

임상검체에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성현황과 기전

김정만, 정석훈*,****, 이상희****, 김지혜**, 김빛나*, 김종철***

동아대학교 의과대학 임상병리학교실, 고신대학교 의과대학 임상병리학교실*, 내과학교실**,
비뇨기과학교실***, 영동대학교 유전공학과****, 연세대학교 의과대학 세균내성연구소*****

Prevalence and Mechanism of Third-Generation Cephalosporins-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Specimen

Jeong Man Kim, Seok Hoon Jeong*****, Sang Hee Lee****, Ji Hye Kim**,
Bit Na Kim*, and Jong Chul Kim***

Department of Clinical Pathology, Dong-A University College of Medicine; Departments of Clinical Pathology*,
Internal Medicine**, and Urology***, Kosin University College of Medicine, Busan; Department of Genetic
Engineering****, Youngdong University, Chungbuk; Research Institute of Bacterial Resistance*****, Yonsei University
College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Among Gram-negative pathogens in Korea, the incidence of resistance to third-generation cephalosporins is becoming an ever-increasing problem. This study was designed to determine the prevalence of third-generation cephalosporins-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in a tertiary care hospital in Busan, Korea, and to characterize the mechanism of resistance.

Methods: A total of 710 *E. coli* and 237 *K. pneumoniae* non-duplicate isolates were collected from patients in Kosin Medical Center in 1999. Antimicrobial susceptibilities were tested by the disk diffusion method. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production was determined by the double disk synergy test. MICs were determined by the agar dilution method. Searches for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CMY} genes in cefotaxime-resistant or intermediate isolates were performed by PCR amplification. PCR products were used to determine the sequence of resistance genes by the dideoxy-chain termination method.

Results: Seven percent of *E. coli* and 25% of *K. pneumoniae* isolates were resistant to cefotaxime. Among the isolates with decreased susceptibility to cefotaxime, 69% (18/26) of *E. coli* and 80% (20/25) of *K. pneumoniae* isolates showed positive results in double disk synergy test. Banding patterns of PCR amplification showed that the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CMY} genes were harboured by 71% (20/28), 86% (24/28) and 14% (4/28) of isolates with decreased susceptibility to cefotaxime,

접수번호 : CM 5-01-08

교신저자 : 정석훈

(602-702)부산시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 임상병리학교실

Tel : 051) 990-6373 Fax : 051) 254-3544

E-mail : kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

이 논문은 2000학년도 동아대학교 학술연구조성비(공모)에 의하여 연구되었음

서론

*Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*는 장내세균 속(family Enterobacteriaceae)에 속하는 그람음성간균이며 인체 장내 정상 상재균이다[1]. 두 균종 모두 병원감염의 흔한 원인균이며, 요로감염, 패혈증, 창상감염 등을 유발한다. 그람음성간균 치료에 임상적 효능이 있는 첫

respectively. Seventy-one percent (20/28) of the isolates contained more than two types of β -lactamase genes. Nucleotide sequence analysis of PCR products revealed that bla_{SHV-12} and bla_{TEM-1b} were the dominant types of β -lactamase gene. In addition, we also identified bla_{TEM-52} , bla_{SHV-5} and a new ESBL gene named $bla_{TEM-17b}$.

Conclusions: Third-generation cephalosporins-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* are wide spread in Kosin Medical Center, Busan, Korea. Most of the isolates with decreased susceptibility to cefotaxime had bla_{TEM} and/or bla_{SHV} , and some isolates harboured bla_{CMY} genes that may confer resistance against cephamycins. The spread of these β -lactamase genes could compromise the future usefulness of third-generation cephalosporins for the treatment of infections caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*. (*Korean J Clin Microbiol* 2002;5(1):06-14)

Key words: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Third-generation cephalosporins, bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CMY}

penicillin계 항균제인 ampicillin이 소개된 이 후, β -lactam 항균제는 이들 균종에 의한 감염증의 치료에 광범위하게 사용되어 왔다[2]. 그러나 항균제 사용 빈도의 증가는 내성세균을 양산하는 부작용을 낳았으며, 이들 내성세균의 치료를 위해서 새로운 항균제를 개발하여야 하는 악순환이 되풀이 되어왔다.

Ampicillin이 임상에서 사용된 후 broad-spectrum β -lactamase 생성에 의해서 이 항균제에 대한 내성을 획득한 균주가 등장하였다. Broad-spectrum β -lactamase는 penicillin, 헤파범 위 cephalosporin, cefamandole 및 cefoperazone을 효율적으로 가수분해할 수 있다[3]. TEM-1, TEM-2 및 SHV-1은 그 대표적인 예이다. 근래 선진국에서 분리되는 *E. coli*의 30-50%와 국내에서 분리되는 *E. coli*의 70% 이상이 ampicillin에 내성인데, 그 대부분은 TEM-1 생성에 의한 것이다[4].

