

국내에서 2003년에 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 CTX-M형 Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 현황

이정현¹, 배일권², 권수봉², 정석훈², 우건조³, 이종욱⁴, 이위교⁵, 강정옥⁶, 안지영⁷, 홍성근⁸
신종희⁹, 어 영¹⁰, 박연준¹¹, 김의종¹², 이경원¹³, 용동은¹³

고신의대 소아과학교실¹, 진단검사의학교실², 식품의약품안전청 식품미생물과³, 건양의대⁴, 아주의대⁵,
한양의대⁶, 순천향의대⁷, 포천중문의대⁸, 전남의대⁹, 원주의대¹⁰, 가톨릭의대¹¹, 서울의대¹², 연세의대¹³
진단검사의학교실

Prevalence of CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea, 2003

Jung Hyun Lee¹, Il Kwon Bae², Su Bong Kwon², Seok Hoon Jeong², Gun Jo Woo³, Jongwook Lee⁴,
Wee Gyo Lee⁵, Jung Oak Kang⁶, Ji Young Ahn⁷, Seong Geun Hong⁸, Jong Hee Shin⁹, Young Uh¹⁰,
Yeon Jun Park¹¹, Eui-Chong Kim¹², Kyungwon Lee¹³, Dongeun Yong¹³

Departments of Pediatrics¹ and Laboratory Medicine², Kosin University College of Medicine; Division of Food Microbiology, Korea Food and Drug Administration³; Departments of Laboratory Medicine, Keonyang University College of Medicine⁴, Ajou University College of Medicine⁵, Hanyang University College of Medicine⁶, Sooncheonhyang University College of Medicine⁷, Pochon CHA University College of Medicine⁸, Chonnam National University Medical School⁹, Yonsei University Wonju College of Medicine¹⁰, The Catholic University of Korea College of Medicine¹¹, Seoul National University College of Medicine¹², Yonsei University College of Medicine¹³

Background : The aims of this study were to survey nationwide susceptibilities of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates against cefotaxime and to determine the prevalences of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases(ESBLs).

Methods : During the period of February to July, 2003, *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates were collected from 12 hospitals. Antimicrobial susceptibilities to cefotaxime were tested by the disk diffusion method. ESBL production was determined by the double disk synergy test. Cefotaxime-resistance of the ESBL-producers was transferred to *E. coli* DH5 α and *E. coli* Top10-F by transformation. MICs of β -lactam antibiotics were determined by the agar dilution method. Searches for *bla*_{CTX-M} genes was performed by PCR amplification; pls of β -lactamases were determined by isoelectric focusing.

Results : Among 230 isolates of *E. coli* and 232 isolates of *K. pneumoniae*, 27 (11.7%) and 79 (34.1%) were intermediate or resistant to cefotaxime, respectively. Twenty-four (10.4%) isolates of *E. coli* and 58 (25.0%) *K. pneumoniae* isolates showed positive results in the double disk synergy test. Three isolates of *E. coli* and 13 *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{CTX-M-3} gene, 4 *E. coli* isolates harbored *bla*_{CTX-M-15} gene, and 1 *E. coli* and 5 *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{CTX-M-14} gene.

접 수 일: 04/5/24 게재승인일: 04/8/18

교신저자: 정석훈

(602-702) 부산광역시 서구 암남동 34번지

고신대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL: (051)990-6373 FAX: (051)990-3034

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

본 연구는 식약청의 지원에 의하여 이루어진 것임(03092항내안750-2).

서 론

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)는 가수분해 활성범위가 매우 넓은 효소로, 가수분해 기질 특이성 및 억

Conclusion : *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates producing CTX-M-type ESBLs were not uncommon in Korean hospitals. It is thought that periodical surveys are necessary for inspecting the spread of CTX-M-type ESBL genes are necessary. (*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(2):111-118)

Key words : Extended-Spectrum β -Lactamase, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15.

제특이성에 따른 Bush 등[1]의 분류에서 group 2be, 분자 구조에 따른 분류에서는 class A에 속한다[2]. 이들 효소는 penicillin, 헤파임 cephalosporin과 제 3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등의 광범위 β -lactam 항균제를 분해하지만, clavulanic acid, sulbactam, tazobactam 등 β -lactamase inhibitor에 의해 활성이 억제되며, cephamycin과 carbapenem에는 활성이 없다[3]. 가장 널리 알려진 ESBL인 TEM형 및 SHV형 효소는 TEM-1, TEM-2와 SHV-1의 아미노산 1개 이상의 치환에 의해 생성되었으며, 현재까지 80가지 이상의 TEM형 ESBL과 30가지 이상의 SHV형 ESBL이 보고되었다[4].

