

Loss of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{IMP-1} during the Storage of Gram-Negative Bacilli, Antimicrobial Susceptibility of the Gene-Lost Strain, and Location of the Gene in the Cell

Youngsik Lim¹, Yangsoon Lee^{1,2}, Younghee Seo¹, Jong Hwa Yum³,
Dongun Yong¹, Kyungwon Lee¹, Yunsop Chong¹

¹Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, ²Department of Laboratory Medicine, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Goyang, ³Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui University, Busan, Korea

Background: Gram-negative bacilli can be stored in cystine tryptic agar (CTA) at room temperature for over 1 year, but we experienced a loss of imipenem resistance among VIM-2-producing isolates. The aims of this study were to determine the frequency of loss of IMP-1 and VIM-2 genes during storage in CTA at room temperature and to document any change in the MIC of antimicrobial agents and the location of the gene.

Methods: Bacteria were isolated from clinical specimens at Severance Hospital collected from 1995-2000. Modified Hodge and double disk synergy tests were performed for screening of MBL-production isolates, and *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} were detected by PCR. Loss of resistance was tested in CTA at room temperature. PFGE and hybridization using a *bla*_{VIM-2} probe were carried out to determine the location of the VIM-2 gene.

Results: When VIM-2- and IMP-1-producing strains of eight *P. aeruginosa* and two *Acinetobacter* spp. were

stored in CTA at room temperature, some isolates lost imipenem resistance after 3 days and 90% lost resistance after 15 weeks. Loss of resistance genes resulted in a decrease of the MIC of imipenem from 32-128 µg/mL to 0.5-8 µg/mL for *P. aeruginosa*, and from 32 µg/mL to 0.25-4 µg/mL for *Acinetobacter* spp. Hybridization of I-Ceul and S1-digested and PFGE suggested that VIM-2 genes are located on approximately 50-100 kb or 400 kb plasmids.

Conclusion: Isolates may lose resistance genes when stored in CTA at room temperature. Therefore, it is necessary for MBL-production tests including the Modified Hodge test and double disk synergy test and detection of MBL genes. (Ann Clin Microbiol 2013;16: 120-125)

Key Words: Carbapenems, Metallo-β-lactamase, Resistance loss

INTRODUCTION

Carbapenem 항균제는 그람음성 막대균이 생성하는 여러 가지 β-lactamase에 안정하여 다른 β-lactamase에 내성인 세균에 의한 감염증에 유용하게 사용되어 왔다. 그러나 carbapenem의 사용이 많아짐에 따라서 carbapenem 내성 세균이 출현 및 확산되었다. 그람음성 막대균의 carbapenem 주요 내성 기전은 carbapenemase 효소의 생성이고, class A와 class B carbapenemase 효소들이 있다[1]. Class B에 속하는 metallo-β-lactamase (MBL)은 Zn²⁺이 있어야 활성을 나타내는 효소로 clavulanic acid나 tazobactam으로 저해되지 않는다. MBL 중에서는 IMP형과 VIM

형 β-lactamase를 생성하는 세균이 감염을 흔히 일으켜 임상적으로 중요하다[2,3].

세균이 내성유전자를 잃지 않게 장기간 보존하기 위해서는 동결건조나 냉동방법을 이용한다. 그러나, 시험 중에 비교적 단기간 보존을 위해서는 이러한 방법이 불편하다. 반고체 Casein hydrolysate agar에서 그람음성 막대균은 실온에서 1년 이상 생존한다. 이 배지와 조성이 비슷한 반고체 cystein tryptic agar (CTA)에서도 장기간 생존이 가능하다. 또한 세균은 보존 중에 plasmid를 소실할 수 있음이 알려져 있다[4]. Takahashi 등[5]은 병원에서 분리된 *A. baumannii* 균주들을 약 1년 동안 실온에 보관 후, imipenem 내성 *A. baumannii* 28균주 중 19균주가 감

Received 20 February, 2013, Revised 8 March, 2013, Accepted 8 March, 2013

Correspondence: Kyungwon Lee, Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 82-2-2228-2446, (Fax) 82-2-313-0908, (E-mail) leekcp@yuhs.ac

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© 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>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

수성으로 변한 것을 보고하였다. Lim 등[6]도 VIM-2 유전자를 보유한 imipenem 비감수성 균주를 CTA에서 실온에 보관 후 일부 균주가 imipenem에 감수성으로 바뀌었고, 그 원인은 내성을 소실하였기 때문임을 보고한 바 있다.