제 3세대 cephalosporin계 항균제는 broad-spectrum β -lactamase 생성 그람음성간균에 의한 감염증의 치료를 위해서 새로이 개발된 약제이다[2]. 이들 항균제는 broad-spectrum β -lactamase에 안정할 뿐 아니라 그람음성간균의 세포막을 쉽게 투과할 수 있기 때문에 장내세균에 매우 강한 항균력을 발휘하였다. 그러나 이들 항균제가 임상에서 사용된 후 곧 내성세균이 출현하였는데, 1980년대 초 유럽에서 cefotaxime에 내성인 *K. pneumoniae*가 보고되었으며[5], 그 후 세계 여러나라에서 내성세균이 보고되고 있고, 그 빈도는 계속 증가하고 있다[6-8]. *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 생성하며 제 3세대 cephalosporin에 활성이 있는 효소는 TEM 혹은 SHV형 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)과 AmpC β -lactamase이다. 이들 효소를 encode하는 유전자는 plasmid에 매개되므로 다른 균주로의 내성전달이 용이하다.

TEM 혹은 SHV형 ESBL은 활성범위가 매우 넓은 효소이다[9]. Penicillin, 헤파범 위 cephalosporin 뿐 아니라 제 3세대 cephalosporin과 monobactam도 가수분해할 수 있다. 그러나 cephamycin과 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid에 의해서 활성이 억제되는 특성이 있다.

이들 효소를 생성하는 균주는 aminoglycoside 등 다른 계열의 항균제에도 내성인 경우가 많다. 또한 carbapenem을 제외한 β -lactam계 항균제 모두에 임상적으로 내성이기 때문에 치료제 선택의 폭이 매우 좁다. 이들 효소는 TEM-1, TEM-2, SHV-1 등 broad-spectrum β -lactamase 유전자의 점 변이 (point mutation)에 의한 아미노 산 치환에 의해서 생성되었다[10]. 이 유형의 효소는 1980년대 초반 유럽에서 처음 발견되었으며, *K. pneumoniae*가 가장 흔히 생성하는 것으로 알려졌다. 국내에서는 1990년대 초부터 이 효소를 생성하는 그람음성세균의 분리가 보고되었으며[11], 그 빈도는 근래 현저하게 증가하고 있는 것으로 알려졌다[12]. TEM형 ESBL은 30가지, SHV형 ESBL은 10가지 이상으로 그 유전형은 매우 다양하다[13]. 빈번하게 분리되는 ESBL 유전형은 국가에 따라 다른데, 프랑스에는 TEM-3, 미국에는 TEM-10, TEM-12 및 TEM-26, 그리스에는 SHV-5가 많은 것으로 알려졌다. 국내에서는 TEM-52와 SHV-5가 흔하다는 보고가 있지만[14,15], 부산지역에서의 유형에 대한 연구는 아직 없다.

1989년 서울의 한 대학병원 환자의 창상검체에서 plasmid에 매개되는 AmpC β -lactamase 생성 *K. pneumoniae*가 분리되었는데[16], 이 효소는 제 3세대 cephalosporin 뿐 아니라 cephamycin계 항균제인 cefoxitin도 가수분해할 수 있었기에 CMY-1이라 명명되었다. 그 후 외국에서도 CMY-2, MIR-1, BIL-1, FOX-1, LAT-1 등 CMY-1과 유사한 활성을 갖는 plasmid성 AmpC β -lactamase가 보고되었다[3]. 이 효소를 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 매우 드문 것으로 알려졌다. 그러나 근래 그 빈도가 현저히 증가했다고 보고되었다[17].

세균의 항균제 내성 현황의 조사 및 내성기전 규명은 그 감염증의 치료지침 마련과 새로운 항균제 개발에 기초가 된다. 국내에서 분리되는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 제 3세대 cephalosporin 및 cephamycin에 내성인 균주가 흔한 것으로 알려졌지만, 부산에서 분리되는 균주의 내성현황에 대한 연구는 드물다. 또한 부산지역에서 분리되는 이들 세균의 내성 유전형에 대한 연구는 아직 전무하다. 이에 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 분리

된 균주를 대상으로 제 3세대 cephalosporin계 항균제 내성 현황을 조사하고, 그 내성기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 분리 및 동정

1999년에 고신의료원 환자의 임상 검체에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 하였다. 분리된 균주는 도말 염색하여서 그람음성간균임을 확인하고, 전통적인 방법[1] 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc, Hazelwood, MO., USA)를 사용하여서 동정하였다. 동일환자에서 반복 분리된 균주는 연구 대상에서 제외하였다.

