

병원하수로부터 분리한 Gentamicin 저항성 세균에서 Tn3에 의한 *aac(3)II*의 발현 증가

한효심 · 이문숙 · 정재성*

순천대학교 생명과학전공

Gentamicin에 저항성을 나타내는 세균을 병원 하수로부터 분리하여 aminoglycoside-(3)- N-acetyltransferase를 암호화하는 유전자인 *aac(3)II*의 존재 여부를 dot-blot hybridization으로 조사하였다. *aac(3)II* 유전자의 일부를 탐침으로 사용한 결과 gentamicin 저항성 세균의 41% (39/95)가 이 유전자를 가지고 있었다. *aac(3)II*와 Tn3에서 각각 설계된 primer를 사용한 PCR 결과 *aac(3)II*를 가지고 있는 39개 균주 중 13개 균주가 Tn3-*aac(3)II* 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다. *aac(3)II*의 상류에 Tn3를 가지고 있는 13개 균주의 gentamicin에 대한 최소억제농도는 가지고 있지 않은 균주에 비해 상대적으로 높았다. 13개 균주를 동정한 결과 5개는 *Escherichia coli*, 3개는 *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter agglomerans*와 *Micrococcus luteus*가 각각 2개, 그리고 1개의 *Pseudomonas facilis*로 동정되었다. 이러한 결과들은 Tn3-*aac(3)II* 구조가 gentamicin 저항성 세균들에서 널리 분포하고 있음을 말해준다.

Key words □ *aac(3)II*, gentamicin resistance, Tn3

Gentamicin, tobramycin, amikacin 등과 같은 aminoglycoside계 항생물질은 감염성 질병을 치료하기 위해 병원, 축산농장 및 양어장 등에서 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나 항생물질 저항성 세균이 출현함에 따라 효율성이 점차 떨어지게 되고, 이들 저항성 세균이 폐수 등의 유출수를 통해 수계환경으로 유입됨으로써 생태계에서 저항성유전자의 빠른 전파의 원인이 되기도 한다(3, 19, 21, 22, 24, 30).

생태계에서 분리된 세균들이 aminoglycoside계 항생물질에 저항성을 나타내는 기전은 효소의 생산에 의한 항생물질의 화학적 변형과 항생물질이 세포막을 투과하지 못하도록 하는 두 가지로 크게 나뉜다. 일반적으로 20 µg/ml 이상의 항생물질에 저항성을 보이는 세균들의 대부분은 전자의 경우가 많고 후자의 경우는 주로 매우 낮은 수준에서 저항성을 나타내는 세균들에서 나타난다(10, 25, 31). Aminoglycoside계 항생물질의 변형효소에는 acetyltransferase, phosphotransferase, adenytransferase의 세 종류가 있으며 각각 *aac*, *aph*, *ant* 등의 유전자에 의하여 만들어진다(32). 많은 경우 이들 저항성 유전자는 중금속 저항성 유전자 등과 함께 plasmid에 존재하고 있으며(9, 11), 접합 및 형질전환 등에 의한 유전자의 전이도 자연환경에서 빈번히 일어나고 있다(5, 26, 27). 또한 transposon(Tn)이 염색체나(6, 12) plasmid DNA의(18, 28) 다양한 위치로 삽입됨으로써 항생물질 및 중금속에 대한 저항성 유전자의 발현과 전이에 관여한다는 연구들이 보고되고 있다.

우리는 전보에서 수계환경으로부터 분리한 gentamicin 저항성 세균에서 aminoglycoside acetyltransferase 유전자인 *aac(3)I*, *II*, *III* 및 *IV* 유전자의 분포를 보고하였고(22), 대장균에서 Tn3 염기 서열이 *aac(3)II* (*aacC2*로 불리기도 함) 유전자의 상류부위에 나타날 경우 이 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인한 바 있다(13, 17). 본 연구에서는 병원하수에서 gentamicin 저항성 세균을 분리하여 *aac(3)II* 유전자의 출현 빈도를 살펴보고 Tn3와 연관되어 저항성이 증가되는 유전자 구조를 갖는 균주를 동정함으로써 이러한 현상이 다양한 세균에서 일어나고 있음을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양조건

Gentamicin에 저항성을 나타내는 세균을 분리하기 위해 병원하수를 생리식염수 (0.85% NaCl)로 적절히 희석하여 15 µg/ml의 gentamicin이 첨가된 plate counting agar (PCA; tryptone 5 g, yeast extract 2.5 g, glucose 1 g, agar 15 g/L)에 도말 한 후 30°C에서 72시간 배양하여 단일 콜로니를 선별하였다.

