



## ORIGINAL ARTICLE

# High Prevalence and Genotypic Characterization of Metallo- $\beta$ -Lactamase (MBL)-Producing *Acinetobacter* spp. Isolates Disseminated in a Korean Hospital

Jong Hwa Yum

Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan, Korea

## 국내 대학병원에서 분리된 Metallo- $\beta$ -Lactamase (MBL) 생성 *Acinetobacter* spp. 분리주의 높은 출현율과 유전형 특징

염중화

동의대학교 임상병리학과

## ARTICLE INFO

Received September 22, 2019  
Revised 1<sup>st</sup> October 2, 2019  
Revised 2<sup>nd</sup> October 7, 2019  
Accepted October 8, 2019

## Key words

*Acinetobacter* spp.  
*bla*<sub>IMP-6</sub>  
*bla*<sub>VIM-2</sub>  
Carbapenem resistant  
Metallo- $\beta$ -lactamase

## ABSTRACT

Carbapenem resistance, mediated by the major acquired metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) genes, has been increasingly reported, particularly for clinical isolates of *Acinetobacter* spp. Of the 191 nonduplicate clinical isolates of the carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. evaluated, 125 isolates (65.4%) were positive for the modified imipenem or meropenem-Hodge test, and 49 isolates (25.7%) were positive for the imipenem-EDTA+SMA double disk synergy test (DDS). PCR and sequencing of the *bla*<sub>VIM-2</sub>-allele and *bla*<sub>IMP-1</sub>-allele showed that 29 *A. baumannii* isolates and 1 *A. calcoaceticus* isolate had *bla*<sub>VIM-2</sub>, whereas 16 *A. baumannii* isolates and 2 *A. calcoaceticus* isolates had *bla*<sub>IMP-6</sub>; 1 isolate of the *A.* genomospecies 3 had *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>AIM-1</sub>. All the above MBL genes belong to class 1 integron. The size of class 1 integron encompassing *bla*<sub>VIM-2</sub> or *bla*<sub>IMP-6</sub> ranges from 2.8 kb to 3.2 kb in clinical isolates of *A. baumannii*, and 3.2 kb to 3.5 kb in clinical isolates of *A.* genomospecies 3. *bla*<sub>VIM-2</sub> was most often located first or second in the class 1 integron, and these integrons often included *aacA4*. Due to dispersion of the MBL-producing *Acinetobacter* spp. as well as integron, which may encompass various resistance genes, there is an expectation for the increase of multidrug resistant Gram-negative bacteria, including resistance of carbapenems such as imipenem or meropenem. Hence, the development of new antimicrobial agents for treating severe *Acinetobacter* spp. infections is needed.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

## 서론

다제 내성 *Acinetobacter* spp.에 의한 감염이 증가하고 있

어 이들 세균에 의한 감염증 치료에 어려움이 자주 발생하고 있다[1]. 이들 균종은 신속한 집락화와 감염으로 인해 병원 환경에서 가장 까다로운 병원균 중 하나로 취급된다. *Acinetobacter* spp.은 폐렴, 패혈증, 심내막염, 창상감염, 요로감염, 수막염 등 다양한 감염증의 원인균으로 알려져 있으며[1-5], 주요한 원내 감염균이기도 하다[6]. Carbapenem은 *Acinetobacter* spp. 감염에 가장 우수한 약제로 알려져 있으나, carbapenem 내성

\* Corresponding author: Jong Hwa Yum  
Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, 176 Eomgwang-ro,  
Busanjin-gu, Busan 47340, Korea  
E-mail: auxotype@deu.ac.kr  
\* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9264-1347>

*Acinetobacter* spp.의 증가를 막기위해 이들 약제는 제한적으로 사용하고 있다.

Carbapenem 내성에 관여하는 기전은 carbapenem 가수분해  $\beta$ -lactamase (carbapenemase), 막 투과 감소 및 efflux pump의 활성이 있다[7, 8]. Carbapenemase는 serine- $\beta$ -lactamase와 metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)가 주요 효소이다. MBL은 분자구조에 따라 6가지 형으로 나뉘며, IMP, VIM, GIM, SIM, AIM 및 SPM 형이 있다[9-11]. 이들 MBL 중 IMP, VIM 및 SIM과 같은 MBL 유전자는 흔히 integron에 위치하여 플라스미드 등과 관련하여 동종간 혹은 이종간 전파가 용이하다[10]. IMP 및 VIM형 및 그 외 class B metallo- $\beta$ -lactamase 생성 그람음성 막대균이 임상 검체에서 분리율이 계속적으로 증가하고 있다[12, 13]. MBL 중 VIM의 경우 1997년 프랑스에서 분리된 *P. aeruginosa*에서 class 1 integron에 위치한 *bla*<sub>VIM-2</sub>가 검출되었으며[14], 여러 나라에서 점차 출현율이 증가하고 있다. 또한, MBL 유전자 중 하나인 *bla*<sub>IMP-1</sub>은 1988년 일본에서 처음 보고되었으며[15], 이들 MBL 변이종은 점차 증가하고 전파 확산되고 있다. 2003년 국내 임상에서 분리된 *Acinetobacter* spp. 267주중 MBL 생성 균주는 38주(14.2%)이었으나[16], 지속적인 증가 추세가 있다. 또한, 최근 권 등은 IMP-1 생성 균주가 대부분이었고, NDM-1 생성 균주가 2주 검출된 바 있으며, IMP-1과 NDM-1을 동시 생성하는 *A. pittii*를 국내에서 분리 보고한 바 있다[17]. 따라서, 본 연구에서는 국내 유행하는 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.의 빈도를 조사하고 integron에 위치한 MBL 유전자의 유전형질을 규명하고 이들 분리 균주들의 항균제 내성 양상을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 수집