2. 항균제 감수성 시험

디스크 확산법으로 시험하였다[18]. 즉, 시험세균을 MacConkey 한천 (Difco, Detroit, MI., USA)에 계대배양하여서 1개의 독립된 집락을 백금침으로 채취한 후, Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여 McFarland no. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 접종한 후, 항균제 디스크를 놓았다. 세균이 접종된 배지는 35℃ 항온기에 18시간 배양하고, 각 항균제 디스크 주위에 생긴 억제대의 크기를 측정하였다. 항균제 디스크로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin 및 trimethoprim-sulfamethoxazole 디스크 (이상 BBL, Cockeysville, MI., USA)를 사용하였다. 결과의 정확성을 위하여 대조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

평판희석법으로 시험하였다[19]. 시험항균제로는 amoxicillin (동화, 서울), amoxicillin-clavulanic acid (일성, 안산), cefoxitin (Merck Sharp & Dohme), cefotaxime (한독, 서울), ceftazidime (한미, 화성), aztreonam (동아, 안산), cefepime 및 imipenem (중외, 서울)을 사용하였다. 시험균주 104 CFU를 Steers replicator (Craft Machine, Chester, PA., USA)로 시험항균제가 각각 0.06-256 µg/mL 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 접종하였다. 35℃로 호기성 환경에서 18시간 배양 후 집락의 증식 양상을 관찰하여 최소억제농도를 판정하였다. 정도관리를 위하여 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

4. Double disk synergy 시험

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 Jarlier 등[20]의 방법으로 시험하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, TSB에 접종하여 McFarland no. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg, BBL), 그 주위에는 30 µg의 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 및 aztreonam 디스크 (이상 BBL)를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 35℃ 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

5. 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 β-lactamase 유전형 시험

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 시험하였다. 검출을 위해 사용한 primer는 Table 1과 같다[21]. 양성대조를 위해서는 *bla*_{TEM-1P}, *bla*_{SHV-1} 및 *bla*_{CMY-1} 유전자를 갖고있는 *E. coli*를 각각 사용하였다. 시험세균 및 대조세균을 TSB에 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여서 5분간 13,000 Xg로 원심하였다. 상층액은 버리고, 침사는 증류수 500 µL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 Xg로 원심하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5 µL, primer 각 1 µL, deoxynucleotide triphosphates 2.5 mM (8 µL), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5 µL), 10X buffer 10 µL 및 증류수 75.5 µL를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT., USA)으로 94℃로 30초간 denaturation, 58℃로 1분간 annealing, 72℃로 1분간 extension하는 35 cycle의 중합연쇄반응을 시행하였다. 증폭산물 10 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI., USA)의 홈에 넣고 40분간 전기영동하여서 증폭산물의 band를 확인하였다.

6. 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물의 사용되지 않은 deoxynucleotide triphosphates를 제거하기 위해서 증폭산물을 2.5 M ammonium acetate와 동량의 ethanol (-20℃)과 혼합하여 얼음에 15분간 담근 후, 13,000 Xg로 15분간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 취하였다. 침사를 70% ethanol로 세척 후, TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) 20 µL에 부유하였다. 증폭산물의 염기서열을 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH., USA)를 이용하여서 dideoxy-mediated chain termination 법[22]으로 분석하였다.

Table 1. Nucleotide sequence of the primers used for amplification

Primer name	Sequence*	Nucleotide position †
<i>bla_{TEM}</i>		
T1	5' -AGAGTATGAGTATTCAACATT-3'	204
T2	5' -ATAGTTTGCGCAACGTTGT-3'	782
T3	5' -AGTCACAGAAAAGCATCTTA-3'	523
T4	5' -ATCTCAGCGATCTGTCTAT-3'	1041
<i>bla_{SHV}</i>		
S1	5' -GGGTTATTCTTATTTGTCGCT-3'	58
S2	5' -TCATTCAGTTCGGTTTCCCA-3'	624
S3	5' -AGATCCACTATCGCCAGCA-3'	393
S4	5' -TAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	987
<i>bla_{CMY}</i>		
C1	5' -GAGCAGACCCTGTTCGAGAT-3'	570
C2	5' -GATTGGCCAGCATGACGATG-3'	1416
C3	5' -TACTCCAACCCCAGCATAGG-3'	852
C4	5' -CCACATAGGCGCCAAAGCC-3'	1371

* Primers T1, T3, S1, S3 and C1, C3 are identical to the leading strand; primers T2, T4, S2, S4, and C2, C4 are identical to the lagging strand.