DNA의 분리 및 정량

DNA의 분리는 gentamicin (15 µg/ml)이 첨가된 PC 액체배지에 균주를 포화배양한 후, Ausubel 등 (4)의 방법을 변형하여 사용하였다. 추출된 DNA의 양은 TKO100 fluorometer (Hoefer Scientific Instruments)를 사용하여 측정하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 061-750-3616, Fax: 061-750-3608
E-mail: jjung@sunchon.ac.kr

Dot-blot hybridization

Hybridization을 위한 probe는 *aac(3)III* 유전자를 가지고 있는 재조합 plasmid pSY1을 제한효소 *EcoRV*를 처리하여 얻은 437 bp의 DNA 절편을 GeneClean kit (Bio101)로 정제한 후 DIG-11-dUTP (DIG labeling and detection kit, Boehringer Mannheim)와 함께 37°C에서 20시간 반응시켜 사용하였다(22).

Gentamicin 저항성이 있는 95개의 균주에서 분리한 total DNA를 nylon membrane으로 이적시킨 후 제조된 probe DNA와 DIG DNA labeling and detection kit II (Boehringer Mannheim)를 이용하여 hybridization을 실행하였다. DNA가 이적되어 있는 nylon membrane을 probe DNA와 함께 68°C에서 16시간 반응시킨 뒤 nitroblue tetrazolium을 기질로 사용한 발색시약으로 발색시켜 유전자의 유무를 확인하였다.

PCR assay

aac(3)III 유전자의 상류에 Tn3가 존재하는지 알아보기 위해 PCR을 수행하였다. PCR primer는 Tn3의 3'부위에서 설계된 GenF (5'-TTT TCG TTC CAC TGA GCG-3')와 이 서열로부터 278 bp 떨어진 *aac(3)III* 유전자 부위에서 설계된 GenR (5'-CGC CAT TCA GAG TCT CCT-3')를 사용하였다(13).

PCR 반응액은 1 µl의 DNA (15 ng), 2 U의 Taq DNA polymerase (Takara), 5 µl의 10x buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 각각 1 µM의 primer, 200 µM의 deoxyribonucleoside triphosphates를 넣고 증류수로 최종 반응용액의 부피를 50 µl로 조절하였다. Perkin-Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension과정을 40회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 DNA 절편은 1.2% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

Gentamicin에 대한 최소저해농도 (MIC)의 측정

aac(3)III 유전자를 가지고 있음이 확인된 분리 균주들의 gentamicin에 대한 MIC 측정은 Lancini 등(20)의 방법을 변형하여 사용하였다. 포화상태까지 배양된 세균 배양액을 gentamicin이 농도별로 들어 있는 3 ml의 Luria-Bertani (LB; tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g/l, pH 7.0) 배지에 백금이로 접종하였다. 접종된 배양액을 37°C에서 16시간 진탕배양한 후 성장 여부를 판정하였다.

분리균주의 동정

aac(3)III 유전자와 Tn3를 동시에 가지고 있는 13개의 균주들에 대한 동정을 실시하였다. 형태학적 관찰을 위해 균주들을 PC 배지에 배양하여 그람 염색을 실시한 후 그람 음성, 양성 판별과 균주의 형태 등을 관찰하였다. 또한 API (analytical profile index) 20 NE kit (bioMerieux)와 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(8)에 따라 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. 세균 세포벽의 지방산 조성 분석에 의한 동정은 MIDI Microbial

Identity System (Newark)을 이용하여 실행하였다. 균주들을 blood agar (Difco)에서 37°C, 24시간 배양한 후 습균체 약 40 mg을 밀봉된 시험관 (13 × 100 mm)에 넣고 1 ml의 methanol/NaOH/H₂O 혼합물 (10:3:7)을 첨가하여 100°C에서 30분간 비누화시켰다. 실온에서 식힌 가수분해물에 2 ml의 methanolic HCl을 첨가하여 80°C에서 10분간 반응시킨 뒤 1.25 ml의 hexan/ether (1:1; v/v)를 첨가하여 10분간 반응시켰다. 여기에 3 ml의 0.3 N NaOH용액을 넣어 2,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 gas chromatography (Newark)의 분석용 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