2005년부터 2009년까지 국내 경기지역 일개 대학병원 임상 검체에서 분리된 *Acinetobacter* spp. 중 imipenem 혹은 meropenem에 대하여 비감수성 균주 191주를 수집하였으며, 한 환자에서 중복 분리된 균주는 제외하였다. 균종 동정은 전통적인 생화학방법과 상품화된 키트(ID 32 GN system, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하였다.

### 2. 분자유전학적 동정

16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 균종 동정하였다. 시험 균주를 부유시킨 멸균수 100  $\mu$ L를 100°C에서 12분간 증

탕 후 4°C에서 13,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상청액 10  $\mu$ L를 주형 DNA로 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 시발체는 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'과 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'를 사용하였으며, Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다[17]. 중합효소연쇄반응 조건은 94°C 5분 pre-denaturation 후, 94°C 20초 denaturation, 50°C 40초 annealing, 72°C 2분 extension의 과정을 35회 반복 후 72°C 5분 extension을 실시하였다. 중합효소연쇄반응 산물은 전기영동하여 band를 확인한 후에 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 증폭된 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA는 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 유전자의 염기서열을 GenBank data base의 DNA 염기서열과 비교분석하였다.

### 3. Carbapenemase 생성 균주의 선별

Imipenem 혹은 meropenem을 이용한 Hodge 변법 시험을 시행하고, *E. coli* ATCC 25922를 지시세균으로 이용하였다. *E. coli* ATCC 25922를 McFarland No. 0.5 탁도관에 맞추어 MacConkey agar에 멸균된 면봉을 이용하여 고르게 접종한 후, 중앙에 imipenem 혹은 meropenem 10  $\mu$ g disk (Oxoid, Cambridge, UK)를 얹고 시험 균을 한 줄로 획선하여 36°C에서 18시간 배양하였다. 시험 세균 주변을 따라 지시세균의 성장이 증가하면 양성으로 판독하여, carbapenemase 생성 *Acinetobacter* spp.로 감별하여 분리 수집하였다[18-20].

### 4. Carbapenem-EDTA+SMA double disk synergy 시험

Imipenem 혹은 meropenem-Hodge 변법시험에 양성인 균주는 imipenem 혹은 meropenem과 EDTA+sodium mercaptoacetic acid (SMA) double disk synergy 시험 (DDS)을 시행하였다[19, 20]. 시험균주를 McFarland 0.5관 탁도로 조정하여 Muller hinton agar에 고르게 접종한 후, imipenem 혹은 meropenem 10  $\mu$ g disk와 760  $\mu$ g EDTA+2 mg SMA disk를 가장자리가 10 mm 간격으로 놓고 36°C에서 18시간 배양하였다. 두 디스크 사이의 억제대가 커지면 MBL 생성 균주로 판독하였고, 이들 세균은 20% skim milk에 부유하여 -70°C에 보관하여 시험에 사용하였다.

## 5. MBL 유전자 분석

중합효소연쇄반응법(PCR)을 이용하여, MBL 유전자인 *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>AIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> 및 *bla*<sub>SIM-1</sub> 유전자를 검출하였다. 시험에 사용한 시발체는 Table 1에 나타내었다. 균주를 멸균수 100 µL에 부유하여 10분간 증탕하고 13,000 rpm에서 2분간 원심후 상청액을 주형 DNA로 이용하였다. 중합효소연쇄반응 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 주형 DNA 1 µL, 20 pmol의 시발체 1 µL, 증류수 17 µL를 첨가하여 최종 20 µL으로 반응하였다. Mastercycler Gradient 5331 (Eppendorf)를 이용하여 94°C 4분 predenaturation, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 45초의 조건으로 30회 반응하고 72°C 7분간 extension하여 반응을 종료하였다. 중합효소연쇄반응 산물의 확인은 1% agarose gel에서 100 V 30분간 전기영동하고, 중합효소연쇄반응 산물의 크기 추정을 위하여 500 bp DNA ladder (Takara, Shiga, Japan)를 사용하였다[9]. 중합효소연쇄반응 산물은 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 유전자의 염기서열을 분석하였다.

