 접합에 의해 피전달균으로 내성이 전달되어 R plasmid를 보유하고 있음을 확인하였으며 51~80%의 전달 율을 보인 선행 연구들의 보고와 유사하였다 (5, 19). 인테그론 보유 대장균에서 추출된 plasmid DNA들은 거의 대부분이 FIA, FIB, Frep 등의 multiple replicon을 가지고 있었으며 분자량이 120~170 Mega Dalton이었고 선행 연구들의 보고 (5, 19)와 유사하였다. R plasmid가 다양한 세균으로 전파 후 새로운 숙주 내에서 잘 적응하기 위해서는 plasmid가 광범위 숙주 역을 가져야 한다 (17, 33). FIA, FIB, Frep 등의 F계열의 replicon들은 각각 협소 범위 숙주 역을 갖고 있지만 한 plasmid내에 여러 개의 다양한 replicon들을 갖게 되면 숙주 역을 확장할 수 있게 된다 (33). 인테그론을 보유한 다 약제 내성 대장균에서 R plasmid가 타 세균으로 전파 후 새로운 숙주 내에서 잘 적응하고 있는 이유는, 하나의 R plasmid 안에 대장균 사이에 널리 받아들여지는 FIA, FIB, Frep 등의 안정적 replicon들이 여러 개 존재하여 숙주 역을 확장함으로써 가능하였을 것으로 생각된다 (33). 이상의 사실로 볼 때 인테그론을 보유한 CTX-M형 ESBL 대장균이 널리 확산된 이유는 multiple F replicon을 가진 접합 성 R plasmid에 의한 HGT가 이루어진 후 새로운 숙주 내에서 잘 적응할 수 있기 때문인 것으로 생각된다 (4, 5). R plasmid가 내성 유전자를 획득하는 주된 기전은 R plasmid상에 위치하고 있는 인테그론에 의한 내성 유전자 카세트 재조합이 대표적이다 (5~7). 이 연구에서는 30개의 인테그론 모두가 class 1 인테그론으로 분류되어, 임상 분리 균에서는 class 1 인테그론이 가장 흔하다는 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 9). 대부분의 class 1 인테그론은 2~3개의 유전자 카세트를 보유하고 있으며 최대 8개의 유전자 카세트를 가진 대장균도 보고된 바 있는데 이 연구에서도 1~3개(평균 2.1개)의 유전자 카세트를 보유하고 있어서 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 8, 9). 인테그론이 보유하고 있는 유전자 카세트 대열의 종류와 빈도를 분석하였는데 trimethoprim 내성 유전자인 *dfrA17* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 streptomycin과 spectinomycin 내성 유전자인 *aadA5* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트로 구성된 *dfrA17-aadA5* 카세트 대열을 가진 것이 24주(80.0%)로 가장 많았고, *dfrA12* dihydrofolate reductase 유전자 카세트와 *orfF* 유전자 카세트와 *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트로 구성된 *dfrA12-orfF-aadA2* 카세트 대열을 가진 것이 5주(16.7%)였으며, *aadA2* aminoglycoside adenyl transferase 유전자 카세트 1개를 가진 것이 1주(3.3%)로서 선행연구들의 보고와 유사하였다 (5, 8, 21, 22). *dfrA17-aadA5* 카세트 대열이나 *dfrA12-orfF-aadA2* 카세트 대열이 전세계적으로 가장 흔한 유행을 보이는 이유로서 의료환경 혹은 농업환경에서 이 유전자 카세트들이 내성을 지령하는 aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole 등의 항균제를 흔히 사용함으로써 항균제 선택 압의 증가로 인해 특정 카세트를 보유한 인테그론이 안정적으로 유지되도록 환경을 조성하고 있는 현실 때문으로 생각된다 (6, 9). 실험한 모든 인테그론들이 3'-CS에 quaternary ammonium compound류 소독제 내성 유전자인 *qacE-delta1*과 sulfonamide 내성 dihydropteroate synthase 유전자인 *sulI*를 갖고 있어서 카세트가 지령하는 여러 가지 항균제 내성에 추가하여 소독제 내성과 sulfonamide 내성도 지령하여 다 약제 내성을 나타내는 것으로 생각된다 (6, 8, 9).

