

임상검체에서 분리된 *Enterobacter* 생성 Extended-Spectrum β -Lactamase의 유전형

김정만, 정석훈*,****, 김빛나*, 성지현**, 김종철***, 장현정****

동아대학교 의과대학 임상병리학교실; 고신대학교 의과대학 임상병리학교실*, 감염관리실**, 비뇨기과학교실***; (주) 에스제이하이테크****; 연세대학교 의과대학 세균내성연구소*****

Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes from Clinical Isolates of *Enterobacter* species

Jeong Man Kim, Seok Hoon Jeong,*,****, Bit Na Kim,*, Ji Hyun Sung,**,
Jong Chul Kim,***, Hyunjung Jang,****

Department of Clinical Pathology, Dong-A University College of Medicine; Departments of Clinical Pathology*, Hospital Infection Control**, and Urology***, Kosin University College of Medicine; SJ-Hightech Co., Ltd.****, Busan; Research Institute of Bacterial Resistance*****, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Among *Enterobacter* spp. isolates from clinical specimens in Korea, the incidence of resistance to expanded-spectrum cephalosporins is becoming an ever-increasing problem. This study was designed to determine the prevalence of expanded-spectrum cephalosporins-resistant *Enterobacter* spp. isolates from patients in a tertiary care hospital in Busan, Korea, and to characterize the mechanism of resistance.

Materials and Methods: Nonduplicated clinical isolates of *Enterobacter* spp. were collected during the period of 1999-2000 in Kosin Medical Center, Busan, Korea. Antimicrobial susceptibilities were tested by disk diffusion method. Cefotaxime-resistant or intermediate isolates were examined for extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-production by double disk synergy (DDS) test. Minimal inhibitory concentrations were determined by agar dilution method. For detection of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes, polymerase chain reactions (PCRs) were performed, and the DNA sequences of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes were determined by using dideoxy-chain termination method.

Results: From 1999 to 2000, a total of 306 *Enterobacter* spp. strains were isolated from patients in Kosin Medical Center. Forty one percents of *Enterobacter* spp. isolates were susceptible to cefotaxime. Among 90 isolates resistant or intermediate to cefotaxime, 26 isolates (29%) showed positive results in double disk synergy test. Among DDS-positive- isolates, 22 isolates contained both of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes, while one isolate only contained *bla*_{TEM} gene and two isolates

서론

*Enterobacter*는 장내세균 과 (family *Enterobacteriaceae*) 에 속하는 그람음성간균으로, 물, 토양, 분변 등 인간이 생존하는 환경에 광범위하게 분포하고 있다[1]. 병원감염의 중요 원인균 중 하나인데, 미국에서는 요로, 창상 및 혈액 병원감염의 5번째로 흔한 원인균이며, 병원감염 페렴의 3번째로 흔한 원인균으로 보고되었다[2].

접수번호: CM 5-02-04

교신저자: 정석훈

(602-702) 부산시 서구 암남동 34번지

고신대학교 의과대학 임상병리학교실

Tel: 051) 990-6373 Fax: 051) 990-3034

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

*이 논문은 2001학년도 동아대학교 학술연구조성비(공모)에 의하여 연구되었음

only contained *bla_{SHV}* gene. Among 64 DDS-negative isolates, 47 isolates contained *bla_{TEM}* genes, and 12 isolates also contained *bla_{SHV}* genes. Nucleotide sequence analysis of PCR products from 10 DDS-positive and 6 DDS-negative isolates, which contained both of *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* genes, revealed that *bla_{TEM-1b}* and *bla_{SHV-12}* genes were the dominant types of β -lactamase gene.

Conclusion: Expanded-spectrum cephalosporins-resistant *Enterobacter* spp. were wide spread in Kosin Medical Center, Busan, Korea. Some of the resistant isolates acquired resistance by production of ESBLs, and *bla_{SHV-12}* gene was the most frequent ESBL gene in cefotaxime-resistant *Enterobacter* spp.