† Numbers correspond to the position of the first 5' base of each oligonucleotide according to the numbering of the nucleotide sequences of V01119 (*bla_{TEM-1a}*) for T1, T2, T3, and T4; M59181 (*bla_{SHV-1}*) for S1, S2, S3, and S4; X92508 (*bla_{CMY-1}*) for C1, C2, C3, and C4.

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from clinical specimens*

Antimicrobial agents	% resistance	
	<i>E. coli</i> (n=710)	<i>K. pneumoniae</i> (n=237)
Ampicillin	79	99
Ampicillin-sulbactam	40	24
Cephalothin	56	22
Cefotaxime	7	25
Ceftriaxone	52	6
Cefoxitin	12	10
Cefotetan	2	2
Imipenem	0	0
Amikacin	4	12
Gentamicin	37	22
Tobramycin	24	24
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	63	22
Ciprofloxacin	3	26

* Strains were isolated in 199

결 과

1. 항균제 감수성 양상

시험기간 중 총 710주의 *E. coli*와 237주의 *K. pneumoniae*가 임상검체에서 분리되었다. *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 cefotaxime 내성율은 각각 7%와 25%, cefoxitin 내성율은 12%와 10%였다. Imipenem에 내성인 균주는 분리되지 않았다 (Table 2).

Table 3. Resistance genotypes of *E. coli* and *K. pneumoniae* strains with decreased susceptibility to cefotaxime isolated from clinical specimens

Species	Frequency of resistance genes					
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CMY}
<i>E. coli</i>	2	1	1	7	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	0	4	0	1	0	10
Total	2	5	1	17	2	1

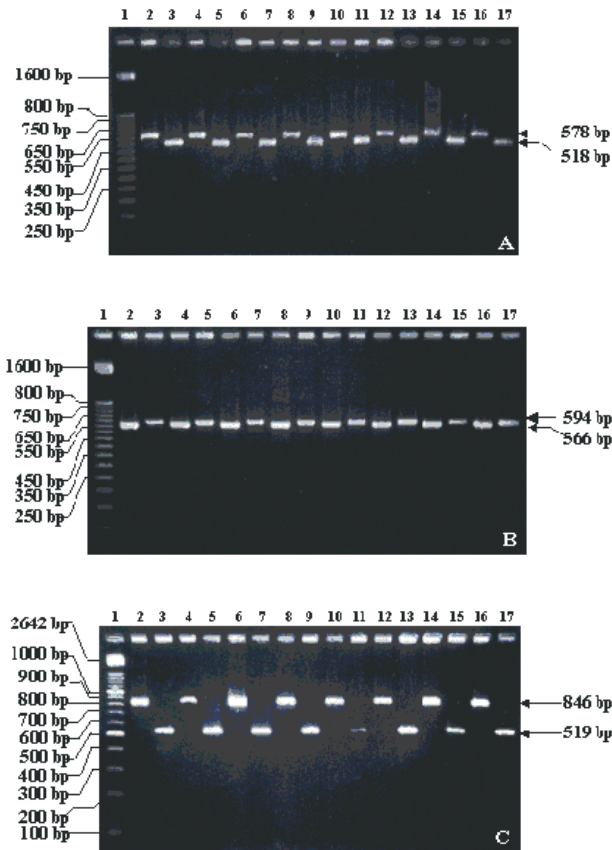


Fig. 1. Detection of amplified products of TEM, SHV and CMY genes after 2% agarose gel electrophoresis. Lanes: 1, DNA molecular weight marker XIV, 100 bps ladder DNA (Roche); 2-17, *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated from clinical specimens. A, amplified products of TEM genes. Even numbers are products by primer T1 and T2, and odd numbers are products by primer T3 and T4; B, amplified products of SHV genes. Even numbers are products by primer S1 and S2, and odd numbers are products by primer S3 and S4; C, amplified products of CMY genes. Even numbers are products by primer C1 and C2, and odd numbers are products by primer C3 and C4.

2. Double disk synergy 시험

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. coli* 26주와 *K. pneumoniae* 25주를 대상으로 시험하였으며, 이 중 *E. coli* 18주 (69%)와 *K. pneumoniae* 20주 (80%)가 double disk synergy 양성이었다.