Aminoglycoside계 항생물질에 대한 저항성 세균의 출현이 증가하고 있음에도 불구하고 이들 항생물질이 계속 사용되고 있는 이유 중 하나는 ampicillin이나 vancomycin과 같은 세포벽의 합성을 억제하는 항생물질과 함께 사용하였을 때 staphylococci나 enterococci 등에 의한 감염의 치료에 큰 효과를 나타내기 때문이다. Aminoglycoside계 항생물질에 대한 저항성 기전은 어떤 항생물질이 사용되느냐에 따라 지역별 또는 나라별로 다르다. 그러나 staphylococci와 enterococci의 경우 gentamicin에 대한 저항성은 주로 acetyltransferase와 phosphotransferase의 두 가지 기능을 함께 갖고 있는 효소를 암호화하는 유전자인 *aac(6')-aph(2'')*에 기인하며(7, 36), 그람음성 세균에서는 *aac(3)I*과 *aac(3)II* (2), 그리고 *aac(6')I* (33)이 저항성의 원인이 되고 있다. 홍콩에서 분리된 aminoglycoside 저항성 *Escherichia coli*의 97%가 *aac(3)III* 유전자를 가지고 있었고(14), 터키에서는 *ant(2'')* 다음으로 *aac(3)III*의 출현빈도가 높았으며(1), 칠레에서 분리된 aminoglycoside 저항성 세균의 90%가 *aac(3)III*를 가지고 있음이 보고된 바 있다(31). 우리나라의 경우 병원하수에서 분리한 gentamicin 저항성 세균을 분석하였을 때 *aac(3)III* 계열의 유전자 중 *aac(3)III* 유전자를 가지고 있는 세균의 출현 빈도가 가장 높은 것으로 보고되고 있다(22). 본 연구에서도 병원하수에서 gentamicin 저항성 균주를

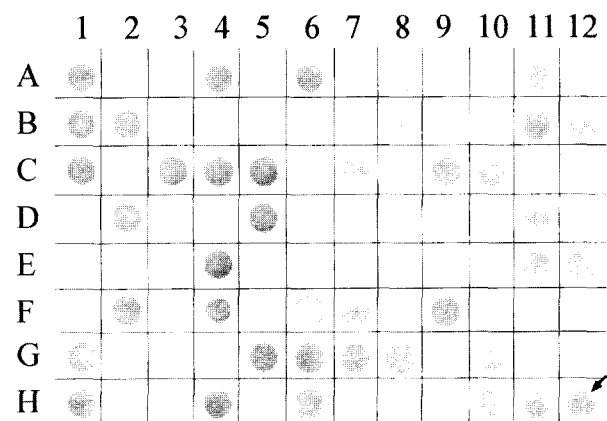


Fig. 1. Dot-blot hybridization of DNAs from 95 gentamicin resistant strains isolated from hospital sewage. The internal fragment of *aac(3)III* gene was used as a probe. Arrow indicates a positive control.

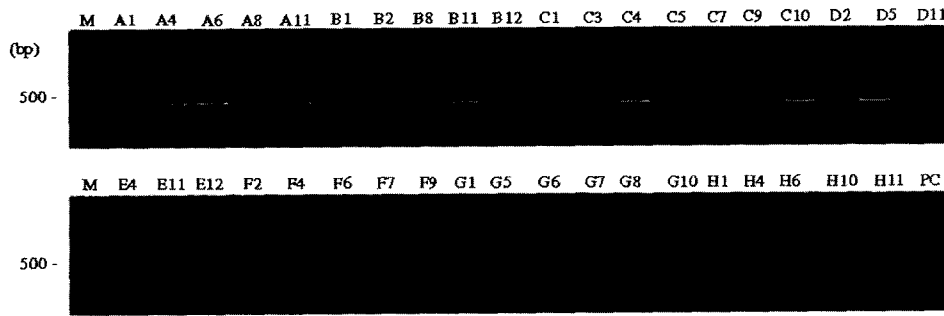


Fig. 2. Agarose gel (1.2%) electrophoresis of amplification products. A 278-bp fragment was amplified with PCR primers, GenF and GenR. The number of strains is represented upper the lane. Lane M, size marker; 100 bp ladder (Bioneer); lane PC, positive control.

분리하여 이들 중 *aac(3)II* 유전자를 가지고 있는 세균의 빈도를 알기 위해 dot blot hybridization을 시행한 결과 Fig. 1에서와 같이 95개 균주 중 39개에서 *aac(3)II* 유전자가 검출되어 41%의 높은 출현빈도를 나타내었다.