IMP 및 VIM형 MBL 생성균은 내성 유전자 cassette가 class 1 integron 중에 삽입되어 있고 이것은 다시 transposon에 위치하여 다른 세균의 염색체 또는 plasmid로 전달될 수 있다[7,8]. 이들 중 integron이 plasmid에 위치하는 것은 접합에 의해서도 다른 세균에 전달될 수 있음을 뜻하고, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* 등 여러 균종에서 IMP 및 VIM 효소 생성균이 관찰되었다[2,9-11].

본 연구에서는 VIM-2 및 IMP-1형 MBL 생성균을 대상으로 실온 보관에 따른 IMP-1 및 VIM-2 유전자의 소실 빈도와 유전자 소실에 따른 항균제 최소 억제 농도의 변화를 밝히고자 하였다. 또한, 실온 보관 후 쉽게 소실되는 VIM-2 유전자의 위치를 확인하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 시험세균 및 항균제 감수성 시험

시험 세균은 1995-2000년에 세브란스 병원에 내원한 환자에서 분리된 세균을 대상으로 하였다. 균종 동정을 위해서는 전통적인 생화학적 방법 또는 ATB 23 GN System (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)을 사용하였다. 항균제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 디스크 확산법과 한천희석법으로 시험하였다[12]. 항균제는 imipenem (Merck/Sharp & Dohme, Rahway, NJ, USA), meropenem (Sumitomo, Tokyo, Japan), ceftazidime 및 clavulanic acid (GlaxoSmithKline, Greenford, United Kingdom), piperacillin (Wyeth, Pearl River, NY, USA), cefotaxime (Aventis, Frankfurt, Germany), cefepime 및 aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA)을 사용하였다. 정도관리를 위해서는 *E. coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하였다. MBL 유전자 소실의 감수성에 대한 영향을 보기 위해서는 carbapenem 내성인 균주와 내성을 잃은 균주 쌍을 대상으로 최소억제농도를 한천희석법으로 시험하였다.

2. MBL 유전자 검출시험

Imipenem 내성 균주 중 MBL 생성균을 선별하기 위해서 modified Hodge 시험과 double disk synergy 시험을 하였다[13, 14]. *bla*_{IMP-1}과 *bla*_{VIM-2} 유전자를 PCR로 검출하였다[10,15].

3. Imipenem 내성 소실 빈도 시험

MBL 생성균을 실온과 -70°C 두 곳에 각각 보관하였다. 실온 보관 중 imipenem 내성이 감수성으로 변한 균주가 생긴 경

우 냉동 보존한 같은 균주를 MacConkey agar에 계대배양하고 imipenem에 내성임을 확인한 후, CTA 시험관에 접종하고 실온에 보관하였다. 3일, 1주일, 2주일, 4주일 및 15주일 경과 후에 CTA에서 세균을 채취하여 식염수에 부유시킨 후 10배수 (10^{-1} - 10^{-7}) 단계 희석하였다. 각 희석액 100 μ L를 Mueller-Hinton (MH) agar에 접종하고 18-24시간 동안 35°C에 배양한 후 독립된 집락이 30-300개 생긴 평판배지에서 집락 100개를 선택하여 imipenem 감수성을 디스크확산법으로 시험하여 감수성과 내성 집락의 비율을 계산하였다.