CTX-M형 ESBL 역시 plasmid에 매개되며, 가수분해 기질특이성 및 억제특이성이 TEM형이나 SHV형 ESBL과 유사하지만, ceftazidime에 대한 가수분해 활성이 cefotaxime에 비해 강하거나 비슷한 TEM형 혹은 SHV형 ESBL과는 달리 cefotaxime에 대한 가수분해 활성이 ceftazidime에 비해 상대적으로 강한 특성이 있다[4]. 1996년 Bauernfeind 등[5]에 의해 CTX-M-1과 CTX-M-2가 보고된 이후 현재까지 30여종이 알려졌다[4]. 국내에서는 2001년 CTX-M-14 생성 *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 및 *Shigella sonnei*가 보고되었으며[6], 2002년 전국의 13개 병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 한 CTX-M형 ESBL의 생성빈도 조사에서 CTX-M-3 생성 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 2주, CTX-M-15 생성 *E. coli* 2주, CTX-M-14 생성 *E. coli* 2주와 *K. pneumoniae* 2주가 분리된 바 있다[7].

CTX-M형 ESBL은 TEM형이나 SHV형 ESBL과 구분되는 새로운 효소군으로 분리빈도와 유형이 증가하고 있으나 아직 국내에서의 연구는 드물다. 본 연구에서는 2003년 전국 12개 주요병원에서 분리된 cefotaxime 중간 혹은 내성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 CTX-M형 ESBL의 생성현황을 조사하고 효소의 유전형을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

서울 3개 병원, 경기도 3개 병원, 강원도 1개 병원, 대전 1개 병원, 광주 1개 병원, 경상북도 1개 병원, 부산 1개 병원, 제주 1개 병원 등 총 12개 병원이 본 조사에 참여하였다. 2003년 2월-7월에 이들 12개 병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 각 20주씩을 수집하였는데, 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 수집하였으며, 동일 환

자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 시험

미국의 National Committee for clinical Laboratory clinical Standards (NCCLS)의 기준에 따라서 cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법[8]으로 확인하였다. 결과의 정확성을 위하여 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. ESBL 생성 확인

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 double disk synergy법으로 확인하였다[9]. 세균 부유액을 먼 봉으로 Mueller-Hinton한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10 μ g, BBL, Cockeysville, Mich., USA), 주위에는 30 μ g의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37 $^{\circ}$ C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

4. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다[10]. 시험 항균제로는 ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime-clavulanic acid 및 cefotaxime-clavulanic acid를 사용하였으며 clavulanic acid는 4 mg/L 농도로 고정하였다. 시험균주 10^4 colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 mg/L 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, Pa., USA)로 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 정도관리를 위해서 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

5. 형질 전환에 의한 내성 전달

Sambrook 등[11]의 방법을 사용하였다. Competent cell

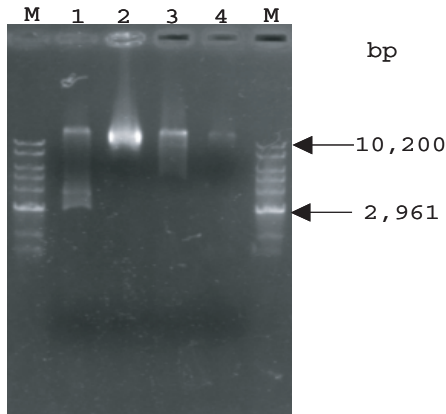


Fig. 1. Banding patterns of cell extracted plasmids containing *bla*_{CTX-M-3} gene in 2 clinical isolates and 2 transformants after 1.0% agarose gel electrophoresis. Lane M, 1 kb DNA ladder DNA; lane 1, *K. pneumoniae* WK6; lane 2, *E. coli* trf-WK6, lane 3, *K. pneumoniae* WK15; lane 4, *E. coli* trf-WK15.