한편 여러 경우에서 aminoglycoside계 저항성 유전자들이 composite transposon과 연관되어 있는 것이 보고되고 있다. *Staphylococcus aureus*와 *S. epidermidis*로부터 각각 처음 알게 된 Tn4001(23)과 Tn4031(35), *Enterococcus faecalis*에서 발견된 Tn5281(15)은 gentamicin에 대한 높은 수준의 저항성을 띄게 할 뿐 아니라, 저항성 유전자의 빠른 전파의 원인이 되기도 한다. 이들은 plasmid에 존재하고 있는데 반해 Tn5384(29)과 Tn3706(16) 등은 염색체에 존재하는 transposon이다. 이들 모두는 저항성 유전자의 양끝에 존재하는 IS256에 의해 DNA가 다른 곳으로 전이된다. 그밖에 염색체에서 발견된 transposon으로 이들과 다른 구조를 갖는 Tn924가 보고되었다(34). Transposon은 저항성 유전자의 전이의 원인이 될 뿐 아니라 저항성의 발현을 증가시키기도 한다. 예컨대, *Serratia marcescens*에서 발견된 *aac(3)II* 유전자에서는 상류에 위치한 Tn3의 오른쪽 역행중복이 저항성 유전자 promoter의 -35부위를 제공하고 있다. 즉, promoter의 -10부위는 저항성 유전자로부터, -35부위는 Tn3의 염기서열에 의해

제공되고 있었다. 그 뿐 아니라 Tn3-*aac(3)II* 구조로 존재할 때 Tn3에 있는 ampicillin 저항성 유전자인 *bla*의 염기서열이 새로운 promoter를 제공하여 *aac(3)II*의 발현을 증가시켰다(17). 이와 같은 Tn3에 의한 저항성 유전자의 발현 증가가 자연상태에서 일어나는 보편적 현상인지 알기 위해 Fig. 1에서 양성 반응을 보여 *aac(3)II* 유전자의 존재가 확인된 균주를 대상으로 Tn3가 저항성 유전자와 연관되어 있는지 여부를 확인하였다. Tn3의 오른쪽 역행중복 부위와 *aac(3)II*의 5'부위에서 각각 설계된 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 39개 균주 중 13개 균주에서 예상하였던 278 bp의 DNA가 증폭되었다(Fig. 2). *aac(3)II* 유전자가 Tn3와 연관되어 있는 13개 균주들의 gentamicin에 대한 MIC를 측정된 결과 Fig. 3과 같이 저항성 유전자와 함께 Tn3를 가지고 있는 균주들의 MIC가 그렇지 않은 균주들에 비하여 상대적으로 높음을 알 수 있다. Tn3가 있는 13개 균주 모두에서 MIC가 100 µg/ml 이상이였다. 이러한 사실은 Tn3-*aac(3)II* 구조가 gentamicin 저항성 유전자의 발현을 증가시키고 있음을 말해 준다. A6, F2, H4 균주의 MIC도 이들과 비슷한 수준인데 이것은 *aac(3)II*와 함께 다른 종류의 저항성 유전자를 동시에 가지고 있어 MIC가 높은 것으로 생각된다. 13개 균주를 동정한 결과 Table 1과 같이 5종으로 동정되었다. 이들 중 *E. coli*, *Acinetobacter*

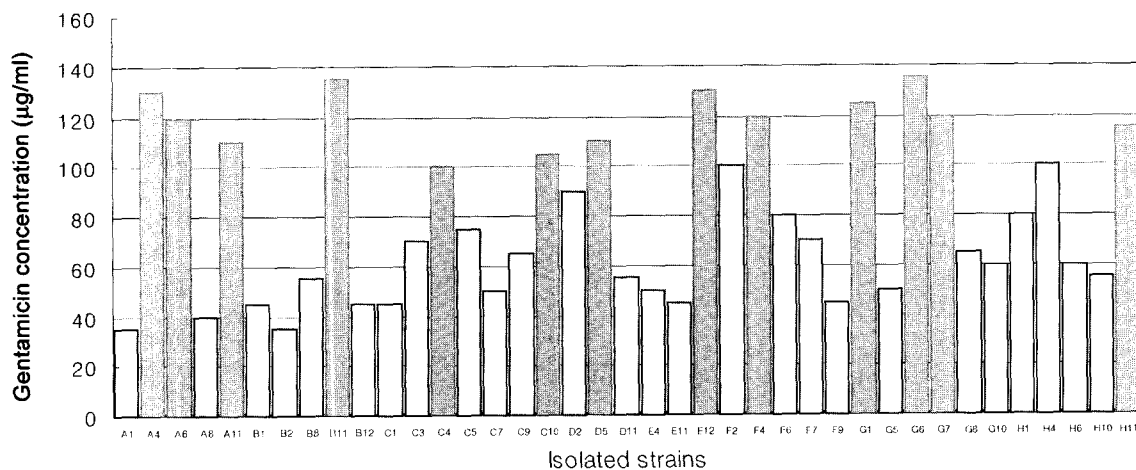


Fig. 3. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of strains containing *aac(3)II* gene. Shaded columns indicate the MIC of strains containing Tn3-*aac(3)II* structure.

