creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000235882

2008년 2월

박사 학위 논문

Imipenem 내성 *Acinetobacter baumannii* 균주 중 특정 인테그론을 가진 균의 빈도 및 유전형 분석

조선대학교 대학원

의 학 과

정 옥 연

Imipenem 내성 *Acinetobacter baumannii* 균주 중 특정 인테그론을 가진 균의 빈도 및 유전형 분석

Analysis of the frequency and genotype of imipenem- resistant *Acinetobacter baumannii* containing specific integron

2008년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

정 옥 연

Imipenem 내성 *Acinetobacter baumannii* 균주 중 특정 인테그론을 가진 균의 빈도 및 유전형 분석

지도교수 장 숙 진

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함.

2007년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

정 옥 연

정옥연의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	박영진	인
위원	조선대학교 교수	문대수	인
위원	조선대학교 교수	장숙진	인
위원	전남대학교 교수	신종희	인
위원	조선대학교 교수	김동민	인

2007년 12월

조선대학교 대학원

목차

Page

표목차 ---------- Ⅱ

도목차 ---------- Ⅲ

영문초록 ---------- Ⅳ

Ⅰ. 서론 ---------- 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ---------- 3

Ⅲ. 결과 ---------- 7

Ⅳ. 고찰 ---------- 9

Ⅴ. 요약 ---------- 13

참고문헌 ---------- 15

표 목차

Table 1. The Nationwide Prevalence of Integron containing a aadA1 gene disrupted by *IS 26* insertion (Integron-*IS26*) among imipenem-resistant A.baumannii(IRAB) isolated ----------19

Table 2. Primer used in this study ----------20

Table 3. Comparison of genotypes using REP-PCR and Integron-IS26 PCR results among 78 IRAB strains isolated from 2 university hospitals. ----------21

Table 4. The result of REP-PCR genotypes and antibiotic susceptibility testing among IRAB strains containig Integron-*IS26* ----------22

Table 5. Comparison of resistance(%) of 8 antibiotics among 78 IRAB strains isolated from two university hospitals. ---------- 23

도 목차

Fig. 1. Schematic representation of class I integron found in A. baumannii strain. ----- ---------- 24

Fig. 2. The results of integron-*IS 26* PCR of 13 strains of *A. baumannii* isolated from two University Hospital. ----------25

Fig. 3. Representative genotyping-patterns by using REP-PCR method for IRAB isolates containing Integron-*IS26*. ---------- 26

Fig. 4. The dendrogram, which was generated after REP-PCR analysis of isolates tested, disclosed genetic diversity, which suggests that the horizontal spread of Integron-*IS26* is occurring among genetically diverse strains of IRAB. ---------- 27

ABSTRACT

Analysis of the frequency and genotype of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* containing specific integron

Okyeon Jeoung

Advisor: Prof. Sookjin Jang Ph.D

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Background:, An outbreak of imipenem-resistant *A. baumannii* (IRAB) occurred in Chosun university hospital (CSUH), Gwangju, Korea in 2004. An specific integron containing disrupted *aadA1* gene by *IS26* insertion(Integron-*IS26*) was found in the strain of major clone of the outbreak. The aims of this study were to determine the prevalence and spread of Integron-*IS26* among IRAB isolated from CSUH and other hospitals in Korea.

Methods: A total of 215 isolates of IRAB, consisted of 62 isolates collected from CSUH for a five year period between 2003 and 2007 and

153 isolates collected from other hospitals in various regions of Korea for a 2 year period between 2005 and 2006 were tested. The specific primers for the integron was designed and used to detect the integron by PCR. All isolates containg Integron-*IS26* were genotyped using repetitive extragenic palindromic PCR(REP-PCR).

Results: Of 215 IRAB isolates from various regions of Korea, 29(13%) isolates from two hospitals were positive for PCR for the Integron-IS26. Except two isolates from JBUH, 27 isolates were recovered from CSUH between 2004 and 2007. Annual prevalence of IRAB containing Integron-*IS26* in CSUH ranged from 50 to 70% of all IRAB tested since 2004.

A total of 78 isolates were genotyped by REP-PCR types: 29 isolates containing Integron-*IS26* identified six different types (A-E and I), while 49 isolates which were negative for Integron-*IS26* disclosed.

Conclusion: Although IRAB having the Integron-*IS26* has been isolated continuously in CSUH for 4 years, but its prevalence in other hospitals in Korea was very low. The IRAB having the Integron-*IS26* showed diverse REP-PCR genotypes which suggest the horizontal transfer of the Integron-*IS26*.

Key words: Integron-*IS26*, Imipenem -resistant *A. baumannii,* REP-PCR

Ⅰ. 서론

*Acinetobacter baumannii*는 자연환경에 산발적으로 분포되어 있으며 종종 중환자실 입원환자에게 colonization과 병원감염을 일으키는 중요한 기회감염균이다. 여러 연구들에서 *A. baumannii*가 폐렴, 창상감염, 혈류감염과 같은 병원감염의 가장 흔한 균이라고 보고하고 있다[Bartual SG et al, 2005]. 대부분의 감염은 특정 시기에 유행적으로 나타나며 많은 균주들이 broad-spectrum ß-lactam, aminoglycosides, fluoroquinolon 과 같은 광범위 항생제에 내성을 보여 치료에 어려움을 주고 있다[Koelman JGM et al, 2001]. *A. baumannii* 의 항생제 내성 기전을 연구한 문헌들에서 전파가 가능한 plasmid와 transposon에 위치하는 특별한 내성 유전자가 있다는 것이 증명되었고[Seward RJ et al, 1998]. 분자생물학적 기법의 발달로 integron이라 불리우는 DNA 단위에 들어 있는 내성 유전자들과 넓은 숙주 범위를 가진 plasmid들이 서로 관련되어 있다는 것이 밝혀졌다[Stokes HW et al, 1989]. Integron은 내성유전자의 획득에 유용한 특수한 유전적 구조이며 동일한 부착 장소 안에 한 개 이상의 유전자 cassettes를 인지하고 포획할 수 있어 항생제 내성 유전자들의 합성적 군집 형성을 촉진한다(Fig. 1). 또한 integron을 통해 수평적, 수직적으로 유전자 전달이 가능하며 세균성 병원균들간의 내성 전파에 있어서도 integron이 중요한 것으로 알려져 왔다[Jang SJ, 2005].