(*Korean J Clin Microbiol* 2002;5:97-104)

Key words : *Enterobacter*, Extended-spectrum β -lactamase, SHV-12

*Enterobacter*에 의한 감염증은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등 중요 병원세균에 비해서 빈도는 낮지만 임상적으로 더 위중한 증세를 보이는데, 이 세균에 의한 패혈증의 사망률은 그람양성세균에 비해서 2배에 달하며[3], 창상감염 검체에서 검출된 *E. coli*나 *S. aureus*가 실제 감염의 원인균일 확률은 30-55%에 불과하지만 *Enterobacter*는 확률이 100%에 달한다[4].

Oxyimino-cephalosporin은 AmpC β -lactamase에 의해서 가수분해되긴 하지만 유도성이 없으므로, 염색체성 유도성 AmpC β -lactamase를 생성하는 *Enterobacter*의 감염증 치료에 널리 사용되고 있다[5]. 그러나 탈억제에 의한 AmpC β -lactamase의 과량 생성[6] 혹은 plasmid에 매개되는 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성[7,8]에 의해서 이들 광범위 cephalosporin에 대한 내성을 획득한 세균이 만연되고 있어서 임상적으로 심각한 위협이 되고 있다.

특히 ESBL 생성 *Enterobacter*에 의한 감염의 만연 혹은 집단발생이 세계 여러나라에서 보고되고 있다. 그리스에서 1998년에서 1999년에 분리된 *Enterobacter* 68주 중 21주 (31%)가 ESBL을 생성하였다고 하며[9], 스페인에서는 CTX-M-10을 생성하는 *Enterobacter*가 다수 분리되었다는 보고가 있었다[8]. 또한 프랑스에서는 1996년 이후 3년 동안 TEM-24를 생성하는 *Enterobacter aerogenes*에 의한 대형 집단감염이 발생하였다고 한다[10].

국내에서 분리되는 *Klebsiella pneumoniae*나 *E. coli*의 ESBL 생성 현황과 유전형에 관한 보고는 여러번 있었지만[11-13], *Enterobacter*에 관한 보고는 거의 없다. 이에 본 연구에서는 부산의 한 대학병원의 임상검체에서 분리된 *Enterobacter*를 대상으로 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성 현황을 조사하고 그 기전을 규명함으로써 이 세균에 의한 감염증의 치료지침 정립에 기초가 되는 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *Enterobacter*의 분리 및 동정

1999년 1월에서 2000년 12월 2년간 고신의료원 환자의

임상 검체에서 분리된 *Enterobacter*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

미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 기준[14]에 따라서 디스크 확산법으로 시험하였다. 항균제 디스크로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin 및 trimethoprim-sulfamethoxazole 디스크 (BBL, Cockeysville, MI., USA)를 사용하였다. 대조균주 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 NCCLS 한천희석법[15]으로 시험하였다. 시험항균제로는 amoxicillin (동화, 서울), amoxicillin-clavulanic acid (일성, 안산), cephalothin, cefamandole, cefoxitin (Merck Sharp & Dohme), cefotetan, cefotaxime (한독, 서울), ceftazidime (한미, 화성), aztreonam (동아, 안산), cefepime 및 imipenem (중외, 서울)을 사용하였다. 정도관리를 위하여 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

4. Double disk synergy 시험

Cefotaxime에 중간내성 혹은 내성인 균주를 대상으로 Jarlier 등[16]의 방법으로 시험하였다. 즉, 순배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, TSB에 접종하여 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10 μ g, BBL),

그 주위에는 30 µg의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크 (이상 BBL)를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 35°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

5. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 ESBL 유전자 검출

Cefotaxime에 중간내성 혹은 내성인 균주를 대상으로 시험하였다. Lee 등[17]의 방법에 따라서 *bla*_{TEM} 유전자 검출용 primer는 T1 (5' -AGA GTA TGA GTA TTC AAC ATT-3')과 T2 (5' -ATC TCA GCG ATC TGT CTA T-3'), *bla*_{SHV} 유전자 검출에는 S1 (5' -GGG TTA TTC TTA TTT GTC GCT-3')과 S2 (5' -TAG CGT TGC CAG TGC TCG-3')을 사용하였다. 양성대조를 위해서는 *bla*_{TEM-1} 및 *bla*_{SHV-1} 유전자를 갖고있는 *E. coli*를 각각 사용하였다. 시험세균 및 대조세균을 TSB에 접종하여 37°C로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여서 5분간 13,000 g로 원심하였다. 상층액은 버리고, 침사는 증류수 500 µL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 g로 원심하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5 µL, primer 각 1 µL, deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 2.5 mM (1 µL), Taq DNA polymerase 2.5 U (1 µL), 10X buffer 5 µL 및 증류수 31 µL를 혼합하여 50 µL의 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT., USA)으로 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후 94°C로 20초간 denaturation, 52°C로 20초간 annealing, 72°C로 45초간 extension하는 30 cycle의 중합연쇄반응을 시키고 72°C로 7분간 postdenaturation하였다. 단, *bla*_{SHV} 유전자 검출을 위한 PCR에서는 annealing 온도를 56°C로 하였다. 증폭산물 10 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI., USA)에 40분간 전기영동하여서 *bla*_{TEM} 유전자 검출을 위한 PCR에서는 856 bp, *bla*_{SHV} 유전자 검출 PCR에서는 947 bp의 band를 각각 확인하였다 (Fig. 1).

6. ESBL 유전자의 유전형 분석

*bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자의 PCR 산물의 염기서열을 분석하여서 유전형을 규명하였다. 단, *bla*_{SHV} 유전자의 염기서열 분석에는 새로이 고안한 SJ-1 (5' -CTT CTT TAC TCG CCT TTA TC-3')과 SJ-2 (5' -GTC TTA TCG GCG ATA AAC CA-3') primer에 의한 PCR 산물을 추가로 사용하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Quiagene, Hiden, Germany)로 agarose gel에서 분리 후, Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH., USA)를 이용하여서 dideoxy-mediated chain

termination법[18]으로 염기서열을 분석하였다. 결과의 정확성을 위해서 양방향으로 분석하였다.

결 과

1. *E. cloacae*의 항균제 감수성 양성

시험기간 중 총 306주의 *Enterobacter*가 임상검체에서 분리되었다. 이들 균주 모두는 ampicillin과 cephalothin에 내성이었으며, imipenem에는 모두 감수성이었다. Cefotaxime과 ceftazidime에는 각각 41%, cefoxitin과 cefotetan는 각각 13%와 39%가 감수성이었다. Amikacin, gentamicin 및 tobramycin에 대한 감수성은 각각 84%, 52% 및 49%이었다 (Table 1).

2. ESBL 생성균주 선별

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *Enterobacter cloacae* 62주와 *E. aerogenes* 28주를 대상으로 시험하였으며, 이 중 *E. cloacae* 16주 (26%)와 *E. aerogenes* 10주 (36%)가 double disk synergy 양성이었다.

3. MIC

시험균주 90주 모두는 amoxicillin (>256 µg/mL), amoxicillin-clavulanic acid (≥64 µg/mL), cephalothin (≥64 µg/mL), cefamandole (≥32 µg/mL) 및 cefoxitin (≥32 µg/mL)에 내성이었으며, imipenem (≤4 µg/mL)에는 감수성이었다. Cefotetan에는 6주 (7%)가 감수성(≤16 µg/mL)이었으며, cefepime에는 56주 (62%)가 감수성 (≤8 µg/mL)이었다.

4. *bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자 검출을 위한 PCR

Cefotaxime에 내성 혹은 중간인 균주 90주를 대상으로 *bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자 검출을 위한 PCR을 시행하였다. *bla*_{TEM} 유전자 검출용 PCR에서는 70주 (78%), *bla*_{SHV} 유전자 검출용 PCR에서는 37주 (41%)가 양성반응을 보였다. Double disk synergy 양성인 균주 26주 중 23주는 *bla*_{TEM} 유전자 양성이었으며 24주는 *bla*_{SHV} 유전자 양성이었다. 26주 중 22주는 *bla*_{TEM}과 *bla*_{SHV} 유전자 모두를 갖고 있었으며, 1주는 *bla*_{TEM} 유전자, 2주는 *bla*_{SHV} 유전자만을 갖고 있었다. 1주에서는 *bla*_{TEM}과 *bla*_{SHV} 유전자 모두가 검출되지 않았다. Double disk synergy 음성인 균주 64주 중 47주는 *bla*_{TEM} 유전자를 갖고 있었으며, 이 중 12주는 *bla*_{SHV} 유전자도 함께 갖고 있었다 (Table 2).