3. 내성 유전형

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. coli* 13주와 *K. pneumoniae* 15주의 내성유전형을 PCR로 시험하였다 (Fig. 1). *E. coli*와 *K. pneumoniae* 각각 10주는 *bla*_{TEM}, 9주와 15주는 *bla*_{SHV}, 3주와 1주는 *bla*_{CMY} 유전자 양성이었다. *bla*_{TEM}과 *bla*_{SHV}에 동시에 양성인 경우가 *E. coli* 7주와 *K. pneumoniae* 10주로 가장 흔하였으며, 1주는 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} 및 *bla*_{CMY} 유전자 모두에 양성이었다 (Table 3). *bla*_{CMY} 유전자 양성인 균주에 대한 cefoxitin과 cefotetan의 MIC는 각각 256 µg/mL 이상 및 64 µg/mL 이상으로 *bla*_{TEM} 혹은 *bla*_{SHV} 유전자에만 양성인 균주가 32 µg/mL 이하 및 4 µg/mL 이하인데 비하여 현저하게 높았다 (Table 4).

E. coli 5주와 *K. pneumoniae* 2주의 TEM 및 SHV 유전형을 염기서열 분석을 통해서 규명하였다. *bla*_{SHV-12}가 *E. coli* 5주와 *K. pneumoniae* 1주에서 검출되어서 가장 흔하였고, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{TEM-17b} 및 *bla*_{SHV-5}도 검출되었다 (Table 4). *bla*_{TEM-17b}는 *bla*_{TEM-1b}의 512번째 염기서열 (G→A) 점 변이에 의해서 TEM-1의 104번째 아미노산인 Glu가 Lys로 치환되었으며, *bla*_{TEM-17}에 비해서 7군데에 점 변이가 있지만 (C226→T, C436→T, A469→G, G604→T, C682→T, T863→C 및 T985→C) 아미노산 치환이 동반되지 않은 새로운 유전형이었다 (Fig. 2, Genbank accession No. AF264753).

고 찰

시험기간 중 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 cefotaxime 내성율은 각각 7%와 25%이었으며, cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. coli* 26주와 *K. pneumoniae* 25주 중 *E. coli* 18주 (69%)와 *K. pneumoniae* 20주 (80%)가 double disk synergy 양성이었다. 따라서 1999년 고신의료원에서 분리된 *E. coli*의 5%와 *K. pneumoniae*의 20% 가량

Table 4. Profiles of *E. coli* and *K. pneumoniae* strains with decreased susceptibility to cefotaxime isolated from clinical specimens

Strain	Species	Minimal inhibitory concentrations (μ g/mL) of:											DDS	Genotype
		AMX	AUG	CF	CFM	CTX	CAZ	AZT	FEP	IMP	FOX	CTT		
K1085	ECO	>256	32	>256	64	8	32	128	0.5	0.25	2	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K1817	ECO	>256	64	>256	256	16	32	64	8	1	16	2	+	<i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K2269-2	ECO	>256	128	>256	256	16	32	64	8	1	16	2	+	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K2740-1	ECO	>256	>256	>256	256	16	32	64	4	0.25	8	1	+	<i>bla</i> _{TEM-17b} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K2806-2	ECO	>256	64	>256	256	16	32	64	8	1	16	2	+	<i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K2176	KPN	>256	16	>256	128	8	128	256	2	1	8	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{SHV-5}
K2806-3	KPN	>256	32	>256	>256	64	>256	>256	32	1	8	2	+	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>bla</i> _{SHV-12}
K5050-1	KPN	>256	32	>256	128	8	64	128	2	1	4	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K5094	KPN	>256	32	>256	128	8	64	128	2	1	8	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K5335	KPN	>256	16	>256	128	8	64	128	1	0.5	4	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K5607	KPN	>256	32	>256	128	8	128	128	2	1	8	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K5747	KPN	>256	32	>256	128	8	64	128	2	1	8	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K16292	KPN	>256	128	>256	>256	16	>256	>256	8	0.5	4	1	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K5978	KPN	>256	64	>256	128	4	128	256	2	0.5	8	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K8322	KPN	>256	32	>256	>256	64	>256	>256	16	1	4	1	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K6533	ECO	>256	16	256	64	4	32	64	1	0.5	1	0.25	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K4037	ECO	R	R	R	R	R	R	R	ND	S	R	R	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
K7107	ECO	>256	32	128	32	8	8	4	2	1	8	1	+	<i>bla</i> _{TEM}
K5973	ECO	>256	32	32	8	0.5	128	32	2	0.5	8	2	+	<i>bla</i> _{TEM}
K1101	KPN	>256	32	>256	>256	64	>256	>256	16	0.5	8	4	+	<i>bla</i> _{SHV}
K10062	KPN	>256	128	256	32	16	32	8	8	1	4	1	+	<i>bla</i> _{SHV}
K10376	KPN	>256	64	>256	>256	32	256	>256	8	1	2	1	+	<i>bla</i> _{SHV}
K6684	KPN	>256	32	>256	256	16	>256	>256	4	0.25	32	1	+	<i>bla</i> _{SHV}
K6846	ECO	>256	32	>256	64	4	16	64	1	0.5	8	0.5	+	<i>bla</i> _{SHV}
KB3053	ECO	>256	64	>256	256	64	32	32	1	1	>256	>256	-	<i>bla</i> _{CMY}
K7048	ECO	>256	32	>256	128	16	8	16	0.5	1	>256	64	+	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY}
KB3386	KPN	>256	128	>256	>256	128	64	16	4	1	>256	>256	-	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY}
K8298	ECO	R	R	R	R	R	R	R	ND	S	R	R	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY}