장기간 동안 extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 생성 장내세균에 대해 Integron의 유형을 연구한 몇몇 보고들이 있다[Elisabete et al, 2005 Elisabete et al, 2007]. 그러나 국내에서 imipenem 내성 *A. baumannii* (이하,

IRAB)에 대해 특정 integron을 대상으로 직접 그 integron의 전파를 장기적으로 추적한 보고는 별로 없다.

2004년 조선대학교 병원에서는 IRAB에 의한 돌발감염이 발생하였다. 이 돌발감염 균주의 내성기전을 연구하면서 돌발감염 세균이 보유한 integron의 염기서열을 분석하게 되었다. 대부분의 class 1 integron은 *aadA* 항생제 내성 유전자를 보유하고 있는 것으로 알려져 왔다[Fluit AC et al, 2004]. 그러나 조선대학병원에서 발생한 IRAB 돌발감염 균주에서는 *aadA2* 유전자 속에 insertion sequence (IS) 26 유전자가 삽입되어 있는 특이한 gene cassette (AI gene cassette)를 가진 integron(이하, Integron-*IS26*)가 발견되었다(Fig. 2). 저자들은 이 integron의 gene cassette 구조가 특이하기 때문에 그 특이한 integron을 가진 IRAB 균의 지역적, 시기적 분포를 추적해봄으로써 integron의 전파양상을 살펴볼 수 있다고 생각하였다. 본 연구의 목적은 본원에서 5년간 수집한 IRAB 균주들과 전국 여러 병원에서 수집한 IRAB 균주들을 대상으로 Integron-*IS26*의 양성률을 검사함으로써 integron의 전파양상을 추적하는데 있다. 연구 대상인 Integron-*IS26*을 가진 IRAB 균을 검출하기 위해 그 integron의 특이한 gene cassette 연쇄에 근거를 두어 고안한 primer를 이용하여 PCR 검사를 시행하였고 각 균주의 유전자 형별(genotype)을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

I. 대상균주

2003년부터 2007년까지 5년간 조선대학교병원 진단검사의학과 임상미생물 검사실로 세균배양이 의뢰된 검체들 중에서 분리한 IRAB 62주와 전국 각지의 여러 병원들에서 분리한 IRAB 153주로 총 215주를 대상으로 하였다. 전국각지의 여러 병원들에서 분리한 IRAB 균주들의 구성은 서울 35주, 경기 17주, 강원 20주, 충청 17주, 전북 25주, 전남 74주(조선대학병원 검체 62주 포함), 경북 5주, 경남 20주, 제주 2주로 총 215주였다(Table 1). 조선대학교병원에서 5년간 수집하여 검사된 검체의 구성은 2003년도 15주, 2004년도 10주, 2005년도 4주, 2006년도 9주, 2007년도 24주로 총 62주였다(Table 3). 세균의 동정과 항생제 감수성 검사는 VitekⅡ system (bioMérieux, Marcy-I Etoile, France)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 분자생물학적 검사를 위해 균주들은 Luria-Bertani(LB) agar 배지에 접종되어 37℃ 배양기에서 16~18시간 배양한 후 아래 실험에 사용되었다.

II. 세균 유전체 DNA추출

세균의 유전체 DNA는 *AccuPrep*® Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Co., USA)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 추출하였다. 추출과정을 간략히 적으면 다음과 같다. 균주를 LB 배지에 배양한 후 다섯 집락을 취하여 200 ㎕의 phosphate buffered saline (pH 8.0)에 넣고 충분히 섞어준다. Proteinase K 20

㎕와 GC buffer 200 ㎕를 균 액에 넣어준 다음 잘 혼합한 후 60℃에서 10 분간 반응시킨다. 여기에 Isopropanol 100 ㎕를 넣고 잘 혼합한다. 혼합액을 Binding Column tube에 넣은 후 8,000 rpm (6,000 g)에서 1 분간 원심분리 한다. Column에 500 ㎕의 완충액 W1 을 넣고 8,000 rpm(6,000 g)에서 1 분간 원심분리 한다. 500 ㎕의 완충액 W2 를 넣고 8,000 rpm (6,000 g)에서 1 분간 원심분리 한다. 에탄올을 완전히 제거하기 위해 12,000 rpm에서 1 분간 한 번 더 원심분리 한다. Binding Column tube를 1.5 ㎖의 새 tube로 옮긴 후 200 ㎕의 Elution buffer를 넣고 실온 (15~20℃)에 1 분간 방치한 다음 8,000 rpm (6,000 *g*)에서 1 분간 원심분리 하여 세균 유전체 DNA를 추출하였다.

Ⅲ. PCR

1) Integron-*IS26*을 확인하기 위한 Integron-*IS26* PCR

대상균주들이 Integron-*IS26*을 가졌는지 확인하기 위해 그 integron의 gene cassette 연쇄에 근거를 두어 고안한 primer를 제조하여 PCR을 시행하였다(Table 2). PCR을 위한 반응액은 *AccuPower*® PCR Premix(Bioneer Co., USA)에 시발체로 aac(6)1mF 1 ㎕, aadA1R 1㎕을 사용하고 2 ㎕의 유전체 DNA와 증류수 16 ㎕를 함유하였다. 총 50㎕의 반응액은 ABI 2400 thermocycler (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Roissy,. France)를 사용하여 94℃에서 5분간 초기 변성을 실시한 다음 94℃에서 30초간 변성, 51℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension하는 과정을 35회 반복하여 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 연장반응 시켰다. 최종 반응물을 2 ㎕씩 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

2) Repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR

대상균주를 LB 배지에 배양한 후 다섯 집락을 취하여 200 ㎕의 phosphate buffered saline(ph 8.0)에 넣고 충분히 섞어준 후 DU® 530UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter™ . Germany)를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값이 2.0이 되도록 균 액을 맞춰주었다. 균 액이 조정된 세균의 유전체 DNA는 *AccuPrep*® Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Co., USA)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 추출하였다. REP-PCR을 위한 반응액은 *AccuPower*® PCR PreMmix(Bioneer Co.,Dae-jeon, Korea)에 10 pmol의 REP-1D와 10 pmol의 REP-2D를 각각 2 ㎕씩 넣고 유전체 DNA 5 ㎕, 증류수 11 ㎕를 넣어 제조하였다. 총 20 ㎕의 반응액은 ABI 2400 thermocycler (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Roissy,. France)를 사용하여 95℃에서 7분간 초기 변성을 실시한 다음 90℃에서 30초간 변성, 45℃에서 1분간 annealing, 65℃에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음, 마지막으로 70℃에서 5분간 연장반응 시켰다. 최종 반응물을 2 ㎕씩 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다. 증폭한 PCR 산물은 *AccuPrep*® Gel Purification kit(Bioneer Co., USA)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 DNA를 정제하였다. REP-PCR 결과를 분석해 dendrogram을 얻기 위한 소프트웨어로 GelCompar Ⅱ(Applied Maths, Austin, TX, USA)를 사용하였다[Oh HR et al, 2007].

Ⅳ. Integron-*IS26* PCR 양성 균주와 음성 균주들 간에 항생제 내성률 비교

Integron-*IS26* PCR에 양성을 보인 지역인 전북대학병원과 조선대학병원에서 수집된 IRAB 중에서 Integron-*IS26* 양성 균주와 음성 균주들 간에 항생제

내성률을 비교해보았다. 비교 대상 항생제로 전북대학병원과 조선대학병원에서 공통적으로 사용된 8 가지 항생제들을 선택하여 결과를 함께 비교하였다.

비교 대상 항생제는 amikacin(AN), ciprofloxacin(CIP), gentamicin(GM), imipenem(IMI), netilmicin (NET), piperacillin(PIP), trimethoprime/sulfmeth-oxazole(SXT), ceftazidime (TAZ)였다. Integron-*IS26* PCR에 양성과 음성 결과를 보인 균주들 중 각각의 항생제에 내성을 보인 균주들의 비율을 조사하여 비교 하였다[Turton JF et al, 2005].

III. 결과

1. Integron-IS26 PCR 결과

전국 각지의 여러 병원들에서 분리한 IRAB 215주에서 이 integron의 양성률을 조사해본 결과 29주 (13%)에서 양성을 보였는데 이는 전북대학병원에서 2주, 조선대학병원에서 27주였고 다른 지역의 균주들은 모두 음성 결과를 보였다(Table 1). 전북대학병원에서 분리된 양성 균주는 2005년에 분리한 IRAB 6주 중 1주와 2006년에 분리한 10주 중 1주이었다(Table 3).

조선대학병원에서 5년간 수집한 IRAB 62주 중에서 이 integron의 양성률을 조사해 본 결과 2004년에 분리한 IRAB 10주 중 7주, 2005년에 분리한 IRAB 4주 중 2주, 2006년에 분리한 IRAB 9주 중 5주, 2007년에 분리한 IRAB 24주 중 11주이었다(Table 3) (Fig. 2).

Ⅱ. REP-PCR 결과

전북대학병원과 조선대학병원에서 분리된 IRAB 78 균주를 대상으로 하여 REP-PCR을 이용한 유전자형별 분석을 시행하여 대상 균주들의 genotype 을 비교한 결과 Integron-IS26 PCR 에 양성인 균주들에서 총 7 가지 형을 보였고 이 중 B, C, E 형을 보인 균주들이 많았다(Fig. 3 및 4). 또 이 integron PCR에 음성인 균주들에서는 11 가지 genotype을 보였는데 A 형이 가장 흔하였고 그 외

F, G, B, D, 형 등 다양한 type이 보였다. 두 균 군들이 다 다양한 type을 보였다(Table3).

Ⅲ. Integron-*IS26* PCR 양성 균주와 음성 균주들 간에 항생제 내성률 비교

Integron-*IS26* PCR 양성인 군에서 항생제 내성률은 amikacin(AN), ciprofloxacin(CIP), gentamicin(GM), imipenem(IMI), netilmicin(NET), piper-acillin(PIP), trimethoprime/sulfmethoxazole(SXT), ceftazidime(TAZ)에 대해 각각 46%, 88%, 88%, 100%, 100%, 100%, 100%, 100%였다. Integron-IS26 PCR 음성인 군에서 항생제 내성률은 amikacin(AN), ciprofloxacin(CIP), gentamicin(GM), imipenem(IMI), netilmicin(NET), piperacillin(PIP), trimeth-orime/sulfmethoxazole(SXT), ceftazidime(TAZ) 에 대해 각각 62%, 63%, 81%, 100 %, 89%, 96%, 91%, 100%였다(Table 5). Amikacin을 제외한 7 개 항생제를 비교하였을 때 전반적으로 Integron-*IS26* PCR 양성군에서 더 높은 다제내성률을 보여주었다(Table 4 및 5).

Ⅳ. 고찰

A. baumannii 는 유럽, 아시아, 미국, 라틴 아메리카 등 여러 나라에서 중요한 병원감염균으로 나타나고 있다. 이 균주는 병원의 돌발감염에 관여하며 공공시설간 전파를 야기시키는 것으로 알려져 있다[Landman D et al, 2002]. 여러 연구자들이 유행성 *A. baumannii* 균주들 중에 유전자이질성을 강조하는 반면에 최근 자료는 몇 몇의 유행성 *A. baumannii* 클론들이 순환하고 있음을 시사하고 있다. EU clones Ⅰ과 Ⅱ가 북부 유럽에서, EU cloneⅢ는 지리적으로 더 넓은 분포로 분리되었다[van Desel H et al, 2004]. 다제내성 심지어 전내성 유행성 *A. baumannii*의 세계적 확산이라는 관점에서 이 균주들의 전세계적인 역학을 더 잘 이해하는 것이 시급히 요구된다[Bartual SG et al, 2005].