4. PFGE 및 Hybridization

I-CeuI 효소, S1 endonuclease로 각각 처리한 plug로 pulse-field gel electrophoresis (PFGE)를 시행하였다[16]. 전기 영동한 agarose gel에 있는 DNA를 nylon membrane (BioRad, Hercules, CA, USA)에 옮기고, DIG DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 사용하여 표지한 *bla*_{VIM-2}와 hybridization 실험을 하였다[16].

RESULTS

1. Imipenem 내성 소실을

*bla*_{VIM-2} 양성 *P. aeruginosa* 54주, *P. putida* 10주, *Acinetobacter* spp. 16주 그리고, *bla*_{IMP-1} 양성 *Acinetobacter* spp. 4주를 CTA 시험관에 접종한 후 균주에 따라서 4개월-1년간 실온에 보존한 후에 imipenem 내성 소실을 디스크 확산법으로 선별하였다(Table 1). Imipenem에 내성인 *bla*_{VIM-2} 양성 *P. aeruginosa* 54주 중 4주는 실온보관 후 imipenem 감수성으로 변하였다. *bla*_{VIM-2} 양성인 *P. aeruginosa* 15주, *P. putida* 1주, *Acinetobacter* spp. 1주와 *bla*_{IMP-1} 양성 *Acinetobacter* spp. 1주는 imipenem에 큰 억제대를 보였으나, 억제대 안에서 다수 혹은 소수의 집락이 관찰되었다. 억제대 안에 있는 집락 중에서, imipenem에 내

Table 1. Detection of cells with partial or complete loss of MBL gene during storage in CTA tubes at room temperature*

Organism (No. of isolates tested)	MBL gene	No. of isolates which lost MBL gene		
		Partial [†]	Complete	Total
<i>P. aeruginosa</i> (54)	<i>bla</i> _{VIM-2}	15	4	19 (35.1)
<i>P. putida</i> (10)	<i>bla</i> _{VIM-2}	1	0	1 (10.0)
<i>Acinetobacter</i> spp. (16)	<i>bla</i> _{VIM-2}	1	0	1 (6.3)
<i>Acinetobacter</i> spp. (4)	<i>bla</i> _{IMP-1}	1	0	1 (25.0)
Total (84)		18	4	22 (26.1)

*Storage time was approximately 4-12 months depending on isolate; [†]Isolates which lost partially MBL gene showed heterogeneous growth within the zone of inhibition in disk diffusion test using imipenem.

성이라고 생각되는 디스크의 가까운 부위 집락과 imipenem에 감수성이라고 생각되는 억제대 변연부위의 집락을 각각 분리하였다. 순 배양한 imipenem 내성 균주 모두에서는 *bla*_{VIM-2} 혹은 *bla*_{IMP-1} 유전자가 PCR로 검출되었다. 그러나 감수성으로 변한 균주 모두는 double disk synergy 시험 음성이고, MBL 유전자가 검출되지 않았다. 따라서 감수성으로 변한 것은 MBL 유전자 소실 때문임이 확인되었다.

2. *bla*_{VIM-2} 및 *bla*_{IMP-1} 소실 빈도

MBL 유전자가 소실되었던 균주 중 *P. aeruginosa* 8균주와 *A. baumannii* 2균주를 선택하여 MBL유전자 소실빈도를 시험

하였다. 균주를 CTA 시험관에 접종하여 실온에 두고 내성 소실을 디스크 확산법으로 시험하였다. 시험한 10균주 중 3일 후에는 4균주가, 1주일 후에는 5균주가, 2주일 후에는 7균주가, 4주일 후에는 8균주가, 그리고 15주일 후에는 9균주의 일부 세포가 내성을 소실하였다(Table 2).

기간별 내성소실 집락의 비율은 *P. aeruginosa* 8균주는 3일 후에는 0-5%가, 1주일 후에는 0-18%가, 15주일 후에는 0-92%가 내성을 소실하였다. *bla*_{IMP-1} 또는 *bla*_{VIM-2}를 가졌던 *A. baumannii* 2균주는 3일에 0-1% 세포가, 1주일에 3-8%가, 15주일에 33-55%가 내성을 소실하였다(Table 2).