Table 1. Identification of 13 strains containing Tn3-*aac(3)II* structure

Species	No. of strain
<i>Escherichia coli</i>	A4, B11, D5, G7, H11
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	A11, C4, E12
<i>Enterobacter agglomerans</i>	A6, G6
<i>Micrococcus luteus</i>	F4, G1
<i>Pseudomonas facilis</i>	C10

johnsonii, *Enterobacter agglomerans* 및 *Pseudomonas facilis*는 그람음성이고 *Micrococcus luteus*는 그람양성 세균이므로 이러한 유전자 구조가 자연계에 존재하는 다양한 세균에서 두루 나타남을 알 수 있다.

본 논문은 항생물질이 많이 쓰이는 곳에서 항생물질 저항성 유전자의 발현이 증가되는 구조를 갖고 있는 세균들의 저항성 유전자가 자연선택에 의해 선발되어 병원하수를 통해 수계환경으로 유입될 시 접합, 형질도입 및 형질전환 등을 통해 같은 종 뿐 아니라 병원성 세균을 비롯한 다른 종의 세균으로 전달됨으로써 저항성 세균의 유출이 보건상 잠재적 위협요인이 될 수 있음을 보여준다.

참고문헌

- Akalin, H.E., M. Torun, and R. Alacam. 1988. Aminoglycoside resistance patterns in Turkey. *Scand. J. Infect. Dis.* 20, 199-203.
- Alvarez, M. and M.C. Mendoza. 1993. Molecular epidemiology of two genes encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferases AAC(3)I and AAC(3)II among gram-negative bacteria from a Spanish hospital. *Eur. J. Epidemiol.* 9, 650-657.
- Andersen, S.R. and R.A. Sanda. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 908-912.
- Ausubel, R.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1999. Current protocols in molecular biology, 4th ed., p. 1-16. John Wiley & Sons, New York.
- Brisson-Noel, A., M. Arthur, and P. Courvalin. 1988. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 1739-1745.
- Cohen, S.P., H. Hachler, and S.B. Levy. 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1484-1492.
- Chow, J.W. 2000. Aminoglycoside resistance in *Enterococci*. *Clin. Infect. Dis.* 31, 586-589.
- David, R.B. and W.C. Richard. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York.
- Foster, T.J. 1983. Plasmid determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47, 361-409.
- Faibis, F., A. Fiacre, and M.C. Demachy. 2001. Emergence of high-level gentamicin resistance in Group G *Streptococci*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 901-902.
- Galimand, M., T. Lambert, G. Gerbaud, and P. Couvalin. 1999. High-level aminoglycoside resistance in the β -hemolytic group G *Streptococcus* isolate BM2721. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 3008-3010.
- Hachler, H., S.P. Cohen, and S.B. Levy. 1991. *marA*, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 5532-5538.
- Han, H.S., N.D. Kim, Y.J. Lee, H.Y. Lee, and J.S. Jung. 1997. Occurrence of Tn3 sequence upstream of *aacC2* gene in gentamicin resistance R plasmids. *Kor. J. Microbiol.* 33, 165-169.
- Ho, B.S.W., R.S. Hare, K.J. Shaw, G.H. Miller, and M.H. Ng. 1993. Determination of aminoglycoside resistance mechanisms of Enterobacteriaceae isolated from a hospital in Hong Kong with antibiogram and genotyping. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 174-176.
- Holden-Christian, S.L. and B.E. Murray. 1991. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1147-1152.
- Horaud, T., G. de Cespédès, and P. Trieu-Cuot. 1996. Chromosomal gentamicin resistance transposon Tn3706 in *Streptococcus agalactiae* B128. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1085-1090.
- Jung J.S., H.Y. Lee, and J.H. Chung. 1998. Increased expression of the gentamicin resistance gene by a Tn3 sequence located at the upstream region. *Mol. Cells* 8, 201-204.
- Kelley, W.J. and D.C. Reaney. 1984. Mercury resistance among soil bacteria: ecology and transferability of genes encoding resistance. *Soil Biol. Biochem.* 16, 1-8.
- Kobayashi, I., A. Kanayama, K. Matsuzaki, M. Nishida, N. Nakatogawa, and A. Kaneko. 2003. High-level gentamicin-resistant isolates of oral streptococci and *Aerococcus* from blood specimens. *J. Infect. Chemother.* 9, 21-24.
- Lancini, G., F. Parenti, and G.G. Gallo. 1995. Antibiotics: a multidisciplinary approach, p. 16. Plenum Press, New York.
- Lee, Y.J., H.S. Han, and J.S. Jung. 2000. Molecular biological detection of the genes encoding aminoglycoside acetyltransferases and aerolysin in water samples from Juam lake. *Kor. J. Microbiol.* 36, 273-278.
- Lee, Y.J., H.S. Han, C.N. Seong, H.Y. Lee, and J.S. Jung. 1998. Distribution of genes coding for aminoglycoside acetyltransferases in gentamicin resistant bacteria isolated from aquatic environment. *J. Microbiol.* 36, 249-255.
- Lyon, B.R., J.W. May, and R.A. Skurray. 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 193, 554-556.
- Lyon, B.R. and R.A. Skurray. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* 51, 88-134.
- Montie, T. and P. Patamasucon. 1995. Aminoglycosides: the complex problem of antibiotic mechanisms and clinical applications. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 14, 85-87.
- Noble, W.C., Z. Virani, and R.G.A. Gree. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 195-198.
- Paul, J.H., W.H. Jeffrey, A.W. David, M.F. Deflaun, and L.H. Cazares. 1989. Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environment of southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1823-1828.
- Rauch, P.J., and W.M. De Vos. 1994. Identification and characterization of genes involved in excision of the *Lactococcus lactis* conjugative transposon. *J. Bacteriol.* 176, 2165-2171.