Integron은 내성유전자의 획득에 유용한 특수한 유전적 구조이며 동일한 부착 장소 안에 한 개 이상의 유전자 cassettes를 인지하고 포획할 수 있어 항생제 내성 유전자들의 합성적 군집 형성을 촉진한다. 또한 integron을 통해 수평적, 수직적으로 유전자 전달이 가능하며 세균성 병원균들간의 내성 전파에 있어서도 integron이 중요한 것으로 알려져 왔다.

조선대학교 병원에서는 2004년 조선대학교 병원에서 발생한 IRAB 돌발감염 균주의 내성기전을 연구하면서 돌발감염 세균이 보유한 integron의 염기서열을 분석하게 되었다. IRAB 돌발감염 균주 중 CM-128 균주로 integron 중합효소 연쇄반응(PCR)을 시행한 후 그 산물을 cloning하여 염기서열 분석을 한 결과

aadA2 유전자 속에 insertion sequence(IS) 26 유전자가 삽입되어 있는 특이한 gene cassette (AI gene cassette)를 발견하였다. 거의 대부분의 class 1 integron은 *aadA* 유전자를 함유하고 있는데 CM-128 균주는 *aadA2* 유전자 사이에 *IS26* 유전자가 삽입된 특이한 gene cassette인 AI gene cassette를 가지고 있었다. Integron의 구조를 밝힌 여러 연구들에 의하면 integron에 삽입된 유전자 cassette는 완전한 유전자이거나 아직 잘 밝혀지지 않은 ORF들로 구성되어 있다. 이러한 cassette의 앞이나 뒤에서 *IS26*이 발견된 경우는 있었지만 CM-128 균주처럼 *aadA2* 유전자 내부에 *IS26*의 구조가 삽입된 경우는 아직까지 보고된 적이 없었다.

저자들은 2004년에 조선대학병원에서 돌발감염을 일으켰던 IRAB 균이 특이한 integron을 가졌기 때문에 이 특이 구조를 추적함으로써 이 균주가 우리나라에 어떻게 분포되어 있는지 알고자 하였다. 장기간 동안 extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 생성 장내세균에 대해 Integron의 유형을 연구한 몇몇 보고들이 있다. 그러나 국내에서 IRAB에 대해 특이 integron을 대상으로 직접 그 integron의 전파를 장기적으로 추적한 보고는 별로 없다. 이 integron의 gene cassette 구조가 특이하기 때문에 그 특이한 integron을 가진 IRAB 균의 지역적, 시기적 분포를 추적해봄으로써 integron의 전파양상을 살펴볼 수 있다고 생각되었다. 또한 전국 여러 병원에서 수집한 IRAB 균주들을 대상으로 이 integron의 양성률을 검사함으로써 AI gene cassette가 다른 균주들에서도 존재하는지를 알기 위하여 본 연구에서 REP-PCR 검사법을 시행하여 지역 병원별로 AI gene cassette를 함유하고 있는 균주의 비율을 조사하였다.

*A. baumanniii*에 의한 감염의 역학연구에 있어서 분자유전학적 기법의 유용성은 이미 증명되었다[David ML et al, 2002]. Pulsed-field gel

electrophoresis (이하, PFGE)에 의해 측정되는 DNA restriction fragment length polymorphism 분석법은 gold standard로 여겨지고 있다. 그러나 이 방법은 복잡하고 시간이 많이 걸리며 고가의 시약을 사용한다는 문제점이 있다[Seifert H et al, 1995]. 이 방법과는 대조적으로 REP-PCR법은 신속 간편하고 상대적으로 비용이 저렴하며 감별력과 재현성이 있어 PFGE에 비교할만한 검사라고 보고되어 왔다[Bou G et al, 2000]. 또한 *A. baumannii* 에 의한 병원내 돌발감염의 특징 파악에 있어서도 유용하다고 한다[Bou G et al, 2000]. 더우기 REP-PCR은 다른 PCR-based fingerprinting system보다 감별력과 재생성이 더 높다고 알려져 있다[Snelling AM et al, 1996]. 그래서 본 연구에서도 REP-PCR법을 도입하여 실험하였다. 조선대학 병원에서 5년간 수집한 IRAB 균주들의 연도별 양성률을 살펴보면 Integron-*IS26* PCR 양성인 균주가 돌발감염이 일어나기 전인 2003년도에는 하나도 없었으나 돌발감염이 일어났던 2004년에 증가한 이후 2007년도에 이르기까지 지속적으로 분리되었다(Fig. 2). 해가 지나도 비슷한 양성률을 유지하는 것으로 보아 IRAB 균들 사이에서 그 integron의 전파력이 비교적 높은 것으로 생각되었다. 또 전국 각지의 다른 여러 병원들에서 분리한 IRAB균에서는 전북대학병원에서 2주, 조선대학병원에서 27주가 양성을 보였을 뿐 다른 지역의 균주들은 모두 음성결과를 보여 타 지역으로는 거의 전파되지 않았음을 알 수 있었다. Integron-*IS26* PCR에 양성인 균주들의 clonality를 살펴보기 위해 REP-PCR을 시행한 결과 Integron-*IS26* PCR에 음성인 균주들에서는 A type이 가장 흔하였고 양성인 균주들에서는 B, C, E type을 보인 균주들이 많았다(Fig.5). Integron-*IS26* PCR에 양성인 균주들이 연도별로 여러 다양한 type을 보이는 것으로 보아 이 integron의 수평전파는 비교적 용이한 것으로 생각되었다. 저자들은 Integron-