Table 2. Proportion of cells which lost imipenem resistance during storage in CTA tubes at room temperature

Isolate no.	Species	MBL type	Colonies (%) with loss of resistance at*				
			3 days	1 week	2 week	4 week	15 week
1	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	3	6	7	11	28
2	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	0	0	2	9	9
3	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	0	0	1	15	92
6	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	5	18	6	15	20
7	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	1	11	5	7	19
8	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	0	0	0	1	2
9	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	0	0	0	0	1
12	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	0	0	0	0	0
13	<i>A. baumannii</i>	VIM-2	1	3	3	5	33
5	<i>A. baumannii</i>	IMP-1	0	8	5	8	55

*One hundred colonies were tested for each isolate.

Table 3. Comparison of MICs of antimicrobial agents for MBL-gene positive isolates and MBL-gene lost counterpart strains

Antimicrobial agents	MBL gene	MIC (μg/mL) for:									
		<i>P. aeruginosa</i>								ACI	
		1	2	3	6	7	8	9	12	13	5
IMP	Positive	64	128	128	32	128	32	32	32	32	32
	Negative	4	8	0.5	0.5	0.5	1	1	2	4	0.25
MER	Positive	16	>128	>128	8	>128	32	32	8	16	32
	Negative	0.5	NT	8	1	8	1	0.5	0.5	4	0.5
PIP	Positive	128	>256	256	>256	>256	>256	256	64	256	256
	Negative	2	NT	>256	256	>256	16	8	64	256	32
CAZ	Positive	>128	128	>128	128	128	>128	128	64	64	128
	Negative	2	NT	4	4	4	4	2	16	16	4
CAZ-CLV	Positive	>128	128	>128	128	128	>128	128	64	64	128
	Negative	2	NT	4	4	4	4	4	16	8	4
CTX	Positive	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
	Negative	16	NT	32	64	32	32	16	64	16	16
FEP	Positive	64	64	64	64	32	64	64	32	16	128
	Negative	8	NT	8	16	16	16	16	16	8	8
AZT	Positive	16	32	16	16	16	16	8	32	8	4
	Negative	4	NT	16	16	16	16	8	32	16	4

Abbreviations: ACI, *Acinetobacter* spp.; IMP, imipenem; MER, meropenem; PIP, piperacillin; CAZ, ceftazidime; CAZ-CLV, ceftazidime-clavulanic acid; CTX, cefotaxim; FEP, cefepim; AZT, aztreonam; NT, not tested.

3. *bla*_{VIM-2} 및 *bla*_{IMP-1} 소실로 인한 imipenem의 MIC 저하

*bla*_{VIM-2} 및 *bla*_{IMP-1} 유전자를 가진 *P. aeruginosa* 8균주와 *A. baumannii* 2균주 및 이 균주로부터 유래된 내성유전자를 소실한 균주에 대한 β -lactam계 항균제의 MIC를 비교하였다 (Table 3, 4). MBL 양성균주에 대한 imipenem의 MIC 범위는 32-128 μ g/mL였고, MBL 유전자 소실 균주에 대해서는 0.5-8 μ g/mL로 낮아졌다. MBL 유전자 양성 균주 모두는 imipenem에 내성이었으나, MBL 유전자 소실균주는 감수성인 균주가 90%, 중간인 균주가 10%였다. MBL 유전자 양성인 균주에 대한 meropenem의 MIC범위는 8-128 μ g/mL였고, MBL 유전자 소실 균주에 대해서는 0.5-8 μ g/mL로 낮아졌다.