5. *bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자의 염기서열 분석

Double disk synergy 양성이면서 *bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자

Table 1. Antimicrobial susceptibilities of 306 isolates of *Enterobacter* spp. from clinical specimens during the period of 1999 to 2000

Antimicrobial agents	% Susceptible	Antimicrobial agents	% Susceptible
Ampicillin	0	Imipenem	100
Ampicillin-sulbactam	18	Amikacin	84
Cephalothin	0	Gentamicin	52
Cefotaxime	41	Tobramycin	49
Ceftazidime	41	TMP-SMZ	49
Cefoxitin	13	Ciprofloxacin	76
Cefotetan	39		

Abbreviations: TMP-SMZ, trimethoprim-sulfamethoxazole.

Table 2. Profiles of *Enterobacter* spp. isolates with decreased susceptibility to cefotaxime isolated from clinical specimens (no. isolates)

Species	Double disk synergy		Genotype	
<i>E. cloacae</i> (62)	Positive	(16)	<i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(13)
			<i>bla</i> _{TEM}	(1)
			<i>bla</i> _{SHV}	(2)
	Negative	(46)	<i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(9)
			<i>bla</i> _{TEM}	(26)
			None of <i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(11)
<i>E. aerogenes</i> (28)	Positive	(10)	<i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(9)
			None of <i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(1)
	Negative	(18)	<i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(4)
			<i>bla</i> _{TEM}	(8)
			None of <i>bla</i> _{TEM} and <i>bla</i> _{SHV}	(6)

모두를 갖고있는 *E. cloacae* 7주와 *E. aerogenes* 3주 및 double disk synergy 음성이면서 두 유전자 모두를 갖고있는 6주의 내성 유전자 염기서열을 분석하여 유전형을 확인하였다. *bla*_{TEM} 유전자 모두는 *bla*_{TEM-1b}였으며, *bla*_{SHV} 유전자 모두는 *bla*_{SHV-12}였다 (Table 2). *bla*_{TEM-1b}는 *bla*_{TEM-1a}에 비해서 encode하는 아미노산의 변화는 없었으나, 염기서열 18번 (c→t), 228번 (c→t) 및 396번 (g→t)에서 silent point mutation을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). *bla*_{SHV-12}는 *bla*_{SHV-1}에 비해서 6군데에서 점 변이가 있었다. 아미노산 92번 (cta→caa)의 변이는 leucine을 glutamine, 700번 (ggc→agc)은 glycine을 serine, 703번 (gag→aag)은 glutamic acid를 alanine으로 변화시키는 것이었으며, 아미노산 234번, 402번 및 786번의 변이는 silent point mutation이었다 (Table 3, Fig. 3).

고 찰

고신의료원에서 1999년-2000년에 분리된 *Enterobacter*

의 cefotaxime과 ceftazidime에 대한 감수성은 각각 41%로 1997년-1998년[19]의 42% 및 45%와 유사하였다. 그러나 double disk synergy 양성인 균주의 비율은 18% (19/107)에서 29% (26/90)으로 현저하게 증가된 양상을 보였으며, 이는 ESBL 생성균주의 확산을 반영하는 결과로 생각된다.