* Antimicrobial susceptibilities were tested by NCCLS disk diffusion method.

Abbreviations: AMX, amoxicillin; AUG, amoxicillin-clavulanic acid; CF, cephalothin; CFM, cefamandole; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam; FEP, cefepime; IMP, imipenem; FOX, cefoxitin; CTT, cefotetan; DDS, double disk synergy test; ECO, *Escherichia coli*; KPN, *Klebsiella pneumoniae*; IM, internal medicine; PED, pediatrics; ICU, intensive care unit; NS, neurosurgery; URO, urology; NEU, neurology; CS, chest surgery; GS, general surgery; R, resistant; S, susceptible; ND, not done.

TEM-17b	agagt		atg	agt	att	caa	cat	ttt	cgt	gtc	gcc	ctt	att	ccc	ttt	247
TEM-17								ttc								
TEM-17b	ttt	gcg	gca	ttt	tgc	ctt	cct	gtt	ttt	gct	cac	cca	gaa	acg	ctg	292
TEM-17b	gtg	aaa	gta	aaa	gat	gct	gaa	gat	cag	ttg	ggg	gca	cga	gtg	ggg	337
TEM-17b	tac	atc	gaa	ctg	gat	ctc	aac	agc	ggg	aag	atc	ctt	gag	agt	ttt	382
TEM-17b	cgc	ccc	gaa	gaa	cgt	ttt	cca	atg	atg	agc	act	ttt	aaa	gtt	ctg	427
TEM-17b	cta	tgt	ggg	gcg	gta	tta	tcc	cgt	gtt	gac	gcc	ggg	caa	gag	caa	472
TEM-17			ggc												gaa	
TEM-1b															gag	
TEM-17b	ctc	ggg	cgc	cgc	ata	cac	tat	tct	cag	aat	gac	ttg	gtt	aag	tac	517
TEM-17b	tca	cca	gtc	aca	gaa	aag	cat	ctt	acg	gat	ggc	atg	aca	gta	aga	562
TEM-17b	gaa	tta	tgc	agt	gct	gcc	ata	acc	atg	agt	gat	aac	act	gct	gcc	607
TEM-17															gcg	
TEM-17b	aac	tta	ctt	ctg	aca	acg	atc	gga	gga	ccg	aag	gag	cta	acc	gct	652
TEM-17b	ttt	ttg	cac	aac	atg	ggg	gat	cat	gta	act	cgc	ctt	gat	cgt	tgg	697
TEM-17															acc	
TEM-17b	gaa	ccg	gag	ctg	aat	gaa	gcc	ata	cca	aac	gac	gag	cgt	gac	acc	742
TEM-17b	acg	atg	cct	gca	gca	atg	gca	aca	acg	ttg	cgc	aaa	cta	tta	act	787
TEM-17b	ggc	gaa	cta	ctt	act	cta	gct	tcc	cgg	caa	caa	tta	ata	gac	tgg	832
TEM-17b	atg	gag	gcg	gat	aaa	gtt	gca	gga	cca	ctt	ctg	cgc	tcg	gcc	ctt	877
TEM-17															ttg	
TEM-17b	ccg	gct	ggc	tgg	ttt	att	gct	gat	aaa	tct	gga	gcc	ggg	gag	cgt	922
TEM-17b	ggg	tct	cgc	ggg	atc	att	gca	gca	ctg	ggg	cca	gat	ggg	aag	ccc	967
TEM-17b	tcc	cgt	atc	gta	gtt	atc	tac	acg	acg	ggg	agt	cag	gca	act	atg	1012
TEM-17															att	
TEM-17b	gat	gaa	cga	aat	aga	cag	atc	gct	gag	at						1041

Fig. 2. Nucleotide sequence of the TEM-17b gene of *E. coli* K2740-1. This gene showed a point mutation from G to A at position 512 with respect to *bla*_{TEM1b}, which result in one amino acid replacement Glu104 to Lys, and seven silent point mutations with respect to *bla*_{TEM-17} (Genbank accession No. AF264753). The initiation codon is indicated by bold face. The nucleotide numbers of Sutcliffe are indicated in parentheses.