4. *bla*_{VIM-2}의 위치

*bla*_{VIM-2} 양성인 *P. aeruginosa* 8균주의 DNA를 I-CeuI 효소로 절단한 후, 16S rRNA 유전자 probe와 *bla*_{VIM-2} probe와 각각 교잡반응 시험을 하였다. *bla*_{VIM-2} probe는 6균주에서는 약 50-100 kb 위치에서, 2균주는 약 400 kb에서 양성되었는데, 이들은 16S rRNA 유전자 probe 양성 밴드와 위치가 달랐다(Fig. 1). S1 효소로 처리한 시험에서는 3균주에서는 약 50 kb 위치에서, 2균주는 400 kb에서 양성되었고, 나머지 3균주에서는 양성밴드가

관찰되지 않았다(Fig. 1).

DISCUSSION

본 연구에서는 VIM-2 또는 IMP-1 생성균을 CTA에서 실온에 4개월-1년간 보관한 후 많은 균주들이 일부 또는 전 세포가 imipenem 내성을 잃고, 내성을 잃은 세포에서는 내성 유전자가 소실됨을 확인할 수 있었다. 보관 기간에 따른 내성 소실률을 알아보기 위해 *bla*_{VIM-2} 혹은 *bla*_{IMP-1} 보유 10균주를 실온에 보관한 시험에서, 3일 후에는 40% 균주의 일부 세포가, 15주일 후에는 90% 균주의 일부 세포가 감수성으로 변화하였다. 각 균주에서 감수성으로 변한 세포의 비율은 균주에 따라서 현저히 달라서 15주일 후까지의 비율은 VIM-2 생성균 9주의 경우는 0-92%였고, IMP-1 생성균 1주는 55%였다. 이 결과는 VIM-2 또는 IMP-1 생성균들이 실온에 보관할 때 이들 내성 유전자를 쉽게 소실함을 뜻하며 따라서 실온에 보관했던 균주로 감수성이나 유전자시험을 할 때는 우선 imipenem 감수성이 변하지 않았는지 확인하는 것이 중요하다. Takahashi 등[5]은 *Acinetobacter* spp.가 배양된 Casitone medium을 실온에 보존 후에 특히 IMP 유전자를 쉽게 소실하였음을 보고하였다.

VIM-2 혹은 IMP-1 유전자를 가진 *P. aeruginosa* 8균주와 *A. baumannii* 2균주에 대한 imipenem의 MIC 32-128 μ g/mL로 다양하였음은 MBL 이외의 내성 요인 때문이었을 것으로 생각한다. 이들 VIM-2 혹은 IMP-1 생성 세균이 내성유전자를 소실한 후에는 imipenem이나 meropenem의 MIC가 현저히 낮아졌다. 그러나 MIC 감소 정도가 균주에 따라서 imipenem은 0.25-8 μ g/mL, meropenem은 0.5-8 μ g/mL로 차이가 컸었는데 이는 porin의 상태와 항균제 유출계 발현의 차이 때문이었을 것으로 추정된다. 특히 meropenem의 MIC가 8 μ g/mL인 2 균주가 있었는데 이는 항균제 유출 펌프의 고도 발현 때문일 것으로 추정된다. Imipenem의 MIC는 OprD porin의 소실로 높아지고, meropenem의 MIC는 MexAB-OprM 유출계의 과도 발현으로 높아짐

Table 4. Effect of MBL gene loss on the susceptibility to imipenem and meropenem

Antimicrobial agents	Strain (No. of isolated)	MIC range (μ g/mL)	% of isolates		
			Susceptible	Intermediate	Resistant
IMP	Isolate (10)	32-128	0	0	100
	MBL lost (10)	0.5-8	90	10	0
MER	Isolate (10)	8->128	0	22	78
	MBL lost (10)	0.5-8	78	22	0

Abbreviations: IMP, imipenem; MER, meropenem.