본 연구의 대상 90주 중 35주는 TEM과 SHV 유전자를 동시에 지니고 있었는데, 이 중 double disk synergy 음성인 13주에 대한 cefotetan의 MIC는 모두 >256 µg/mL로 고도내성인데 반하여, 양성균주 22주에 대한 MIC는 1-256 µg/mL로 상대적으로 낮았다 (Table 2). 탈억제 세균이 ESBL을 생성하는 경우 염색체성 AmpC β-lactamase의 생성량에 따라서 double disk synergy 시험의 결과가 결정된다고 한다[20]. 즉, 염색체성 AmpC β-lactamase의 생성량이 상대적으로 낮아서 cefotetan의 MIC가 256 µg/mL 이하인 균주에서는 clavulanic acid에 의한 ESBL 활성 억제 효과가 발현되어서 double disk synergy 양성 결과를 보였지만, 염색체성 AmpC β-lactamase의 생성량이 많아

Table 3. Point mutations in the open reading frame of *bla*_{SHV-12} gene compared to known sequences

<i>bla</i> _{SHV}	Codon for amino acid (deduced amino acid)					
	92	234	402	700	703	786
<i>bla</i> _{SHV-1}	CTA (L)	GCA (A)	CTA (L)	GGC (G)	GAG (E)	ACC (T)
<i>bla</i> _{SHV-1a}	CAA (Q)	GCG (A)	CTG (L)	GGC (G)	GAG (E)	ACG (T)
<i>bla</i> _{SHV-2}	CTA (L)	GCG (A)	CTA (L)	AGC (S)	GAG (E)	ACC (T)
<i>bla</i> _{SHV-2a}	CAA (Q)	GCG (A)	CTG (L)	AGC (S)	GAG (E)	ACG (T)
<i>bla</i> _{SHV-5}	CTA (L)	GCG (A)	CTG (L)	AGC (S)	AAG (K)	ACG (T)
<i>bla</i> _{SHV-12}	CAA (Q)	GCG (A)	CTG (L)	AGC (S)	AAG (K)	ACG (T)

Abbreviations: A, alanine; E, glutamic acid; G, glycine; K, lysine; L, leucine; Q, glutamine; S, serine; T, threonine.

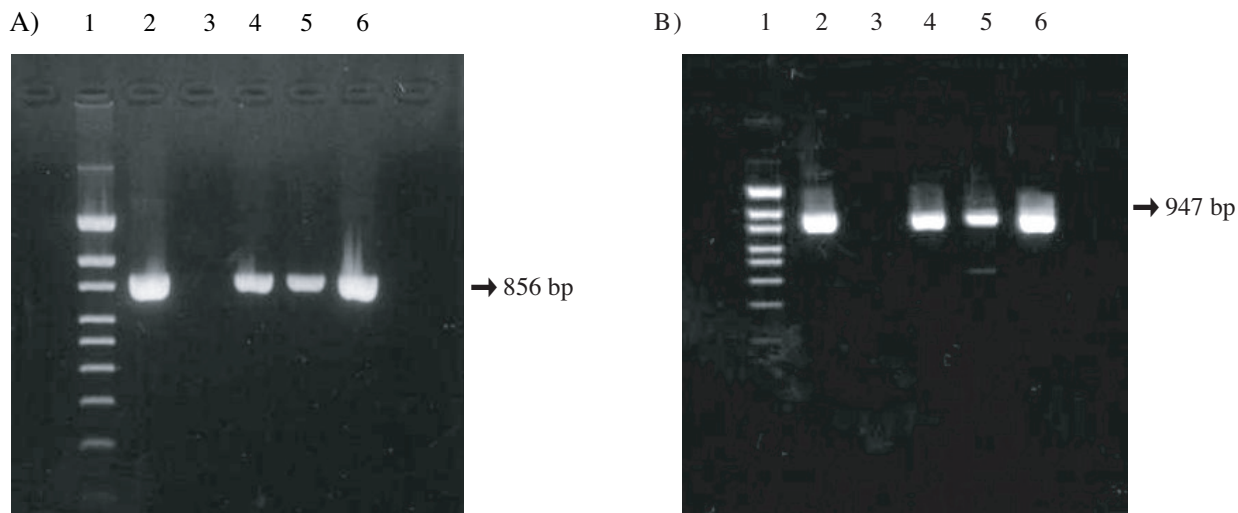


Fig. 1. Detection of amplified products of *bla*_{TEM} genes (A) and *bla*_{SHV} genes (B) after 2% agarose gel electrophoresis. Lanes: 1, DNA molecular weight marker (Φ X174 DNA/*Hae* III Markers, Promega); 2, Positive control, TEM-1-producing *E. coli* (A) or SHV-1-producing *E. coli* (B); 3, Negative control, *E. coli* ATCC 25922; 4-6, Clinical isolates of *Enterobacter* spp.