## 6. Integron 유전자 분석

Class 1 integron은 중합효소연쇄반응법에 의해 검출하였고, Riccio 등이 제시한 시발체를 사용하였다[21]. 중합효소연쇄반응 조건은 Levesque 등의 방법을 변형하여 시행하였다[22]. 중합효소연쇄반응은 3U LA Taq DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan)에 주형 DNA 5 µL, 20 pmol의 시발체 5'CS-F와 3'CS-R 1 µL를 첨가하고, 최종 100 µL로 반응하였다. 중합효소연쇄반응은 Mastercycler Gradient 5331

(Eppendorf)를 이용하여 predenaturation 94°C 12분, 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 5분으로 35회 시행하였다. 매 회마다 extension 시간은 5초씩 증가시켰다. Integrase 유전자, *intI1*, *intI2* 및 *intI3*의 검출은 Shibata 등이 제시한 시발체와 중합효소연쇄반응 조건으로 시행하였다[23].

중합효소연쇄반응 산물은 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

## 7. 항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 CLSI [24]의 권고에 따라 10<sup>4</sup> colony forming units의 접종액을 Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, USA)에 접종하여 고체한천희석법으로 시행하였다. *E. coli* ATCC 25922와 *P. aeruginosa* ATCC 27853를 항균제 감수성 시험에 참조균주로 사용하였다. 시험에 사용한 항균제는 ampicillin과 cephalothin (Sigma Chemical Co., USA), piperacillin (Wyeth, USA), sulbactam (Pfizer Korea, Seoul, Korea), ceftazidime (GlaxoSmithKline, UK), cefotaxime (Handok, Korea), cefoxitin과 imipenem (Merck Sharp & Dohme, USA), meropenem (Sumitomo, Japan), aztreonam (Bristol-Myers Squibb, USA), amikacin (Dong-A Pharmaceutical, Seoul, Korea), ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, China), 그리고 colistin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이었다.

## 결 과

### 1. Carbapenemase 생성 *Acinetobacter* spp. 선별

국내 대학병원에서 환자에서 분리된 imipenem 혹은 me-

**Table 1.** Primers used for detection or sequencing of the MBL genes

Target	Primer	Sequence (5' to 3')	Size of product	Gene bank accession number
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	IMP1-F	CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT	448 bp	AB753459.1
	IMP1-R	ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC		
<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	VIM2-FR-F	ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG	801 bp	AF191564
	VIM2-FR-R	CTA CTC AAC GAC TGA GCG		
<i>bla</i> <sub>AIM-1</sub>	AIM1-F	ATG AAA CGT CGC TTC ACC CTG	912 bp	AM998375
	AIM1-R	TCA AGG CCG CGC GCC CC		
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	VIM1-F	CAC TTC TCG GCG GAG ATT GAA	495 bp	KC417378.1
	VIM1-R	GTG CTT TGA CAA CGT TCG CT		
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	NDM1-F	TCG CAC CGA ATG TCT GGC AGC A	454 bp	KF699332.1
	NDM1-R	AAA GCG ATG TCG GTG CCG TCG A		
<i>bla</i> <sub>SIM-1</sub>	SIM1-F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	571 bp	AY887066.1
	SIM1-R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG		

ropenem 내성 *Acinetobacter* spp. 191주에 대하여 imipenem 혹은 meropenem-Hodge 변법 시험을 시행하였다. Imipenem에 의해서는 *A. baumannii* 121주, *A. calcoaceticus* 3주 및 *A. genomospecies* 3 1주가 양성을 보였으며, meropenem에 의해서는 *A. baumannii* 가 74주, *A. calcoaceticus* 2주, *A. genomospecies* 3 1주가 양성을 보여 총 125주의 carbapenemase 생성 균주를 검출하였다(Table 2). *Acinetobacter* spp. 균주를 대상으로 시행한 Hodge 변법 시험에서 meropenem 보다는 imipenem을 사용하는 것이 검출율이 높았다.

### 2. MBL 생성 균주

Imipenem 혹은 meropenem-Hodge 변법시험에 양성인 균주에 대하여 imipenem 혹은 meropenem-EDTA+SMA DDS 양성인 *Acinetobacter* spp.는 imipenem에 의해서는 49주, meropenem에 의해서는 11주가 MBL생성 균주가 검출되었다(Table 3). MBL 생성 *Acinetobacter* spp. 균주 검출시 DDS 시험에서 meropenem 보다 imipenem을 사용하는 것이 4배 이상 검출율이 높았다.

### 3. MBL 유전자 및 Integron

Imipenem 혹은 meropenem-EDTA+SMA DDS 양성인 49주의 MBL 유전자 검출을 위하여 중합효소연쇄반응법을 이용하였다. *A. baumannii* 29주와 *A. calcoaceticus* 1주에서 *bla*<sub>VIM-2</sub> allele가 검출되었다(Table 3). 이들 균주들의 MBL 유