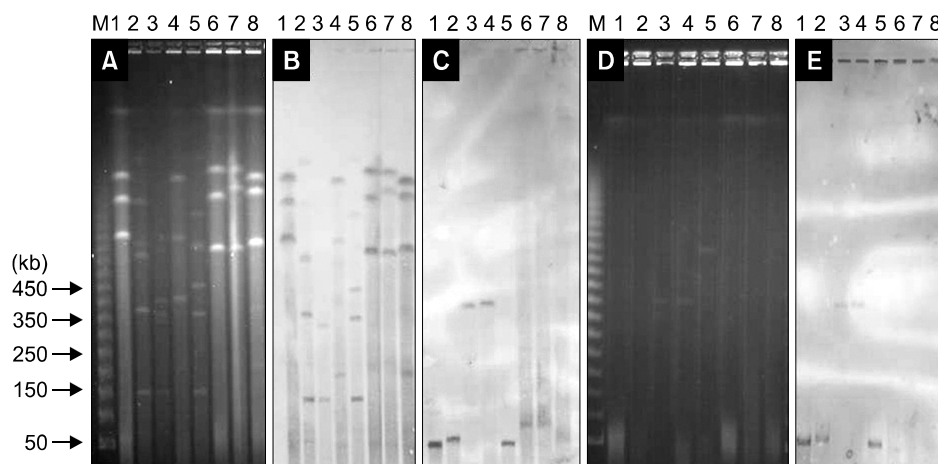


Fig. 1. Pulsed field gel electrophoresis of whole genomic DNA of *P. aeruginosa* isolates digested with I-CeuI (A), and S1 nuclease (D). Southern blot hybridization with 16S rRNA gene probes (B) and *bla*_{VIM-2} gene probe (C and E). Lanes 1 to 8, whole genomic DNA from isolates no. 1-3, 6-9 and 12 *P. aeruginosa*; lane M, lambda ladder (Bio-Rad) as a marker (kb).

이 보고되었다[17-19]. 이 실험 결과로는 실온에 보존했던 균주가 내성유전자를 소실하였음을 모르고, 감수성 시험을 하면 그 MIC를 내성 균주의 것으로 오인할 수 있으며, imipenem의 MIC가 8 $\mu\text{g/mL}$ 면 MBL 유전자 보유로 잘못 판단할 수 있으므로 내성소실 여부를 MIC 수준 시험만으로는 판단할 수 없다고 하겠다. 따라서 다른 성상을 시험하기 전에 실온에 보존했던 균주와 분리 당시 균주의 항균제 디스크 억제대의 지름이 비슷하지 않거나 억제대의 모양이 두 가지 세균이 섞인 것이 의심스러울 때는 modified Hodge법과 double disk synergy법으로 MBL생성을 확인하고 *bla*_{VIM-2} 혹은 *bla*_{IMP-1} 보유를 확인해야 할 것이다.

I-Ceul으로 절단한 염색체 DNA hybridization한 결과 genomic DNA가 아닌 다른 위치에서 band가 양성 반응을 보였고, plasmid를 절단하는 S1효소처리 결과에서도 비슷한 크기의 band가 양성반응을 보여서 *bla*_{VIM-2} 유전자가 plasmid에 위치한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 접합에 의한 내성의 전달 및 내성의 소실은 VIM-2 내성유전자가 위치한 plasmid의 획득이나 소실 때문으로 판단된다.

결론적으로, VIM-2 및 IMP-1 생성 *Pseudomonas* spp. 및 *Acinetobacter* spp. 균주 중에는 실온에 보존 시 내성 유전자를 빠르게 소실하는 것이 있다. 따라서, 실온에 보관했던 균주로 유전자 검출이나 감수성 시험을 할 때는 MBL 생성 선별시험 및 MBL 유전자 보유를 확인한 후에 사용하여야 할 것이다.