이 ESBL을 생성하는 것으로 추측되며, 이는 1999년 송 등[23]이 전국 12개 병원을 대상으로 조사한 평균 ESBL 생성율 9.8%와 25.6%에 비해서 낮은 수치이다. 내성 유전자가 ESBL 유전자와 같은 plasmid에 의해서 전이되는 amikacin, gentamicin, tobramycin 등 aminoglycoside계 항균제에 대한 내성율도 전국 평균에 비해서 낮은 경향을 보였다.

Double disk synergy 양성인 24주 모두는 *bla*_{TEM}이나 *bla*_{SHV} 유전자 중 하나 혹은 양자 모두를 갖고 있었다. Double disk synergy 음성인 4주 중 3주는 *bla*_{CMY} 유전자를 지니고 있었으나, 1주 (*E. coli* K4037)에서는 이 유전자가 검출되지 않았으므로 다른 유전형의 AmpC β -lactamase

를 생성하는 균주로 추측되었다. *bla*_{CMY} 유전자 양성인 균주에 대한 cefoxitin과 cefotetan의 MIC는 음성인 균주에 비해서 높았으며, 이는 효소 활성의 기질특이성 때문인 것으로 생각된다.

Double disk synergy 양성인 7주의 ESBL 유전자 염기서열을 분석하였는데, *bla*_{SHV}로는 *bla*_{SHV-12}가 6주, *bla*_{SHV-5}가 1주에서 검출되었다. 이 결과에서 고신의료원에서 분리되는 세균의 SHV형 ESBL은 SHV-1 → SHV-2(Gly238→Ser, 검출되지 않음) → SHV-5(Gly238→Ser + Glu240→Lys) → SHV-12(Leu35→Gln + Gly238→Ser + Glu240→Lys)의 순으로 변화하여 왔음을 추측할 수 있으며, Leu35→Gln의 치환에 의해서 내성 유발 정도가 더욱 강해진 SHV-12

가 확산되고 있음을 알 수 있었다.

bla_{TEM} 으로는 bla_{TEM-1b} 가 4주, bla_{TEM-52} 가 2주에서 검출되었으며, *E. coli* K2740-1에서는 새로운 TEM형 ESBL 유전자가 발견되었다. bla_{TEM-17} 유전자는 *Capnocytophaga ochracea*에서 검출된 바 있으며, TEM-1의 Glu104가 Lys로 치환된 것이다[24]. *E. coli* K2740-1에서 검출된 bla_{TEM} 은 bla_{TEM-17} 과 아미노산 서열은 같으나 염기서열 7군데가 차이가 있어서 $bla_{TEM-17b}$ 로 명명하였다. 이 중 염기서열 226번, 436번 및 604번의 점 변이는 bla_{TEM-1b} 에서도 관찰되는 것이다. 고신의료원에서 분리되는 TEM형 ESBL 유전자는 $bla_{TEM-1b} \rightarrow bla_{TEM-17b}$ (Glu104→Lys) → 아직 검출되지 않은 새로운 유전자(Glu104→Lys + Met182→Thr 혹은 Met182→Thr + Gly238→Ser) → bla_{TEM-52} (Glu104→Lys + Met182→Thr + Gly238→Ser)의 순서로 변화해 온 것으로 추측된다.

이상의 결과에서 고신의료원에서 분리되는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 ESBL을 생성하는 균주의 비율은 전국 평균에 비해서 낮으나, 그 유전형은 고도내성을 유발하는 bla_{SHV-12} 나 bla_{TEM-52} 가 혼함을 확인할 수 있었다. 또한 cephamycin에 대한 내성을 유발하는 bla_{CMY} 도 드물지 않음을 알 수 있었다. 본 연구에서 처음 검출된 $bla_{TEM-17b}$ 는 TEM형 ESBL 유전자의 변화 과정을 설명하는데 큰 도움이 될 것으로 기대한다.