29. Rice, L.B., L.L. Carias, and S.H. Marshall. 1995. Tn5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated copies of IS256. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1147-1153.
30. Saye, D.J. and R. Miller. 1989. The aquatic environment: consideration of horizontal gene transmission in a diversified habitat, p. 223-259. In S.B. Levy and R.V. Miller (eds.), *Gene transfer in the environment*. McGraw Hill, New York.
31. Schmitz, F.J., J. Verhoef, A.C. Fluit, and the Sentry participants group. 1999. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European sentry antimicrobial surveillance programme. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 414-421.
32. Show, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138-163.
33. Snelling, A.M., P.M. Hawkey, J. Heritage, P. Downey, P.M. Bennett, and B. Holmes. 1993. The use of a DNA probe and PCR to examine the distribution of the *aac(6)-Ic* gene in *Serratia marcescens* and other Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 841-854.
34. Thal, L.A., J.W. Chaw, D.B. Clewell, and M.J. Zervos. 1994. Tn924, a chromosome-borne transposon encoding high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1152-1156.
35. Thomas, W.D., Jr. and G.L. Archer. 1989. Mobility of gentamicin resistance genes from staphylococci isolated in the United States: identification of Tn4031, a gentamicin resistance transposon from *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1335-1341.
36. van de Klundert, J.A.M. and J.S. Vliegthart. 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, p. 547-552. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and application*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

(Received January 26, 2004/Accepted February 25, 2004)

ABSTRACT : Increased Expression of *aac(3)II* by Tn3 in Gentamicin - Resistant Bacteria Isolated from Hospital Sewage

Hyo Shim Han, Moon Sook Lee, and Jae Sung Jung (Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea)

We tested gentamicin - resistant bacteria isolated from hospital sewage to confirm the presence of *aac(3)II* encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase by dot-blot hybridization. A probe from the internal fragment of *aac(3)II* was hybridized to DNA from 41 % (39/95) of gentamicin resistant isolates. PCR was performed with primers from *aac(3)II* and Tn3. Of 39 strains, 13 strains had Tn3-*aac(3)II* structure. Minimal inhibitory concentration (MIC) test demonstrated that 13 strains containing Tn3-*aac(3)II* showed higher resistance to gentamicin than those of other strains. Thirteen strains were identified as 5 *Escherichia coli*, 3 *Acinetobacter johnsonii*, 2 *Enterobacter agglomerans*, 2 *Micrococcus luteus*, and 1 *Pseudomonas facilis*. These results suggest that gentamicin-resistant determinant of Tn3-*aac(3)II* structure was widely distributed in the gentamicin-resistant bacteria.