인테그론과 유전자 카세트 사이의 재조합과 카세트 대열 재정렬은 IntI가 중요한 기능을 수행하며 카세트 말단에 위치하고 있는 site specific recombination 영역인 *attC*의 불완전 역 반복서열들이 IntI의 결합과 재조합에 중요한 역할을 한다 (6, 8, 9, 34). IntI가 *attC*를 인식할 때 불완전 역 반복서열들의 염기서열을 보고 인식하는 것이 아니고 역 반복서열들이 intra-strand pairing되어 *attC* folding이 일어나면서 형성되는 stem loop 모양의 DNA 2차구조가 중요하며, IntI에 의한 재조합 시에 DNA 두 가닥 중에서 주로 bottom strand에서 재조합이 일어난다는 사실이 최근에 보고되었다 (6, 9, 34). Bottom strand의 역 반복 서열 R"은 R'과 pairing하여 R box를 형성하고, L"은 L'과 pairing하여 L box를 형성하며, L"과 L' 사이의 서열은 stem loop를 형성하는데, L box와 stem loop영역에서는 완전한 pairing을 이루지 못하고 부분적으로 DNA helix 외부로 돌출되는 염기(EHB)들이 2~3개 발생하게 된다 (6, 9, 34). EHB들은 bottom strand에만 존재하는데 IntI으로 하여금 재조합 strand를 인식하게 하고, *attC*에 결합한 IntI를 안정화 시킴으로써 IntI의 기능에 중요한 영향을 미친다는 사실이 보고되었으나 *aacA7*, *ereA2*, *oxa2*, *VCR<sub>2/1</sub>* 등 몇몇 유전자 카세트에 관해서만 알려져 있고 국내에서 흔히 발견되는 *dfrA17-aadA5* 카세트나 *dfrA12-orfF-aadA2* 카세트의 EHB에 관한 보고는 없다 (6, 9, 34). 이 연구에서 분리된 인테그론 유전자 카세트에 있는 EHB의 종류를 조사한 결과 L box에서는 대부분이 G가 발견되어 선행연구들의 보고와 유사하였으나 (6, 34), *dfrA17* 카세트에서 C가 관찰되었고, *aadA5* 카세트에서는 T가 관찰되어 L box에서는 G 이외에도 다양한 염기들이 EHB로서 기능을 할 것으로 생각되었다. Stem loop에서는 대부분이 T가 관찰되었고

*dfrA12*와 *orfF* 카세트에서만 G가 관찰되었으며, *dfrA12* 카세트에서 C가 관찰되어 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 34). Stem loop의 말단에는 pairing을 이루지 못하고 외부로 돌출되는 다양한 크기의 VTS들이 형성되며 *attC* folding에 영향을 준다는 사실이 보고되었는데 (6, 34), 이 연구에서 인테그론 상에 VTS의 종류를 조사한 결과 대부분이 ACG로 구성된 소형 VTS였고 *aadA2*에서는 ATG가 관찰되었으며, *orfF*에서는 AAG가 관찰되어 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 34).

이 연구에서 분리된 인테그론의 유전자 카세트 발현에 관여하는 Pc promoter영역을 조사한 결과 PcH1 hybrid promoter와 *dfrA17-aadA5* 카세트 대열을 가진 B형 인테그론이 대부분(80.0%)이었고 PcW promoter와 *dfrA12-orfF-aadA2* 카세트 대열을 가진 C형 인테그론이 16.7%였으며 PcS promoter와 *aadA2* 카세트를 보유한 A형 인테그론은 3.3%에 불과하여 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 8~10).