IS26 PCR 양성을 보였던 조선대학병원 검체와 전북대학 검체를 대상으로 양성인 군과 음성인 군이 항생제 내성률에 차이를 보이는지 비교해 보았다. 두 병원에서 얻은 항생제 감수성 결과를 토대로 하여 공통으로 사용되는 항생제 8가지에 대해 내성률를 살펴보았을 때 Integron-*IS26* PCR 양성인 군은 amikacin(AN), ciprofloxacin(CIP), gentamicin(GM), imipenem(IMI), netilmicin(NET), piperacillin(PIP), Trimethoprime/sulfmeth- oxzole(SXT),ceftazidime(TAZ)에 대해 각각 46%, 88%, 88%, 100%, 100%, 100%, 100%, 100%였다. Integron-*IS26* PCR 음성인 군은 각각 62%, 63%, 81%, 100 %, 89%, 96%, 91%, 100%였다(Table 4). Amikacin을 제외한 7개 항생제를 비교하였을 때 전반적으로 Integron-*IS26* PCR 양성 군에서 더 높은 다제내성률을 보이는 것으로 생각되었다. 본 연구를 종합해 보면 저자들은 조선대학병원에서 돌발감염 균주인 *A. baumannii* 균주에서 새롭게 발견된 integron에 관심을 갖고 여러 연구들을 하게 되었다. 그 결과 Integron-*IS26*을 가진 IRAB 균의 양성률은 이것이 처음 분리된 본 병원에서 높게 유지되고 해가 지나도 비슷한 양성률을 유지하여서 균간의 전파력이 비교적 높은 것으로 생각되었으나 다른 지역에 있는 병원에서는 양성률이 낮았다. Integron-*IS26* PCR에 양성인 균주들의 clonality를 살펴보기 위해 REP-PCR을 시행한 결과 B, C, E type 등 여러 다양한 type을 보이는 것으로 보아 이 Integron-*IS26*이 다양한 IRAB strains 중에서 수평전파를 잘 하는 것으로 생각되었다. 이 Integron-*IS26*이 가까운 지역의 다른 병원에서도 나타난 것으로 보아 향후 시간이 지나면 다른 지역으로도 전파될지 지켜볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

V. 요약

배경: 항생제 내성 유전자를 전달할 수 있는 transposable element 중의 하나인 integron이 세균들 간에 수직적, 수평적으로 전이되어 내성유전자를 쉽게 전파시킬 수 있다고 알려져 있으나 특정 integron의 전파를 장기적으로 추적한 보고는 별로 없다. 2004년에 조선대병원에서 돌발감염을 일으킨 주된 IRAB 균이 함유한 integron내 gene cassette를 분석한 결과 *aadA1* 유전자 안에 *IS26*이 삽입되어 있는 특이한 gene cassette (Integron-*IS26*)가 발견되었다. 이 Integron-*IS26*의 gene cassette 구조가 특이하기 때문에 이 integron을 가진 IRAB 균의 지역적, 시기적 분포를 추적해봄으로써 integron의 전파양상을 살펴볼 수 있다고 생각되었다. 본 연구의 목적은 본원에서 5년간 수집한 IRAB 균주들과 전국 여러 병원에서 수집한 IRAB 균주들을 대상으로 이 integron의 양성률을 검사함으로써 integron의 전파양상을 추적하는데 있다.

방법: 본 연구에서 추적하고자 하는 Integron-*IS26*을 가진 IRAB 균의 지역적, 시기적 분포를 알기 위해 검사한 대상 균주는 전국각지의 여러 병원들에서 분리한 IRAB 153주와 조선대학병원에서 5년간 수집한 IRAB 62주로 총 215주였다. 전국각지의 여러 병원들에서 분리한 IRAB 균주들의 구성은 서울 35주, 경기 17주, 강원 20주, 충청 17주, 전북 25주, 전남 74주(조선대학병원 검체 62주 포함), 경북 5주, 경남 20주, 제주 2주 였다. 조선대학병원에서 5년간 수집하여

검사된 검체의 구성은 2003년도 균주 15주, 2004년도 10주, 2005년도 4주, 2006년도 9주, 2007년도 24 주였다. 연구 대상인 Integron-*IS26*을 가진 IRAB 균을 검출하기 위해 그 integron의 특이한 gene cassette연쇄에 근거를 두어 고안한 시동물질을 이용하여 PCR 검사를 시행하였다.

결과: 전국 각지의 다른 여러 병원들에서 분리한 IRAB 215주에서 Integron-*IS26*의 양성률을 조사해본 결과 호남지역에 있는 두 대학병원에서 29주 (13%)가 양성을 보였을 뿐 다른 지역의 균주들은 모두 음성 결과를 보여 타 지역으로는 거의 관찰되지 않았음을 알 수 있었다. Integron-*IS26* PCR에 양성인 검체가 분리되었던 조선대와 전북대 병원의 연도별 양성률을 살펴보면 조선대는 평균 40%, 전북대는 평균 12.5%의 양성률을 보였다. 조선대 병원에서 5년간 수집한 IRAB 62주 중 Integron-*IS26*을 가진 IRAB 균의 양성률은 2003년에 0주 (0%), 2004년에 7주 (70%), 2005년에 2주 (50%), 2006년에 6주 (66.7%), 2007년에 12주(50%)로서 돌발감염이 일어나기 전에는 없었으나 돌발감염이 일어났던 2004년부터 지속적으로 분리되었고 해가 지나도 비슷한 양성률을 유지하였다. REP-PCR을 시행하여 대상 균주들의 type을 비교한 결과 Integron-*IS26* PCR에 음성인 균주들 중 A type이 가장 흔하였고 그 외 F, G, B, D, H, I 형 등 다양한 type이 보였으나 Integron-*IS26* PCR에 양성인 균주들은 주로 B, C, E type을 보인 균주들이 많았다.