로 *E. coli* DH5 와 *E. coli* Top10-F를 사용하였다. 시험균주를 cefotaxime이 2 mg/L 농도로 함유된 Luria-Bertani (LB) 액체배지, competent cell을 항균제가 함유되지 않은 LB 액체배지에 각각 접종하여서 37℃ 진탕배양기에서 200 rpm으로 하룻밤 배양하였다. Competent cell 배양액 100 L를 취하여 LB 액체배지 10 mL에 접종하고 37℃에서 진탕배양기로 2시간 파종배양(seed culture)하였다. 시험세균의 plasmid DNA를 추출 후, 0.1 M CaCl₂로 2회 세척한 competent cell 파종배양액 100 mL와 plasmid DNA 10 ng을 혼합하였다. 혼합액을 얼음에 15분 이상 노출하였다가 42℃ 물에 2분간 담갔다. 이를 37℃에서 1시간 배양 후, cefotaxime 8 mg/L가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. Transformant와 원균주의 plasmid 추출액을 전기영동하여서 형질전환을 확인하였다(Fig. 1,2).

6. Isoelectric focusing (IEF)에 의한 등전점 (pI) 측정

세균 추출액 10 µL와 동량의 sample buffer (TEFCO Corporation, Tokyo, Japan)를 섞어 agarose gel (pH 3-10, TEFCO Corporation)에 100V로 1시간, 200V로 1시간 및 300V로 40분간 전기영동하였다. Nitrocefin (Oxoid, Hampshire, England)에 적신 여과지로 gel을 덮고 20초간 염색하였다. Gel에 나타난 붉은색의 band를 관찰하여 β-lactamase의 pI를 확인하였다.

7. 분자생물학적 방법에 의한 내성유전형 확인

PCR로 CTX-M형 ESBL의 유전형을 시험하였다. 배 등

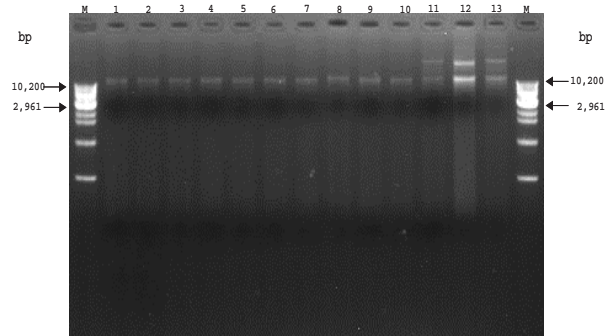


Fig. 2. Plasmid patterns of *bla*_{CTX-M-3} gene in Kyonggi A and Gangwon A hospitals after 1.0% agarose gel electrophoresis. Lane M, 1 kb DNA ladder DNA; lane 1-8, CTX-M-3-producing *K. pneumoniae* isolates obtained in Kyonggi A hospital; lane 9 and 10, CTX-M-3-producing *E. coli* isolates obtained in Kyonggi A hospital; lane 11-13, CTX-M-3-producing *K. pneumoniae* isolates obtained in Gangwon A hospital.

[7]이 고안한 primer를 사용하였다(Table 1). 시험세균을 Tryptic soy broth (Difco)에 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕 배양 하였다. 배양액 1 mL를 취하여 5분간 13,000 Xg로 원침 후, 침사를 증류수 500 µL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 Xg로 원침하였다. 상청액을 취하여 DNA 추출액 5 µL, primer 각 1 L, 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 PCR 반응액을 만들었다. 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 30 cycle의 PCR를 시행하였다. 증폭산물 10 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, Wi., USA)에 40분간 전기영동하여 증폭산물의 band를 확인하였다. PCR 증폭산물을 추출하여서 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, Oh., USA)를 이용하여 dideoxy-mediated chain termination법[12]으로 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

항균제 감수성 조사에 참여한 전국 12개 기관에서 수집한 *E. coli* 230주와 *K. pneumoniae* 232주 중 *E. coli* 27주 (11.7%)와 *K. pneumoniae* 79주 (34.1%)가 cefotaxime에 중간 혹은 내성이었다(Table 2).