전형은 중합효소연쇄반응 산물을 염기서열 분석을 이용하여 모두 *bla*<sub>VIM-2</sub> 유전자임을 확인하였다. *A. baumannii* 16주와 *A. calcoaceticus* 1주에서 *bla*<sub>IMP-1</sub> allele가 검출되었으며, 염기서열 분석으로 이들 균주들의 MBL 유전형은 모두 *bla*<sub>IMP-6</sub>임을 확인하였다. *A. genomospecies* 3 1주에서 *bla*<sub>VIM-2</sub>와 *bla*<sub>AIM-1</sub>이 동시에 검출되었다. *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>IMP-6</sub> 및 *bla*<sub>AIM-1</sub>외의 *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>SIM</sub> 및 *bla*<sub>NDM</sub> allele는 검출되지 않았다. 이들 49 균주는 모두 class 1 integron이 검출되었다(Table 3). 또한, *bla*<sub>VIM-2</sub> 혹은 *bla*<sub>IMP-6</sub>를 갖는 integron은 *aacA4* 유전자를 흔히 갖고 있었고(data not shown), *A. baumannii*는 2.8 kb와 3.2 kb의 integron을 *A. calcoaceticus*는 3.2 kb와 3.5 kb의 integron을 *A. genomospecies* 3는 5.2 kb와 5.5 kb의 integron이 검출되었다.

MBL 생성 *Acinetobacter* spp.는 객담 검체에서 28주(57.14%), 삽관에서 9주(18.37%), 소변에서 7주(14.29%), 농에서 3주(6.12%) 및 그 외 검체에서 2주(4.08%)가 검출되었다(Table 4). MBL 생성 *A. baumannii*는 객담, 삽관 및 소변에서 각각 27주, 9주 및 6주로 객담에서 가장 많이 검출되었고, *A. calcoaceticus* 1주가 혈액에서 검출되었다. VIM-2 생성 *Acinetobacter* spp.는 객담 검체에서 19주, 삽관에서 5주, 소변에서 4주, 농에서 2주 및 창상에서 1주가 검출되었다. IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp.는 객담, 삽관 및 소변에서 각각 9주, 4주 및 3주가 검출되었고, 그 외 농과 혈액에서 각각 1주씩 검출되었다. VIM-2와 AIM-1을 동시에 생성하는 *A. genomospecies* 3 1주는 창상검체에서 검출되었다.

**Table 2.** Results of Hodge test, double disk synergy test of *Acinetobacter* spp.

Strains	No. of isolates	Hodge test positive strains		Double disc synergy test positive strains	
		Imipenem	Meropenem	Imipenem	Meropenem
<i>A. baumannii</i>	187	121	74	45	7
<i>A. calcoaceticus</i>	3	3	2	3	3
<i>A. genomospecies</i> 3	1	1	1	1	1
Total	191	125	77	49	11

**Table 3.** MBL gene types and integron classes of *Acinetobacter* spp.

Strains	No. of isolates					
	MBL gene type			Class of integron		
	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>	<i>bla</i> <sub>AIM-1</sub>	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>Int3</i>
<i>A. baumannii</i>	29	16	0	45	0	0
<i>A. calcoaceticus</i>	1	2	0	3	0	0
<i>A. genomospecies</i> 3	1	0	1	1	0	0
Total	31	18	1	49	0	0

**Table 4.** Specimens of MBL gene PCR-positive *Acinetobacter* spp. isolates

Specimens	No. (%) of MBL PCR-positive			No. (%) of isolates			
	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP-6</sub>	<i>bla</i> <sub>AIM-1</sub>	ABA	ACA	AG3	Total
Sputum	19	9	0	27	1	0	28 (57.14)
Catheter TIP	5	4	0	9	0	0	9 (18.37)
Urine	4	3	0	6	1	0	7 (14.29)
Pus	2	1	0	3	0	0	3 (6.12)
Blood	0	1	0	0	1	0	1 (2.04)
Wound	1	0	1	0	0	1	1 (2.04)
Total	31 (62.00)	18 (36.00)	1 (2.00)	45 (91.84)	3 (6.12)	1 (2.04)	49 (100)

Abbreviations: ABA, *A. baumannii*; ACA, *A. calcoaceticus*; AG3, *A. genomospecies* 3.

**Table 5.** MICs of antimicrobial agents for MBL-producing clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in a Korean hospital

MBL types	Strains (No. of isolates)	MIC range (μg/mL)											
		IPM	MEM	AZT	CTX	CAZ	CEP	FOX	SAM	PIP	AMK	CIP	COL
VIM-2	ABA (29)	16~64	8~64	16~128	>128	64~>128	>128	64~>128	32~>128	64~>256	4~>128	0.25~64	0.25~4
	ACA (1)	16	8	64	>128	>128	>128	>128	64	>256	32	32	0.5
IMP-6	ABA (16)	8~32	8~32	4~64	>128	64~>128	>128	>128	32~>128	64~256	128~>128	0.5~64	0.25~0.5
	ACA (2)	16	16	32~64	>128	>128	>128	>128	32~64	128~>128	128	16	0.5
VIM-2 +AIM-1	AG3 (1)	32	16	32	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	64	0.5

Abbreviations: IMP, imipenem; MEM, meropenem; AZT, aztreonam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CEP, cephalothin; FOX, cefoxitin; SAM, ampicillin/sulbactam; PIP, piperacillin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; ABA, *A. baumannii*; ACA, *A. calcoaceticus*; AG3, *A. genomospecies* 3.