요 약

배 경 : 임상 검체에서 분리되는 그람음성간균의 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성율의 증가는 임상적으로 심각한 문제이다. 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*를 대상으로 제 3세대 cephalosporin계 항균제 내성 현황을 조사하고, 그 내성기전을 규명하고자 하였다.

방 법 : 1999년 고신의료원 환자에서 분리된 *E. coli* 710주와 *K. pneumoniae* 237주를 대상으로 하였다. 항균제 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였으며, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성 균주를 double disk synergy 시험으로 선별하였다. 또한 한천희석법으로 최소억제농도를 측정하였다. Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 PCR로 bla_{TEM} , bla_{SHV} 및 bla_{CMY} 유전자를 선별하였으며, dideoxy-chain termination 법으로 증폭산물의 염기서열을 분석하여서 내성유전자의 유형을 확인하였다.

결 과 : *E. coli*의 7%와 *K. pneumoniae*의 25%는 cefotaxime에 내성이었다. Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주 중 *E. coli*의 69%(18/26)와 *K. pneumoniae*의 80%(20/25)는 double disk synergy 양성이었다. Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주 중 71%(20/28), 86%(24/28) 및

14%(4/28)가 각각 bla_{TEM} , bla_{SHV} 및 bla_{CMY} 유전자를 지니고 있었으며, 71%(20/28)는 두가지 이상의 β -lactamase 유전자를 갖고 있었다. bla_{SHV-12} 와 bla_{TEM-1b} 가 가장 흔한 유전형이었으며, bla_{TEM-52} , bla_{SHV-5} 및 새로운 ESBL 유전자인 $bla_{TEM-17b}$ 도 검출되었다.

결 론 : 고신의료원에서 분리되는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 제 3세대 cephalosporin에 내성인 균주가 흔하였다. Cefotaxime에 내성인 균주 대부분은 bla_{TEM} 혹은 bla_{SHV} 유전자를 지니고 있었으며, cephamycin에 대한 내성을 유발하는 bla_{CMY} 유전자를 지닌 균주도 드물지 않았다. 이들 β -lactamase 유전자의 확산은 제 3세대 cephalosporin의 *E. coli* 혹은 *K. pneumoniae* 감염증 치료 유효성을 제한할 것으로 우려된다.

참 고 문 헌

- Abbott S. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia*. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999;475-82.
- Quintiliani R, Jr., Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999;1505-25.
- Livermore DM. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
- 정윤섭, 이경원. 그람양성세균과 그람음성구균의 항균제 내성. 제 1판. 서울:서흥출판사, 1998;141-70.
- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315-7.
- Arlet G, Sanson-Le Por MJ, Rouveau M, Fournier G, Mario O, Schlemmer B. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 β -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:797-803.
- Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, Patel M, Bush K, Singer SB. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1991-6.
- Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized

- patients. *Infection* 1993;21:18-22.
9. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamase: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:7-22.
 10. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(S 1):2-11.
 11. 이경원, 조성란, 이창숙, 정운섭, 권오현. Extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *감염* 1996;26:341-8.
 12. 김병립, 정석훈, 구자영, 이경원, 정운섭, 정태전 등. Extended-spectrum β -lactamase 생성 장내세균의 분리를 및 선별검사. *대한임상미생물학회지* 1999;2:28-39.
 13. Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995;36(S A):19-34.
 14. 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정운섭, 김의중. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징. *감염* 1997;29:93-103.
 15. 배현주, 김정민, 권영미, 김종원. *K. pneumoniae*가 생성하는 TEM형 extended-spectrum β -lactamase의 분석. *감염* 1998;30:126-33.
 16. Bauernfiend A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989;17:316-21.
 17. 정운섭 및 이경원. 1997년 1-12월에 분리된 세균의 항균제 감수성. *항균제 내성 소식* 1998;6:1-2.
 18. National Committee for Clinical laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Ninth informational supplement.* Wayne:NCCLS, 1999;M100-S9.
 19. National Committee for Clinical laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards.* Wayne:NCCLS, 2000;M7-A5.
 20. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamase conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1998;10:867-78.
 21. Lee SH, Jeong SH, Lee KJ. Evolution of TEM β -lactamase genes identified by PCR with newly designed primers in Korean clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:98-100.
 22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
 23. 송원근, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈, 신혜정 등. 전국 12개 병원 환자에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *대한화학요법학회지* 2000;18:401-10.
 24. Rosenau A, Cattier B, Gousset N, Harriau P, Philippon A, Quentin R. *Capnocytophaga ochracea*; characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum *Flavobacter-Bacteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:760-2.