결론: 한 특정 integron을 가진 IRAB 균의 양성률은 이것이 처음 분리된 본 병원에서 높게 유지되고 해가 지나도 비슷한 양성률을 유지하여서 균 간의 전파력이 비교적 높은 것으로 생각되었으나 다른 지역에 있는 병원에서는 양성률이 낮았다. 이 Integron-*IS26* PCR에 양성인 균주들의 clonality를 살펴보기 위해 REP-PCR을 시행한 결과 B, C, E type 등 여러 다양한 type을

보였고 연도별로도 여러 다양한 type을 보이는 것으로 보아 이 Integron-*IS26*이 다양한 IRAB 균주들 중에서 수평전파를 잘 하는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii.* J Clin Microbiol 2005;43:4382-90
2. Koeleman JGM, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-grauls CMJE, Savelkoul PHM. Identification of Epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR . J Clin Microbiol. 2001;39:8-13
3. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. J. Med.Microbiol. 1998;47:455-61
4. Stokes HW, Hall RM, A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration funvtions:integrons. Mol Microbiol. 1989;3:1669-83.
5. Sook-Jin Jang. The role of Integrons in the spread of Multi-drug Resistance. Korean J Clin Microbiol. 2005;8(1):1-9.

6. Elisabete M, Rafael C, Fernando B, Juan-Carlos G, Azucena R, Luísa P, et al. Integron content of Extended - Spectrum β-Lactamase - Producing Escherichia coli Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents and Chemother. 2005;49:1823-9.
7. Elisabete M , Joana F, Ângela N, Luísa P, Rafael C, Fernando B, et al. Preservation of Integron types among Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum β-Lactamase in a Spanish Hospital over a 15-Year Period(1988 to 2003). Antimicrob Agents and Chemother. 2007;51:2201-4.
8. Oh HR, Jang SJ, Yu FN, Park G, Li XM, Shin SH, et al. Prevalence of Carbapenemase and Integrase Genes in Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Collected over several years in a University Hospital. Korean J Clin Microbiol. 2005 Oct;10:128-34.
9. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, et al. Detection and Typing of Integrons in Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* Found in the United Kingdom. J Clin Microbiol 2005;43:3074-82.
10. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishanker J, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, N.Y. Arch Intern Med 2002;162:1515-20.

11. Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, Broek P, et al. Identification of of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Res Microbiol 2004;155:105-12.

12. David ML, José MC, Berta B, Lucila C, Trinidad P, Carlos OL, et al. Comparison of a Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR method and clinical and microbiological methods for Determining Strain Sources in Cases of Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. J Clin Microbiol 2002;40:4571-5.

13. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of for ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1995;33:1402-7.

14. Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem- resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbil Infect 2000;6:635-43

15. Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due

solely to the presence of β-lactamases. J Clin Microbiol 2000;38:3299-305.

16. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey M, Heritage J, Parnell P, Porter C, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. J Clin Microbiol 1996;34:1193-202.

Table 1. The Nationwide Prevalence of Integron containing a aadA1 gene disrupted by *IS 26* insertion (Integron-*IS26*) among imipenem-resistant A.baumannii(IRAB) isolated

Hospital	Region	No. of isolates tested	No.(%) of PCR for positives Integron-IS26
CSUH	Jeonnam	62	27(40)
Other hospital*	Seoul	35	0
	Gyeonggi	17	0
	Gangwon	20	0
	Chungcheong	17	0
	Jeonbuk	25	2(8)
	Gyeongbuk	5	0
	Gyeongnam	20	0
	Jeonnam	12	0
	Jeju	2	0

CSUH, Cho-Sun university hospital
* Hospitals in various region of Korea other than CSUH.

Table 2. Primer used in this study

Name of PCR	Name of primer	Sequence of primer	Region	Aplicon size
Integron-*IS26* PCR*	aac(6')1m F	5'-TGC TTG GGA ATA TGT CTG G-3'	aac(6')1m	1767bp
	aadA1 R	5'-CGC TAT GTT CTC TTG CTT TTG-3'	aadA1	1767bp
REP-PCR**	REP-1D	5'-NNN RCG YCG NCA TCM GGC-3'	REP	NA
	REP-2D	5'-RCG YCT TAT CMG GCC TAC-3'	REP	NA

* PCR for the detection of Integron-IS26

** PCR for genotyping of IRAB isolates

Table 3. Comparison of genotypes using REP−PCR and Integron−*IS26* PCR results among 78 IRAB strains isolated from 2 university hospitals.

Hospital	Year	Integron−	No.of isolates showing REP − PCR												
		IS26 PCR	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	NT	Total
CSUH	2003	negative	0	0	0	2	0	4	6	0	0	2	1	0	15
		positive	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2004	negative	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
		positive	1	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7
	2005	negative	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
		positive	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	2006	negative	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3
		positive	0	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0	6
	2007	negative	2	3	1	1	0	0	0	1	0	0	0	4	12

		positive	1	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	1	12
JBUH	2005	negative	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	5
		positive	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2006	negative	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
		positive	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total		negative	12	4	1	4	0	6	6	4	4	2	1	5	49
		positive	4	6	7	3	7	0	0	1	0	0	0	1	29

CSUH, Cho-Sun university hospital; JBUH, Jeon-Buk university hospital

Table 4. The result of REP-PCR genotypes and antibiotic susceptibility testing among IRAB strains containig Integron-*IS26*

No. of strain	hospital	Year	Source	REP-PCR	AN	CIP	GM	IMI	NET	PIP	SXT	TAZ
3916	JBUH	2005	sputum	A	R	R	R	R	R	R	R	R
3943	JBUH	2006	endotracheal	A	R	R	R	R	R	R	R	R
1572	CSUH	2004	sputum	A	R	R	R	R	R	R	R	R
1539	CSUH	2004	material	C	R	R	I	R	R	R	R	R
1549	CSUH	2004	sputum	C	R	R	R	R	R	R	R	R
1554	CSUH	2004	sputum	D	I	R	R	R	R	R	R	R
1573	CSUH	2004	open pus	B	R	R	R	R	R	R	R	R
1557	CSUH	2004	sputum	B	S	R	R	R	R	R	R	R
1538	CSUH	2004	material	C	S	S	S	R	R	R	R	R
874	CSUH	2005	open pus	E	I	R	R	R	R	R	R	R
913	CSUH	2005	sputum	E	S	R	R	R	R	R	R	R
1043	CSUH	2006	sputum	H	S	R	R	R	R	R	R	R
1093	CSUH	2006	open pus	E	I	R	R	R	R	R	R	R
1024	CSUH	2006	sputum	E	S	R	R	R	R	R	R	R
1165	CSUH	2006	sputum	E	S	R	R	R	R	R	R	R
1171	CSUH	2006	sputum	E	S	R	R	R	R	R	R	R
1186	CSUH	2006	sputum	E	S	R	R	R	R	R	R	R
2941	CSUH	2007	sputum	NT	S	R	R	R	R	R	R	R