cefotetan의 MIC가 >256 µg/mL인 균주에서는 이 효과가 차폐되어서 double disk synergy 음성결과를 보인 것으로 추측되었다. 본 연구에서는 염기분석을 통하여 double disk synergy 양성균주 10주와 음성균주 6주 모두가 ESBL인 SHV-12 유전자를 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

SHV-12는 Nuesch-Inderbinen 등[21]에 의해서 스위스에서 분리된 *K. pneumoniae*와 *E. coli*에서 처음 발견된 ESBL이며, SHV-2a 및 SHV-5에서 유래된 것이다. 이 효소는 oxyimino-cephalosporin과 aztreonam에 대한 고도내성을 부여한다[22]. SHV-2a와 함께 국내에서 분리되는 *K. pneumoniae*가 생성하는 ESBL 중 가장 흔한 것으로 보고되었으며[22], 대만[23], 이태리[24], 호주[25]에서도 빈번하게 분리되었다고 한다. 본 연구의 결과는 SHV-12 유전자가 *Enterobacter*에서도 확산되고 있음을 보여주며, 이에 대한 대비책 마련이 필요한 것으로 생각되었다. Double disk synergy 양성이면서 TEM (KU0001441) 혹은 SHV (KU9911905, KU9915473) 유전자 하나에만 양성인

균주와 TEM과 SHV 유전자 모두에 음성인 균주 (KU9913093) 1주가 확인되었으나 그 유전형을 확인하지 못하였다. 이들 세균의 내성기전에 대해서는 추가적으로 연구하여 추후 보고할 예정이다.

이상의 결과에서 국내에서 분리되는 *Enterobacter* 중에는 광범위 cephalosporin에 내성인 균주가 많으며, 탈억제에 의한 AmpC β-lactamase 과량생성 외에 ESBL인 SHV-12의 생성 역시 주요 내성기전임을 확인할 수 있었다. 이들 내성세균의 확산 방지를 위한 체계적인 대책이 필요한 것으로 생각되었다.

요 약

배 경 : 임상검체에서 분리되는 *Enterobacter*의 광범위 cephalosporin에 대한 내성을 증가는 임상적으로 심각한 문제이다. 본 연구에서는 부산에 위치한 한 대학병원 환자의 임상검체에서 분리된 *Enterobacter*를 대상으로 광


```

1  ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT
M  S  I  Q  H  F  R  V  A  L  I  P  F  F  A  A  F  C  L  P
61  GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
V  F  A  H  P  E  T  L  V  K  V  K  D  A  E  D  Q  L  G  A
121  CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC
R  V  G  Y  I  E  L  D  L  N  S  G  K  I  L  E  S  F  R  P
181  GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC
E  E  R  F  P  M  M  S  T  F  K  V  L  L  C  G  A  V  L  S
241  CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
R  V  D  A  G  Q  E  Q  L  G  R  R  I  H  Y  S  Q  N  D  L
301  GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
V  E  Y  S  P  V  T  E  K  H  L  T  D  G  M  T  V  R  E  L
361  TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
C  S  A  A  I  T  M  S  D  N  T  A  A  N  L  L  L  T  T  I
421  GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
G  G  P  K  E  L  T  A  F  L  H  N  M  G  D  H  V  T  R  L
481  GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
D  R  W  E  P  E  L  N  E  A  I  P  N  D  E  R  D  T  T  M
541  CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT
P  A  A  M  A  T  T  L  R  K  L  L  T  G  E  L  L  T  L  A
601  TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC
S  Q  Q  Q  L  I  D  W  M  E  A  D  K  V  A  G  P  L  L  R
661  TCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT
S  A  L  P  A  G  W  F  I  A  D  K  S  G  A  G  E  R  G  S
721  CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC
R  G  I  I  A  A  L  G  P  D  G  K  P  S  R  I  V  V  I  Y
781  ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
T  T  G  S  Q  A  T  M  D  E  R  N  R  Q  I  A  E

```

Fig. 2. Partial nucleotide sequence of the *bla*_{TEM-1b} gene of *E. cloacae* KU99002. The deduced amino acid sequence is designated in the single-letter code below the nucleotide sequence. The silent mutated nucleotides compared to *bla*_{TEM-1a} gene are indicated by bold faced letters.