IntI는 주변환경에 존재하는 유전자 카세트와 인테그론 사이의 재조합과 카세트 대열 내에서의 재결합과 카세트 삭제 등의 기능을 수행하며, *intI* 유전자의 발현은 Pint promoter에 의해 이루어진다 (6, 9, 10). 이 연구에서 Pint promoter 서열은 *intI* 유전자의 시작codon과 *attI* 사이에 위치하고 있었으며 -35 서열은 거의 대부분(96.7%)이 TTGCTG였으며 -10 서열은 모두가 TAGACT로 구성되어 있어서 선행연구들의 보고와 유사하였다 (6, 9, 10). 최근에 Pc promoter와 Pint promoter는 서로 전사를 방해하는 상충관계이므로 PcH1이나 PcW와 같이 Pc promoter의 강도가 약한 인테그론 일수록 integrase의 발현이 증가되어 카세트 대열의 유연성이 더 커지기 때문에 환경에 더 잘 적응하게 되며, 그 결과 더 흔한 유행을 보인다는 사실이 보고되었는데, 이 연구에서도 흔한 유행을 보이는 카세트 대열을 보유한 인테그론들이 PcH1이나 PcW와 같이 약한 Pc promoter를 가지고 있는 것과 일치되었다 (6, 10, 11). 그리고 인테그론 *intI* 유전자 발현이 stress 환경에 적응하기 위한 SOS반응의 master repressor인 LexA에 의해 조절된다는 사실이 보고되어 다 약제 내성기전연구와 새로운 치료제 개발에 있어서 관심을 끌고 있다 (6, 9, 35, 36). LexA는 SOS 반응에 관여하는 유전자들의 promoter 근처에 있는 LexA box에 붙어 SOS반응을 억제하고 있다가 stress상황이 초래되면 RecA-ssDNA복합체의 작용으로 LexA 단백질의 자가 분해를 촉진시킴으로써 SOS반응 유전자들이 derepress되어 SOS반응이 이루어지게 된다 (6, 9, 35). 그리고 fluoroquinolone이나 trimethoprim, aminoglycoside 등의 항균제가 LexA 저해를 통하여 SOS 반응을 촉진시킴으로써 인테그론 활성화, 돌연변이 증가, 항균제 내성화 촉진 등을 유발하며 (37, 38), 접합이나 형질전환 등의 HGT에 의해 SOS반응 촉진, 인테그론 IntI기능 증가 등이 유발된다는 사실이 보고되었다 (6, 9, 39). 이와 같이 인테그론의 LexA box는 항균제나 HGT 등을 포함한 인테그론 유전자 카세트 획득 및 재배열 조절과 다 약제 내성 증가에 관련된 많은 인자들이 작용하는 핵심적 조절 점이라는 사실이 최근에 보고되었으나 국내 분리 인테그론에 대한 LexA box에 관한 보고는 없다 (6, 9, 35, 39). 이 연구에서 LexA box를 조사한 결과, 실험한 모든 인테그론에서 LexA box가 확인되었고 palindrome 구조를 가지고 있었으며 선행연구들의 보고와 유사하여 LexA box는 대장균에서 매우 보존적인 서열인 것으로 생각되었다 (6, 9, 35). 이러한 사실에 입각하여 LexA를 과 발현하는 박테리오파지를 이용하여 세균의 SOS반응을 저해함으로써 항균제 감수성을 증가시키고자 하는 연구가 시도되었는데 (36), SOS반응 저해제를 항균제의 보조제로 사용하여 항균효과를 높이고 내성 균 출현을 최소화하는 새로운 치료법 개발에 응용될 수 있어서 향후 이 분야에 대한 연구가 필요하다 (36).

이상의 사실을 종합하면, 대장균에 다 약제 내성이 흔한 이유로서 다양한 내성유전자를 채집하는 class 1 인테그론을 보유한 대장균이 흔하고, 인테그론이 multiple F replicon을 가지는 대형 R plasmid에 위치하고 있어서 내성 확산이 용이하며, 의료환경 혹은 농업환경에서 항균제 선택 압의 증가로 인해 인테그론이 안정적으로 유지되는 것으로 생각된다 (6, 38, 40). 그리고 항균제 혹은 HGT 자체가 SOS반응을 촉진시킴으로써 인테그론 활성화, 돌연변이 증가 및 항균제 내성화 촉진을 유발하는 등의 여러 가지 요인이 복합적으로 작용함으로써 다 약제 내성 대장균의 확산이 지속되고 있는 것으로 생각되며 (6, 38, 40), 대부분의 인테그론이 PcW나 PcH1 promoter를 보유하고 있어서 IntI의 발현 증가로 카세트 대열의 유연성이 커지게 되고 환경에 잘 적응하여 더 흔한 유행을 보이는 것으로 생각된다 (6, 10, 11). 이 연구는 다 약제 내성의 주축을 이루고 있는 인테그론 보유 대장균이 보유한 인테그론과 유전자 카세트의 유전적 기반을 밝힘으로써 특정 유전자 카세트 대열을 보유한 인테그론이 더 흔한 유행을 보이는 분자적 배경 해석과 내성 유전자 카세트 획득과 재배열의 분자 기전 이해 및 인테그론 보유 대장균 증가를 최소화하기 위한 대책수립에 도움을 줄 것으로 기대된다 (6, 9, 34, 35).