Table 1. Sequences of the PCR primers

Name	Nucleotide Sequence	GenBank Accession No.	Product size(bp)
CTX-M-1F	5' -atgatgactcagagcattcgc-3'	AJ272538	893
CTX-M-1R	5' -tcgtccattattgcatca-3'		
CTX-M-2F	5' -cccattggttaaaaaatcactg-3'	AF488377	891
CTX-M-2R	5' -ccgtttccgctattacaac-3'		
CTX-M-3F	5' -atgttaatgacgacagcctgtg-3'	AY157676	689
CTX-M-3R	5' -ccgctttatccccgaca-3'		
CTX-M-4F	5' -gattgaccgtattgggagttt-3'	AF174129	909
CTX-M-4R	5' -tattgaggttacagcccttcg-3'		

Table 2. Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates in 2003

Locations		Species	Isolates	No. (%)	
				CTX I/R	DDS +
Seoul	A	<i>E. coli</i>	20	7 (35)	6 (30)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	2 (10)	2 (10)
	B	<i>E. coli</i>	20	3 (15)	3 (15)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	7 (35)	6 (30)
	C	<i>E. coli</i>	20	1 (5)	1 (5)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	2 (10)	2 (10)
Kyonggi	A	<i>E. coli</i>	20	5 (25)	6 (30)
		<i>K. pneumoniae</i>	18	14 (78)	9 (50)
	B	<i>E. coli</i>	10	2 (20)	2 (20)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	9 (45)	9 (45)
	C	<i>E. coli</i>	20	1 (5)	1 (5)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	10 (50)	6 (30)
Gangwon	A	<i>E. coli</i>	20	0 (0)	0 (0)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	6 (30)	6 (30)
Daejeon	A	<i>E. coli</i>	20	0 (0)	0 (0)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	9 (45)	5 (25)
Jeonnam	A	<i>E. coli</i>	20	1 (5)	0 (0)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	4 (20)	1 (5)
Gyeongbuk	A	<i>E. coli</i>	20	1 (5)	1 (5)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	5 (25)	6 (30)
Busan	A	<i>E. coli</i>	20	4 (20)	3 (15)
		<i>K. pneumoniae</i>	20	4 (20)	4 (20)
Jeju	A	<i>E. coli</i>	20	2 (10)	1 (5)
		<i>K. pneumoniae</i>	14	7 (50)	2 (14)
Total		<i>E. coli</i>	230	27(11.7)	24(10.4)
		<i>K. pneumoniae</i>	232	79(34.1)	58(25.0)

Abbreviations: CTX I/R, cefotaxime-intermediate or -resistant; DDS, double disk synergy.

2. ESBL 생성 확인과 형질전환에 의한 내성 전달

E. coli 24주 (10.4%)와 *K. pneumoniae* 58주 (25.0%)가 double disk synergy 양성이었다(Table 2). CTX-M형 ESBL 유전자 양성인 *E. coli* 8주와 *K. pneumoniae* 18주를 대상으로 형질전환에 의한 내성 전달성을 시험하였으며, *E. coli* 6주 (75%)와 *K. pneumoniae* 15주 (83%)의 cefotaxime

내성이 competent cell인 *E. coli* DH5 혹은 *E. coli* Top10-F로 전달되었다.

3. ESBL 유전형

Double disk synergy 양성인 균주 중 *E. coli* 7주와 *K. pneumoniae* 13주는 CTX-M-3F 및 CTX-M-3R primer를 이

Table 3. Characteristics of CTX-M-type β -lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates

Genotype	Isolates	Species	MICs(mg/L)				pI
			CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	
CTX-M-3	SN8	<i>E. coli</i>	>256	>256	>256	>256	8.4
	trfSN8	<i>E. coli</i>	>256	32	16	16	
	AJ4	<i>E. coli</i>	>256	128	16	16	
	trfAJ4	<i>E. coli</i>	256	32	16	16	
	AJ18	<i>E. coli</i>	>256	>256	>256	>256	
	AJ2	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	AJ3	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	256	128	
	trfAJ3	<i>E. coli</i>	64	2	4	0.5	
	AJ5	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfAJ5	<i>E. coli</i>	64	2	4	0.5	
	AJ8	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	AJ14	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	256	128	
	trfAJ14	<i>E. coli</i>	64	16	2	1	
	AJ15	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	256	256	
	trfAJ15	<i>E. coli</i>	64	16	2	1	
	AJ18	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfAJ18	<i>E. coli</i>	256	32	16	16	
	AJ20	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfAJ20	<i>E. coli</i>	64	32	2	2	
	WK7	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfWK7	<i>E. coli</i>	256	256	128	4	
	WK14	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfWK14	<i>E. coli</i>	256	256	16	4	
	WK15	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfWK15	<i>E. coli</i>	64	32	2	1	
	HY12	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	KY2	<i>K. pneumoniae</i>	256	32	>256	64	
	trfKY2	<i>E. coli</i>	8	2	64	8	
CTX-M-15	KS10	<i>E. coli</i>	>256	>256	>256	>256	8.6
	trfKS10	<i>E. coli</i>	128	2	32	2	
	AJ16	<i>E. coli</i>	>256	>256	128	64	
	trfAJ16	<i>E. coli</i>	>256	>256	64	64	
	HY1	<i>E. coli</i>	>256	128	>256	64	
	HY2	<i>E. coli</i>	>256	>256	>256	128	
	trfHY2	<i>E. coli</i>	128	4	32	1	
CTX-M-14	SC6	<i>E. coli</i>	>256	>256	64	64	8.1
	trfSC6	<i>E. coli</i>	256	256	16	16	
	SC14	<i>K. pneumoniae</i>	>256	256	64	64	
	trfSC14	<i>E. coli</i>	64	32	4	1	
	KY7	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	256	256	
	trfKY7	<i>E. coli</i>	128	256	4	4	
	KY8	<i>K. pneumoniae</i>	>256	>256	>256	>256	
	trfKY8	<i>E. coli</i>	128	32	1	2	
	SE18	<i>K. pneumoniae</i>	>256	256	64	64	
	trfSE18	<i>E. coli</i>	64	16	4	1	
	WK6	<i>K. pneumoniae</i>	256	64	16	8	
	trfWK6	<i>E. coli</i>	128	32	2	2	