#### 4. MBL 생성 *Acinetobacter* spp.에 대한 항균제 감수성

VIM-2 생성 *A. baumannii*에 대한 imipenem과 meropenem의 MIC는 각각 16~64 μg/mL와 8~64 μg/mL이었고, ampicillin/sulbactam의 MIC는 32~128 μg/mL이었고, cefotaxime, ceftazidime 및 cefoxitin의 MIC는 각각 >128 μg/mL, 64~>128 μg/mL, 그리고 64~>128 μg/mL이었고, 대부분의 β-lactam제에 높은 MIC값을 보였다(Table 5). Aztreonam의 MIC는 16~128 μg/mL로 비교적 낮은 MIC를 보이는 균주도 있었다. Amikacin의 MIC는 4~>128 μg/mL이었고, colistin의 MIC는 0.25~4 μg/mL로 비교적 낮은 값을 나타냈다. VIM-2 생성 *A. calcoaceticus*는 *A. baumannii*와 유사한 결과를 보였고, colistin의 MIC는 0.5 μg/mL로 감수성이었다. IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp.에 대한 imipenem과 meropenem의 MIC는 모두 8~32 μg/mL로 MIC값이 유사한 경향을 보였다(Table 5). 이들 균주에 대한 ampicillin/sulbactam의 MIC는 32~>128 μg/mL이었고, cefotaxime, ceftazidime, cefoxitin 및 aztreonam의 MIC

는 각각 >128 μg/mL, 64~>128 μg/mL, >128 μg/mL 및 4~64 μg/mL이었다. Amikacin의 MIC는 128~>128 μg/mL으로 IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp.는 대부분의 β-lactam 제에 대해 모두 높은 MIC 값으로 내성을 보였다. Colistin의 MIC는 0.25~0.5 μg/mL이었고, 이들 IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp. 모두 감수성이었다. AIM 생성 *A. genomospecies* 3 균주에 대한 imipenem과 meropenem의 MIC는 각각 32 μg/mL 과 16 μg/mL로 meropenem의 MIC값이 약간 낮았고, 다른 시험 항균제에 대해서는 *Acinetobacter* spp.와 유사한 결과를 보였다.

#### 고 찰

2010년 *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa* 및 *A. baumannii* 등과 같은 그람음성 막대균을 대상으로 carbapenemase 생성균 선별에 imipenem-Hodge 변법시험이 유용함을 Lee 등이 발표한 바 있다[19, 20, 25]. 본 연구에서 imipenem 혹은 meropenem-Hodge 변법시험을 시행한

결과, *A. baumannii* 121주, *A. calcoaceticus* 3주 및 *A. genomospecies* 3 1주가 imipenem-Hodge 변법 시험에 양성을 보였으며, *A. baumannii* 가 74주, *A. calcoaceticus* 2주, *A. genomospecies* 3 1주가 meropenem-Hodge 변법 시험에 양성을 보여 총 125주의 carbapenemase 생성 *Acinetobacter* spp.를 검출하였다(Table 2). *Acinetobacter* spp. 균주를 대상으로 carbapenemase 생성 균주 검출시 Hodge 변법시험에 meropenem보다는 imipenem을 사용하는 것이 일선 검사실에서 균주 선별을 위해서는 유용성이 높은 것으로 나타났다. 그러나, *A. baumannii* 6주는 imipenem-Hodge 변법시험에서 음성을 보였으나 Meropenem-Hodge 변법시험에서 양성을 보여(data not shown), imipenem 디스크와 meropenem 디스크를 동시에 사용하는 것이 carbapenemase 생성 *Acinetobacter* spp. 선별시 검출율을 높일 수 있는 것으로 나타났다.

일선 검사실에서 그람음성 막대균 중 MBL 생성 균주를 선별시 carbapenem-DDS 시험에 imipenem 디스크를 흔히 사용하여 한다[19, 20]. 그러나, 일본의 Arakawa 등은 IMP-1을 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa* 및 *Serratia marcescens* 등의 그람음성 세균 중 MBL 생성 균주 선별에 사용하는 DDS 시험에 caftazidime을 이용하는 것이 유리하다고 보고한 바 있다[26]. 그러나, MBL 생성 균주 선별에 imipenem-DDS 시험이 효율적이라고 보고한 연구자도 있다[19, 20]. 본 연구에서 imipenem 혹은 meropenem 내성 *A. baumannii* 121주를 대상으로 유사 항균제인 imipenem과 meropenem을 사용한 DDS 시험에서 imipenem-DDS 시험에서 45주가 양성이고, meropenem-DDS 시험에서 7주가 양성으로 나타나(Table 3), imipenem 디스크를 사용하는 것이 meropenem을 사용하는 것 보다 6배 이상 효과적이었다. 이는 MBL 생성 세균 중에는 imipenem과 meropenem에 대한 가수분해 활성 차이로 인해 meropenem을 이용한 DDS 시험에 음성 결과를 보이는 경우가 있는 것으로 추정된다. 따라서, 일선 검사실에서 MBL 생성 *Acinetobacter* spp. 검출시 DDS 시험에 imipenem 디스크를 사용하는 것이 효율적인 것으로 판단된다.

Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART)의 조사 연구에서 7개의 주요 대형병원의 중환자실에서 검출한 *A. baumannii* complex 138주 중 객담, 혈액 및 소변 검체에서 각각 115주, 9주 및 6주가 검출되어 주로 이들 균주는 객담에서 많이 검출되는 것으로 발표한 바 있다[27]. 본 연구에서 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.는 객담에서

28 (57.14%)주가 검출되어 가장 많았고, 삼관과 소변 검체에서 각각 9 (18.38%)주와 7 (14.29%)주가 검출되어 유사한 검출율을 보였다.

Yong과 Yum 등은 국내 대학병원에서 imipenem 내성 *Acinetobacter* spp.는 1998년 이미 높은 분리율을 보고한 바 있고, 이들 세균은 1주는 *bla*<sub>IMP-1</sub>을 가지고 있었고, 13주는 *bla*<sub>VIM-2</sub>를 가지고 있었고[28, 29], 계속적으로 이들 세균은 높은 분리율을 보였다. 2004년 국내에서 분리한 *Acinetobacter* spp.중 30%가 imipenem에 내성이었고, 이들 내성 균주의 27%정도는 MBL 생성 균주이었고, 이들 균주가 가지는 MBL은 integron에 위치한 *bla*<sub>VIM-2</sub> allele가 64%, *bla*<sub>IMP-1</sub> allele가 29%, 그리고 *bla*<sub>SIM-1</sub> allele가 7%로 높은 빈도를 보였다[29].

Imipenem에 내성인 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.에 대한 분자생물학적 역학조사를 미국, 폴란드, 그리스 및 이태리 등 지역이나 국가에서 시행하여 보고하였다[21, 27, 30, 31]. 최근 이들 지역 연구에서 IMP와 VIM형 MBL의 출현이 만연한 것으로 나타났다. 국내에서는 거리가 먼 유럽지역에서는 MBL 생성 그람음성 막대균에서 *bla*<sub>VIM</sub>형이 높은 빈도로 검출되고, 상대적으로 가까운 거리의 일본에서는 *bla*<sub>IMP-1</sub> 형이 주로 검출되었으나, 국내에서는 1995년 이후 *bla*<sub>VIM-2</sub>형 MBL이 이 일정한 기간 동안 계속적으로 검출되었다[14, 32, 33]. 일본에서 발견된 *bla*<sub>IMP-6</sub>이 국내 그람음성 세균에서도 출현하고 있다. IMP-6은 IMP-1과 비교하여 하나의 아미노산 서열만이 바뀌어 (Ser196Gly) penicillin에 대한 활성은 감소되고 meropenem에 대한 활성이 증가한 것으로 알려져 있다[34]. 2009년부터 국내에서 검출된 MBL 생성 *P. aeruginosa*과 같은 그람음성 막대균에서 IMP-6 생성 균의 출현이 증가한 것으로 보고하였다 [35].

본 연구에서는 MBL 생성 *A. baumannii* 29주와 *A. calcoaceticus* 1주에서 *bla*<sub>VIM-2</sub>를 검출하였고, *A. baumannii* 16주와 *A. calcoaceticus* 2주에서 *bla*<sub>IMP-6</sub>가 검출되었고 *A. genomospecies* 3 1주에서 *bla*<sub>VIM-2</sub>와 *bla*<sub>AIM-1</sub>이 동시에 검출되어 국내 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.는 *bla*<sub>VIM-2</sub>와 *bla*<sub>IMP-6</sub>가 주로 전파되고 있고, *bla*<sub>AIM-1</sub>를 가지는 세균도 출현하는 것으로 나타났다(Table 3). 따라서, 국내에서 유행하는 MBL 생성 *Acinetobacter* spp. 간에는 *bla*<sub>IMP-6</sub>보다 *bla*<sub>VIM-2</sub>가 보다 많이 전파확산되고 있고, 이들 내성 유전자에 의한 imipenem 혹은 meropenem에 대한 내성 세균이 증가할 것으로 판단된다.

2003년, 국내에서 SIM 생성 *A. baumannii* 6주가 출현하였는데, 이 SIM 유전자는 class 1 integron에 있었다[9]. 내성 유

전자가 integron에 위치하는 경우, 이들 유전자의 전달이 용이할 수 있는데, 본 연구에서 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.에서 SIM 유전자는 검출되지 않았다(Table 3, 4). 이는 VIM과 IMP 효소에 비해 SIM은 imipenem이나 meropenem에 대한 가수분해능이 상대적으로 낮아, 해당 항균제 압력이 있을 때 VIM이나 IMP와 같은 내성 유전자를 보다 더 잘 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한, 과거 국내에서 출현한 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.는 IMP-1을 주로 생성하였으나, 본 연구에서 IMP-6 생성 균주가 증가하는 이유는 IMP-6가 meropenem에 대한 가수분해 활성이 높은 것으로 판단되며, IMP-6 생성 균주는 계속적으로 증가할 것으로 예상된다.