REFERENCES

- Livingstone D, Gill MJ, Wise R. Mechanisms of resistance to the carbapenems. J Antimicrob Chemother 1995;35:1-5.
- 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.
- Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO, et al; KONSAR Group. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. Yonsei Med J 2009;50:335-9.
- Dale J. Extrachromosomal Inheritance In: Dale JW, ed. Molecular Genetics of Bacteria. 2nd ed, Chichester, England; John Wiley & Sons, 1994:133-61.
- Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M, Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. J Clin Microbiol 2000;38:526-9.
- Lim Y, Yong D, Yum JH, Lee K, Chong Y. Difficulties in the detection of resistance gene and the determination of imipenem resistance of the metallo-beta-lactamase producing gram-negative bacilli. 42nd Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Abstr 2002;D-530;139.
- 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 *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1612-5.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Informational Supplement; Approved Guidelind. Document M100-S14. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
- 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-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003;41:4623-9.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7:88-91.
- 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.
- Sambrook J and Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY); Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Köhler T and Pechère C. In vitro selection of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2001;7(S):7-10.
- Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomás JM, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3332-5.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol 2000;3:489-95.

=국문초록=

그람음성 막대균 보존 중 *bla*_{VIM-2} 및 *bla*_{IMP-1} 유전자의 소실, 소실 균주의 항균제 감수성 및 유전자의 위치

¹연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소, ²국민건강보험 일산병원 진단검사의학과,
³동의대학교 임상병리학과

임영식¹, 이양순^{1,2}, 서영희¹, 염종화³, 용동은¹, 이경원¹, 정윤섭¹

배경: 그람음성 막대균은 반고체 Casein hydrolysate agar 및 이 배지와 조성이 비슷한 반고체 cystine tryptic agar (CTA)에 배양하여 실온에 보존하면 1년 이상 생존한다. 그러나 CTA에서 배양한 *bla*_{VIM-2} 유전자 보유 세균을 실온에 보관 후에 imipenem 내성을 소실하는 균주가 있다. 국내에서 분리된 VIM-2 및 IMP-1 생성균을 대상으로 실온 보관에 따른 이들 유전자의 소실 빈도와 유전자 소실에 따른 항균제 최소억제농도의 변화 및 이들 유전자의 위치를 규명하고자 하였다.

방법: 1995-2000년에 세브란스병원 내원 환자의 검체에서 분리된 세균을 대상으로 하였다. MBL 생성 균주는 modified Hodge 시험과 double disk synergy 시험으로 선별하고, *bla*_{IMP-1}과 *bla*_{VIM-2} 유전자를 PCR로 검출하였다. 대상균주를 CTA 시험관에 접종 및 배양하여 실온에 보관하고 경과 일 수에 따른 내성소실을 시험하였다. VIM-2 유전자 위치 확인을 위해 PFGE 및 hybridization를 시행하였다.

결과: VIM-2 및 IMP-1 생성 *P. aeruginosa* 8균주와 *A. baumannii* 2균주를 CTA 실온에서 보관하였을때, 3일 후에 내성유전자를 소실한 균주가 있었고, 15주일 후에는 90%의 균주가 내성유전자를 소실하였다. *bla*_{VIM-2} 혹은 *bla*_{IMP-1} 유전자를 소실한 균주에 대한 imipenem의 MIC범위는 *P. aeruginosa*의 경우 32-128 µg/mL에서 0.5-8 µg/mL로, *A. baumannii*의 경우 32 µg/mL에서 0.25-4 µg/mL로 낮아졌다. *bla*_{VIM-2} 유전자는 균주에 따라서 약 50-100 kb와 약 400 kb의 plasmid에 위치하였다.

결론: 실온에서 보존된 균주는 시간의 경과에 따라서 차츰 내성 유전자를 소실하므로, 실온에 보관했던 균주를 사용한 연구를 할 때에 modified Hodge test와 double disk synergy 시험과 같은 MBL생성 선별시험 및 MBL 유전자 보유를 확인하여야 한다. [Ann Clin Microbiol 2013;16:120-125]

교신저자 : 이경원, 120-752, 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소
Tel: 02-2228-2446, Fax: 02-313-0908
E-mail: leekcp@yuhs.ac