Abbreviations: CTX, cefotaxime; CTX/CLA, cefotaxime/clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime/clavulanic acid; SN, Seoul A; SE, Seoul B; AJ, Kyonggi A; HY, Kyonggi B; WK, Gangwon A; KY, Daejeon A; SC, Gyeongbuk A; KS, Busan A.

* Clavulanic acid at a fixed concentration of 4 mg/L.

용한 PCR, *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 5주는 CTX-M-4F 및 CTX-M-4R primer를 이용한 PCR에 각각 양성반응을 보였다. CTX-M-1F와 CTX-M-1R 및 CTX-M-2F와 CTX-M-2R primer를 이용한 PCR에 양성반응을 보인 균주는 없었다. *E. coli* 3주와 *K. pneumoniae* 13주의 CTX-M-3F 및 CTX-M-3R primer에 의한 PCR 증폭산물 염기서열은 *bla*_{CTX-M-3} (Genbank accession no. AJ632119)와 일치하였으며, 같은 primer에 의한 *E. coli* 4주의 증폭산물은 *bla*_{CTX-M-15} (Genbank accession no. AY463958)와 일치하였다. 또한 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 5주의 CTX-M-4F 및 CTX-M-4R primer에 의한 PCR 증폭산물은 *bla*_{CTX-M-14} (Genbank accession no. AF252622)와 일치하였다. CTX-M-3 생성균주는 서울 A병원, 경기 A, B병원, 강원 A병원, 대전 A병원 등 5개 병원, CTX-M-15 생성균주는 경기 A, B병원과 부산 A병원 등 3개 병원, CTX-M-14 생성균주는 서울 B병원, 강원 A병원, 대전 A병원, 경북 A병원 등 4개 병원에서 분리되었다(Table 3).

4. MIC 및 pI

CTX-M형 ESBL 유전자를 지닌 균주 모두에 대한 cefotaxime의 MIC는 256 mg/L 이상으로 ceftazidime의 MIC에 비해서 상대적으로 높거나 비슷한 양상을 보였으나 대전 A병원에서 분리된 KY2 *K. pneumoniae* 균주는 cefotazidime의 MIC가 >256 mg/L로 cefotaxime의 256 mg/L보다 높은 양상을 보였다. Isoelectric focusing으로 *bla*_{CTX-M-3} 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.4, *bla*_{CTX-M-14}를 지닌 균주에서는 pI 8.1, *bla*_{CTX-M-15} 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.6의 β -lactamase band를 각각 확인할 수 있었다(Table 3).

고 찰

Plasmid 매개 CTX-M형 ESBL은 cefotaxime을 선택적으로 가수분해하며, *Salmonella*와 *E. coli*를 비롯한 장내세균에서 주로 발견된다[13]. 이 효소는 TEM형 및 SHV형 β -lactamase와의 상동성(40%)은 낮으나 *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* 및 *Serratia fonticola*와의 상동성은 73-77%로 비교적 높다. 이 효소는 penicillin보다 cephaloridine에 대한 가수분해 활성이 강하며, cefotaxime에 대한 가수분해 활성이 ceftazidime에 비해 상대적으로 강한 특징이 있다[14].