범위 cephalosporin에 대한 내성 현황을 조사하고 기전을 규명하고자 하였다.

방 법 : 1999년 1월에서 2000년 12월에 고신의료원 환자의 임상 검체에서 분리된 *Enterobacter*를 대상으로 하였다. 디스크 확산법으로 항균제 감수성을 시험하였으며, cefotaxime에 내성 혹은 중간내성인 균주를 대상으로 한천희석법으로 최소억제농도를 측정하였다. Double disk synergy 시험으로 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성을 시험하였으며, 중합연쇄반응으로 ESBL 유전자를 검출하였다. 또한 dideoxy-mediated chain termination법으로 염기서열을 분석하여서 ESBL의 유전형질을 규명하였다.

결 과 : 시험기간 중 총 306주의 *Enterobacter*가 임상 검체에서 분리되었으며, 이들 균주의 41%가 cefotaxime에 감수성이었다. Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주 90주 중 26주 (29%)가 double disk synergy 양성이었다.

이중 22주는 *bla*_{TEM}과 *bla*_{SHV} 유전자 모두를 갖고 있었으며, 1주는 *bla*_{TEM} 유전자, 2주는 *bla*_{SHV} 유전자만을 갖고 있었다. 1주에서는 *bla*_{TEM}과 *bla*_{SHV} 유전자 모두가 검출되지 않았다. Double disk synergy 음성인 균주 64주 중 47주는 *bla*_{TEM} 유전자를 갖고 있었으며, 이 중 12주는 *bla*_{SHV} 유전자도 함께 갖고 있었다. Double disk synergy 양성인 *bla*_{TEM} 및 *bla*_{SHV} 유전자 모두를 갖고있는 10주 및 double disk synergy 음성인 *bla*_{TEM} 유전자 모두를 갖고있는 6주의 내성 유전자 염기서열을 분석하여 유전형을 확인하였는데, *bla*_{TEM} 유전자 모두는 *bla*_{TEM-1b}였으며, *bla*_{SHV} 유전자 모두는 *bla*_{SHV-12}였다.

결 론 : 고신의료원에서 분리되는 *Enterobacter* 중에는 광범위 cephalosporin에 내성인 균주가 흔하며, 이 중 일부는 ESBL의 생성에 의해서 내성을 획득하였고, ESBL 유전자로는 *bla*_{SHV-12}가 흔함을 확인할 수 있었다.

```

1  ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC
M  R  Y  I  R  L  C  I  I  S  L  L  A  T  L  P  L  A  V  H
61  GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCGCGTA
A  S  P  Q  P  L  E  Q  I  K  Q  S  E  S  Q  L  S  G  R  V
121  GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAA
G  M  I  E  M  D  L  A  S  G  R  T  L  T  A  W  R  A  D  E
181  CGCTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTG
R  F  P  M  M  S  T  F  K  V  V  L  C  G  A  V  L  A  R  V
241  GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC
D  A  G  D  E  Q  L  E  R  K  I  H  Y  R  Q  Q  D  L  V  D
301  TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCC
Y  S  P  V  S  E  K  H  L  A  D  G  M  T  V  G  E  L  C  A
361  GCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGC
A  A  I  T  M  S  D  N  S  A  A  N  L  L  L  A  T  V  G  G
421  CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGC
P  A  G  L  T  A  F  L  R  Q  I  G  D  N  V  T  R  L  D  R
481  TGGGAAACGGAACTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACCGCCGACACCACTACCCCGGCC
W  E  T  E  L  N  E  A  L  P  G  D  A  R  D  T  T  T  P  A
541  AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAA
S  M  A  A  T  L  R  K  L  L  T  S  Q  R  L  S  A  R  S  Q
601  CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGACCGTTGATCCGCTCCGTG
R  Q  L  L  Q  W  M  V  D  D  R  V  A  G  P  L  I  R  S  V
661  CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGG
L  P  A  G  W  F  I  A  D  K  T  G  A  S  K  R  G  A  R  G
721  ATTGTCGCCCTGCTTGCCCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG
I  V  A  L  L  G  P  N  N  K  A  E  R  I  V  V  I  Y  L  R
781  GATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGGATC
D  T  P  A  S  M  A  E  R  N  Q  Q  I  A  G  I
    
```