## REFERENCES

- 1) Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1-14.
- 2) Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist* 2011;17:83-97.
- 3) Yang YY, Suh MH. Diversity of genetic environment of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and antimicrobial susceptibility in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated in Korea. *J Bacteriol Virol* 2019;49:95-114.
- 4) Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303:298-304.
- 5) Sunde M, Simonsen GS, Slettebakk JS, B  ckerman I, Norstr  m M. Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs. *PLoS One* 2015;10:e0128797.
- 6) Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation on demand. In: Craig NL, editor. *Mobile DNA III*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.139-61.
- 7) Hickman AB, Dyda F. Mechanisms of DNA transposition. In: Craig NL, editor. *Mobile DNA III*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.531-53.
- 8) Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:757-84.
- 9) Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:257-77.
- 10) Jov   T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy MC. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS genet* 2010;6:e1000793.
- 11) Vinu   L, Jov   T, Torres C, Ploy MC. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:526-9.
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th ed. Wayne: CLSI Press, 2014.
- 13) Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
- 14) Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981;145:1365-73.
- 15) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63:219-28.
- 16) Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406-15.



- 17) El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:113-22.
- 18) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- 19) Ruiz del Castillo B, Vinué L, Román EJ, Guerra B, Carattoli A, Torres C, *et al.* Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMC Microbiol* 2013;13:84.
- 20) Li B, Zhao ZC, Wang MH, Huang XH, Pan YH, Cao YP. Antimicrobial resistance and integrons of commensal *Escherichia coli* strains from healthy humans in China. *J Chemother* 2014;26:190-2.
- 21) Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:639-44.
- 22) Shin HW, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC, Koo SH. Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in gram-negative bacilli. *J Microbiol Biotechnol* 2015;25:137-42.
- 23) 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.
- 24) Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, *et al.* The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008;190:5095-100.
- 25) Yu HS, Lee JC, Kang HY, Jeong YS, Lee EY, Choi CH, *et al.* Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:445-50.
- 26) Chen T, Feng Y, Yuan JL, Qi Y, Cao YX, Wu Y. Class 1 integrons contributes to antibiotic resistance among clinical isolates of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol* 2013;31:385-9.
- 27) Seo KW, Lee YJ. Prevalence and characterization of  $\beta$ -lactamase genes and class 1 integrons in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from chicken meat in Korea. *Microb Drug Resist* 2018.
- 28) Gu B, Pan S, Wang T, Zhao W, Mei Y, Huang P, *et al.* Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of *Enterobacteriaceae* in China. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:529-33.
- 29) Levy-Hara G, Amabile-Cuevas CF, Gould I, Hutchinson J, Abbo L, Saxinger L, *et al.* "Ten commandments" for the appropriate use of antibiotics by the practicing physician in an outpatient setting. *Front Microbiol* 2011;2:230.
- 30) Bush K. Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010;13:558-64.
- 31) Cantón R, Morosini M. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:977-91.



- 32) Kuo HY, Chang KC, Kuo JW, Yueh HW, Liou ML. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 2012;39:33-8.
- 33) Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2518-29.
- 34) Bouvier M, Ducos-Galand M, Loot C, Bikard D, Mazel D. Structural features of single-stranded integron cassette *attC* sites and their role in strand selection. PLoS genet 2009;5:e1000632.
- 35) Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Guerin E, Da Re S, González-Zorn B, *et al.* Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. Mob DNA 2011;2:6.
- 36) Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:4629-34.
- 37) López E, Blázquez J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3411-5.
- 38) Hocquet D, Bertrand X. Metronidazole increases the emergence of ciprofloxacin- and amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by inducing the SOS response. J Antimicrob Chemother 2014;69:852-4.
- 39) Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. PLoS Genet 2010;6:e1001165.
- 40) Strugeon E, Tilloy V, Ploy MC, Da Re S. The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. MBio 2016;7.