*bla<sub>VIM-2</sub>*는 흔히 integron에 위치하는데, *bla<sub>VIM-2</sub>*가 위치한 integron의 크기와 카세트 배열은 다양하게 보고되었다[14, 32, 33, 36-38]. 캐나다에서 출현한 *bla<sub>VIM-2</sub>*를 갖는 integron은 *aacCI*와 *aacA4*를 함께 가지고 있었고[39], 미국에서 출현한 *bla<sub>VIM-2</sub>*를 갖는 integron은 *bla<sub>VIM-2</sub>*는 두번째 카세트에 위치하고, *aacA7*, *dhfr* 및 *aacC-A5*를 함께 가지고 있었다[37]. 국내에서 2002년 Yum 등이 보고한 MBL 생성 *A. baumannii*와 *Acinetobacter* genomospecies 3는 첫번째 카세트에 위치한 *bla<sub>VIM-2</sub>*를 갖는 integron, In105는 *aacA7*와 *aadA1*을 갖고 있었고, In106은 *aacA4*와 *aadA1*을 갖고 있었다[28].

본 연구에서는 *bla<sub>VIM-2</sub>* 혹은 *bla<sub>IMP-6</sub>*를 갖는 integron은 *aacA4* 유전자를 흔히 갖고 있었고(data not shown), *A. baumannii*는 2.8 kb와 3.2 kb의 integron을 *A. calcoaceticus*는 3.2 kb와 3.5 kb의 integron을 *A. genomospecies 3*는 5.2 kb와 5.5 kb의 integron이 검출되었다(Table 3). 또한 한 균주가 2개 이상의 integron을 흔히 가지고 있었다. 본 결과로 보아, *Acinetobacter* spp.는 시기와 지역에 따라 MBL 유전자 뿐 아니라 다양한 내성 유전자를 갖는 integron을 흔히 2개 이상 가질 수 있는 것으로 보인다.

VIM-2 생성 *Acinetobacter* spp.와 IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp.에 대한 imipenem의 MIC는 각각 16~64 µg/mL과 8~32 µg/mL이었고, meropenem의 MIC는 8~64 µg/mL과 8~32 µg/mL로 비교적 높은 값으로 내성이었고, ampicillin/sulbactam을 포함하여 대부분의 β-lactam제제의 MIC가 높고 ciprofloxacin과 같은 다른 계열 항균제의 MIC도 높은 균주도 많았다(Table 5). 이에 반해 colistin의 MIC는 0.25~4 µg/mL로 낮아 대부분 감수성이었다. 그러나, colistin의 사용이 증가한다면, 이들 항균제에 대한 내성도 증가할 것으로 예상되므로, *Acinetobacter* spp. 감염증 치료를 위한 새로운 항균제의 개발이 필요해 보인다.

MBL 생성 *Acinetobacter* spp.는 국내에서 계속적으로 높은 검출율을 보이고 있다. VIM-2 생성 *Acinetobacter* spp.는 1990년대 이후로 계속적으로 높은 검출율을 보이고 있으며, IMP-6 생성 *Acinetobacter* spp. 점진적으로 증가하고 있는 추세이다. Sung 등은 2015년, IMP-1 생성 균주가 대부분이었고, IMP-1과 NDM-1을 동시 생성하는 *A. pittii*를 국내에서 분리 보고한 바 있다[17]. 호주에서 2012년, 검출된 AIM-1 생성 *P. aeruginosa*가 출현한[11] 이후 많은 보고가 없는 AIM-1과 VIM-2를 동시에 생성하는 *A. genomospecies 3*도 나타나고 있어, 이들 MBL에 의한 carbapenem 내성 그람음성 세균의 증가가 예상되므로 이들 균주의 추가 확산 전파를 효과적으로 방지하기 위한 정책과 감염관리가 필요해 보인다. 또한, 다양한 나라와 지역의 의료기관에서 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.뿐 아니라 다양한 내성유전자를 가질 수 있는 integron을 갖는 균주와 유전체의 전달로 imipenem과 같은 carbapenem을 포함한 다제 내성 그람음성 세균 출현의 증가가 예상되므로, 계속적이고 체계적인 분자 역학적 조사연구 등이 필요하다.