2824	CSUH	2007	other F.	A	S	R	R	R	R	I	R	R
2788	CSUH	2007	open pus	C	S	R	R	R	R	R	R	R
3056	CSUH	2007	sputum	D	R	R	R	R	R	I	R	R
3093	CSUH	2007	open pus	D	R	R	R	R	R	R	R	R
2884	CSUH	2007	sputum	B	I	R	R	R	R	I	R	R
2936	CSUH	2007	blood	B	S	R	R	R	R	R	R	R
2956	CSUH	2007	sputum	B	I	R	R	R	R	I	R	R
2988	CSUH	2007	sputum	B	S	R	R	R	R	R	R	R
2822	CSUH	2007	open pus	C	I	R	R	R	R	R	R	R
2825	CSUH	2007	pleural F.	C	I	R	R	R	R	R	R	R
2873	CSUH	2007	open pus	C	I	R	R	R	R	I	R	R

CSUH, Cho-Sun university hospital; JBUH, Jeon-Buk university hospital

Table 5. Comparison of resistance(%) of 8 antibiotics among 78 IRAB strains isolated from two university hospitals.

Integron-*IS26* PCR	Hospital	No. of stain tested	Antimicrobial resistance rate(%)							
			AN	CIP	GM	IMI	NET	PIP	SXT	TAZ
Positive	JBUH	2	100	100	100	100	100	100	100	100
	CSUH	27	50	96	96	100	100	100	100	100
	Total	29	46	88	88	100	100	100	100	100
Negative	JBUH	14	36	92	86	100	86	100	86	100
	CSUH	33	73	52	79	100	91	94	95	100
	Total	49	62	63	81	100	89	96	91	100

CSUH, Cho-Sun university hospital; JBUH, Jeon-Buk university hospital

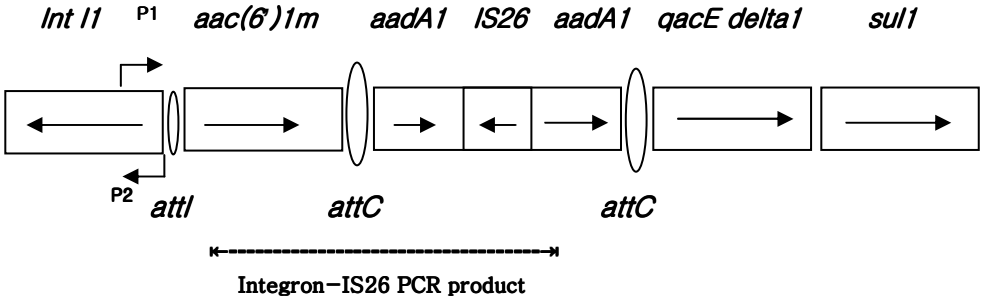

Fig. 1. Schematic representation of class I integron found in *A. baumannii* strain. Gene cassettes are shown as boxes with arrows indicating the orientation of transcription and large ovals indicating the 59-base element recombination site. The 5' conserved segment contains the intI1 integrase gene and attI1 recombination site by small oval and the 3' conserved segment.

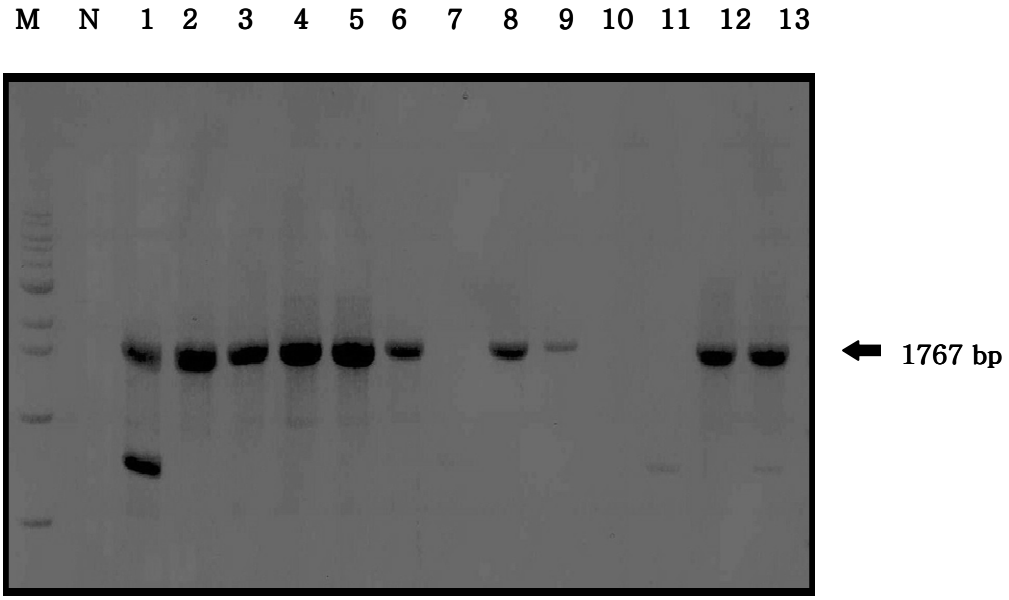

Fig. 2. The results of integron-*IS26* PCR of 13 strains of *A. baumannii* isolated from two University Hospital. Lane M, Molecular weight marker; Lane N, negative control; lane 1, strain no.1557; lane 2, strain no.1573; lane 3, strain no. 874; lane 4, strain no. 1043; lane 5, strain no.1165; lane 6, strain no. 1186; lane 7, strain no. 2931; lane 8, strain no. 2788; lane 9, strain no. 2822; lane 10, strain no.3912; lane 11, strain

no.3938; lane 12, strain no.3916; lane 13, strain no.3943. See Table 4 for detailed information on each isolates.