Fig. 3. Partial nucleotide sequence of the *bla_{SHV-12}* gene of *E. cloacae* KU99002. The deduced amino acid sequence is designated in the single-letter code below the nucleotide sequence. The silent mutated nucleotides and substituted amino acids compared to *bla_{SHV-1}* gene are indicated by bold faced letters.

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.
- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;91(S):S72-5.
- Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multi-center study evaluating epidemiology and prognosis. *Clin Infect Dis* 1997;24:387-95.
- Twum-Danso KCG, Al-Suleiman SA, Abdel-Khader S, Al-Awami MS, Al-Breiki H, Taha S, et al. *Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds*. *J Hosp Infect* 1992;21:29-37.
- Livermore DM. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
- Bennet PM, Chopra I. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:153-8.
- Dumarche P, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1128-31.
- Canton R, Oliver A, Coque TM, del Carmen Varela M, Perez-Diaz JC, Barquero F. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002;40:1237-43.

9. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. *Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacter cloacae and Enterobacter aerogenes.* J Clin Microbiol 2000;38:542-6.
10. Hammeri H, Laurans G, Eveillard M, Castelain S, Eb F. *Coexistence of SHV-4- and TEM-24-producing Enterobacter aerogenes strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital.* J Clin Microbiol 2001;39:2184-90.
11. 송원근, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈, 신혜정 등. 전국 12개 병원 환자에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 생성 Escherichia coli와 Klebsiella pneumoniae. 대한화학요법학회지 2000;18:401-10.
12. 김정만, 정석훈, 이상희, 김지혜, 김빛나, 김종철. 임상검체에서 분리된 Escherichia coli와 Klebsiella pneumoniae의 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성현황과 기전. 대한임상미생물학회지 2002;5:6-14.
13. Lee SH and Jeong SH. *Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with various infections.* Lett Appl Microbiol 2002;34:215-21.
14. National Committee for Clinical laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 6th informational supplement. NCCLS document M100-S6. Pennsylvania: NCCLS, 1998.*
15. National Committee for Clinical laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. M2-A6. Pennsylvania: NCCLS, 1998.*
16. 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 1988;10:867-78.
17. 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.
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-termination inhibitors.* Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
19. 김병립, 정석훈, 구자영, 이경원, 정윤섭, 정태진 등. Extended-spectrum β -lactamase 생성 장내세균의 분리를 및 선별검사. 대한임상미생물학회지 1999;2:28-39.
20. Bush K. *Is it important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates?* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:361-4.
21. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. *Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12.* Antimicrob Agents Chemother 1997;41:943-9.
22. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim J-W, Cho D-T. *Survey of Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea.* J Clin Microbiol 1998;36:1446-9.
23. Yan J-J, Wu S-M, Tsai S-H, Wu J-J, Su I-J. *Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan.* 2000;44:1438-42.
24. Villa L, Mammina C, Miriagou V, Tzouveleki LS, Tassios PT, Nastasi A, et al. *Multidrug and broad-spectrum cephalosporin resistance among Salmonella enterica serotype enteritidis clinical isolates in Southern Italy.* J Clin Microbiol 2002;40:2662-5.
25. Howard C, van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. *Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated Klebsiella pneumoniae in Brisbane, Australia.* Antimicrob Agents Chemother 2002;46:659-64.