## 요 약

주요 획득성 metallo-β-lactamase (MBL) 유전자에 의해 매개되는 carbapenem 내성, 특히 *Acinetobacter* spp. 균종의 임상 분리주에 대한 보고가 증가하고 있다. 본 연구에서 임상에서 비 중복으로 분리된 carbapenem 비감수성 *Acinetobacter* spp. 191주 중 125 (65.4%)주가 imipenem 혹은 meropenem-Hodge 변형시험에 양성하였고, 49 (25.7%)주가 imipenem-EDTA+SMA double disk synergy (DDS) 시험에 양성이었다. *bla<sub>VIM-2</sub>* allele와 *bla<sub>IMP-6</sub>* allele 검출을 위한 중합효소연쇄반응과 염기서열분석을 시행한 결과, *A. baumannii*와 *A. calcoaceticus*에서 각각 29주와 1주가 *bla<sub>VIM-2</sub>*를 갖고 있었고, *A. baumannii* 16주와 *A. calcoaceticus* 2주가 *bla<sub>IMP-6</sub>*를 갖고 있었다. *A. genomospecies 3*는 *bla<sub>VIM-2</sub>*와 *bla<sub>AIM-1</sub>*을 동시에 갖고 있었다. 이들 MBL 유전자는 모두 class 1 integron에 있었다. *bla<sub>VIM-2</sub>* 혹은 *bla<sub>IMP-6</sub>*를 갖는 class 1 integron의 크기는 *A. baumannii* 분리주에서는 2.8 kb에서 3.2 kb이었고, *A. genomospecies 3* 분리주에서는 3.2 kb에서 3.5 kb이었다. *bla<sub>VIM-2</sub>*는 대부분 class 1 integron에 첫번째 혹은 두번째에 위치하였고, *aacA4*를 흔히 가지고 있었다. 다양한 내성 유전자를 가질 수 있는 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.뿐 아니라 다양한 내성 유전자를 가질 수 있는 integron의 전파로 imipenem이나 meropenem과 같은 carbapenem

내성을 포함하여 다제 내성 그람음성 세균의 증가가 예상된다. 또한, 위중한 *Acinetobacter* spp. 감염증 치료를 위한 새로운 항균제 개발이 필요하다.

**Acknowledgements:** I thank Prof. Hyukmin Lee Yonsei University College of Medicine, Republic of Korea for providing clinical isolates collection. This work was supported by Dong-eui University Grant (201902050001).

**Conflict of interest:** None

**Author's information (Position):** Yum JH, Professor.

## REFERENCES

- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>.
- Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2010;51:79-84. <http://doi.org/10.1086/653120>.
- Jose G-M, Rosario A-V. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:332-339. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833ae38b>.
- Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection—an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 2011;63:1048-1054. <https://doi.org/10.1002/iub.534>.
- Chusri S, Chongsuvivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:4172-4179. <https://doi.org/10.1128/AAC.02992-14>.
- Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect.* 2012;64:282-290. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.12.008>.
- Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti. A. *Acinetobacter baumannii*: a brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. *J Clin Diagn Res.* 2013;7:2602-2605. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6337.3626>.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>AIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4485-4491. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4485-4491.2005>.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306-325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>.
- Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>AIM-1</sub>, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6154-6159. <https://doi.org/10.1128/AAC.05654-11>.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:489-495.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:673-679. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf210>.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J-D, 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;44:891-897. <https://doi.org/10.1128/aac.44.4.891-897.2000>.
- Watanabe JJ, Ko WC, Wu JJ. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;45:1343-1348.
- Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y, et al. VIM and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:868-871. <https://doi.org/10.3201/eid0907.020753>.
- Sung JY, Koo SH, Kim S, Kwon GC. Emergence of *Acinetobacter pittii* harboring New Delhi metallo-beta-lactamase genes in Daejeon, Korea. *Ann Lab Med.* 2015;35:531-534. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.5.531>.
- Löffler FE, Sun Q, Li J, Tiedje JM. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1369-1374. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1369-1374.2000>.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:88-91.
- 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 clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4623-4629. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4623-4629.2003>.
- 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;44:1229-1235. <https://doi.org/10.1128/aac.44.5.1229-1235.2000>.
- Levesque C, Piche L, Chantal L, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:185-191. <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.185>.
- Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003;43:458-461. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5407-5413>.



- 2003.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests: approved standards M2-A8, 27th ed. Wayne PA: CLSI; 2017.
  25. Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods*. 2010;83:149-152. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.010>.
  26. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase producing gram negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38:40-43.
  27. Lai CC, Chen YS, Lee NY, Tang HJ, Lee SS, Lin CF, et al. Susceptibility rates of clinically important bacteria collected from intensive care units against colistin, carbapenems, and other comparative agents: results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). *Infect Drug Resist*. 2019;12:627-640. <https://doi.org/10.2147/IDR.S194482>.
  28. 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*<sub>VIM-2</sub> gene cassettes. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:837-840. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf043>.
  29. Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, et al. Increasing prevalence and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and Enterobacteriaceae from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1884-1886. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1884-1886.2006>.
  30. Fiett J, Baraniak A, Mrowka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk L, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo- $\beta$ -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:880-886. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.880-886.2006>.
  31. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:61-70. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh512>.
  32. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1584-1590.
  33. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1053-1058. <https://doi.org/10.1128/aac.46.4.1053-1058.2002>.
  34. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1343-1348. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1343-1348.2001>.
  35. Seok Y, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lee H, Lee K. Dissemination of IMP-6 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2791-2796. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr381>.
  36. Quinteira S, Souse JC, Peixe L. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-beta-lactamase and a carbencillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:451-453. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.451-453.2005>.
  37. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, Quinn JP. First Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3538-3540. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3538-3540.2005>.
  38. Kim I-S, Lee NY, Ki C-S, Oh WS, Peck KR, Song J-H. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo- $\beta$ -lactamase producers in a Korean Hospital. *Microb Drug Resistance*. 2005;11:355-358. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.355>.
  39. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol*. 2007;43:458-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.01694-06>.