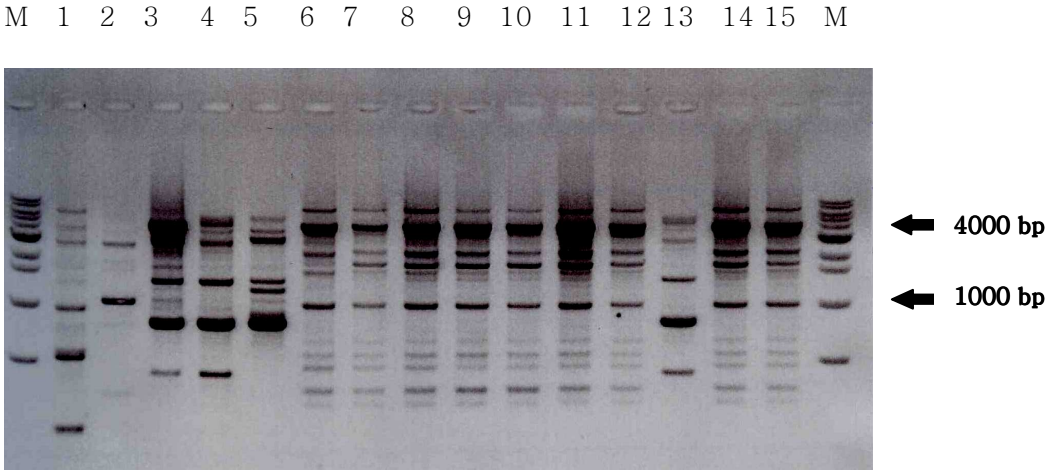

Fig. 3. Representative genotyping-patterns by using REP-PCR method for IRAB isolates containing Integron-*IS26*. ; lane 1, strain no.1557; lane 2, strain no.1573; lane 3, strain no. 874; lane 4, strain no. 1043; lane 5, strain no.1165; lane 6, strain no. 1186; lane 7, strain no. 2931; lane 8, strain no. 2788; lane 9, strain no. 2822; lane 10, strain no.2988; lane 11, strain no.1171; lane 12, strain no.2936; lane 13, strain no.2956. lane 14, strain no.3916; lane 15, strain no.3943. See Table 4 for detailed information on each isolates. Lane M, Molecular weight marker. CSUH, Cho-Sun university hospital; JBUH, Jeon-Buk university hospital

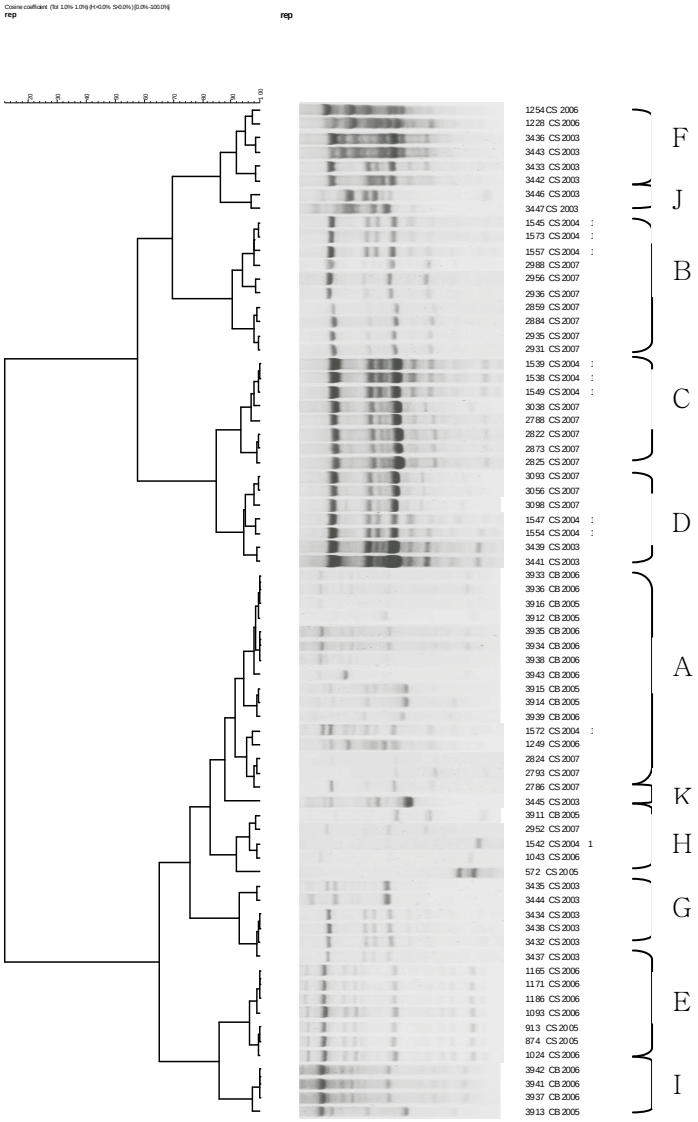

Fig. 4. The dendrogram, which was generated after REP-PCR analysis of isolates tested, disclosed genetic diversity, which suggests that the horizontal spread of Integron-*IS26* is occurring among genetically diverse strains of IRAB.

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20047415	과 정	박사
성 명	한글: 정옥연 한문 : 鄭玉燕 영문 : Ok-Yeon Jeong				
주 소	광주시 동구 지산동 삼성아파트 2 동 902 호				
연락처	E-MAIL : jung3926@hanmail.net				
논문제목	한글 : Imipenem 내성 *Acinetobacter baumannii* 임상분리주 에서 특정 인테그론의 보유율 및 전파양상 영문 : Prevalence and Spread of a Specific Integron among Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5 년으로 하고, 기간종료 3 개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1 개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 조건부 동의( ) 반대( )

2007 년 10 월 18 일

저작자: 정 옥 연 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하