CTX-M형 ESBL은 1989년 독일에서 분리된 *E. coli*에서 처음 발견되었으며[5], 이후 유럽, 남아메리카, 동아시아, 아프리카 등 전 세계 여러 국가에서 보고되었다. 아시아에서는 1993년 일본에서 Toho-1 ESBL을 생성하는 *E. coli*가 분리된 것을 필두로[15], 대만, 중국, 인도 등에서 다양한 CTX-M형 ESBL이 보고되었다[4]. 국내에서는 2001년 CTX-M-14가 보고되었고[6], 2003년 전국 13개 병원을 대상으로 한 조사에서 CTX-M-3, CTX-M-14 및 CTX-M-15

를 생성하는 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*가 보고되었다[7].

본 연구에서는 CTX-M형 ESBL을 염기서열 상동성에 따라 4군으로 분류하였다. 제 1군은 주로 유럽에서 보고된 것이다. 프랑스에서 분리된 *Kluyvera ascorbata*가 생성하는 klu-1~5와 Toho-1, CTX-M-2, CTX-M-2의 237번째 아미노산이 치환(Ser Ala)된 CTX-M-4 등이 여기에 속한다[16]. 제 2군은 최초의 CTX-M형 ESBL인 CTX-M-1을 비롯하여 폴란드, 케냐, 인도, 일본 등에서 분리된 CTX-M-3, -12, -15이 여기에 속한다[17-20]. 제 3군은 CTX-M-8, -25, -26 등이 포함되며 유럽, 북미와 남미에서 보고되었다[21]. 제 4군은 CTX-M-9, -13, -14, -16, -17과 Toho-2 등이 포함되며 한국을 비롯한 동아시아, 남유럽, 남미에서 보고되었다[6, 7, 22-26]. 본 연구에서는 전국 12개 병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 CTX-M형 ESBL 생성균주의 선별대상을 cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주로 한정하였는데, 이는 이 효소를 생성하는 균주 대부분이 cefotaxime에 고도내성인 것으로 보고되었기 때문이다. 본 연구에서 검출된 CTX-M형 ESBL 생성균주에 대한 cefotaxime의 MIC 모두는 256 mg/L 이상으로 높았다(Table 3).

위의 분류를 바탕으로 CTX-M형 ESBL 유전자를 찾기 위한 primer를 고안하여 PCR을 시행한 결과 제 1군과 3군 효소의 유전자는 검출되지 않았지만, 제 2군 (CTX-M-3 및 CTX-M-15)과 4군의 효소 (CTX-M-14)가 국내에 존재함을 확인할 수 있었다. *E. coli* 3주와 *K. pneumoniae* 13주가 *bla*_{CTX-M-3} 유전자, *E. coli* 4주가 *bla*_{CTX-M-15} 유전자를 지니고 있었다. CTX-M-3 ESBL은 1996년 폴란드에서 분리된 *E. coli*에서 처음 알려졌다[27]. 유럽, 동아시아, 남아메리카 등지에서 분리가 보고된 바 있으며, 국내에서는 2003년에 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 2주에서 보고되었다[7, 28]. 이 효소는 CTX-M-1의 아미노산 4개(Asp-114 Asn, Ser-140 Ala, Val-177 Ala, Asn-288 Asp)가 치환된 것이며, pI는 8.4이다. CTX-M-15 ESBL은 2001년 인도에서 처음 분리된 것으로 아시아와 유럽을 중심으로 보고되고 있다[29-31]. 이 효소는 CTX-M-3의 240번째 아미노산 asparagine이 glycine으로 치환된 것으로 β -lactamase의 pI는 8.6이다. 이 효소 역시 2003년 국내에서 분리된 *E. coli* 2주에서 발견된 바 있다[7]. 제 4군의 효소로는 CTX-M-14 ESBL만이 검출되었는데, 이 효소는 스페인을 중심으로 한 서유럽과 동아시아에서 주로 보고되고 있다[32]. 국내에서는 지난 2001년과 2002년의 조사에서 발견된 바 있다[6, 7].

지역별로 CTX-M-3 생성균주는 서울, 경기도, 강원도 및 대전 소재병원에서 분리되었으며, CTX-M-15 생성균주는 경기도와 부산, CTX-M-14 생성균주는 서울, 강원도, 대전 및 경북 소재병원에서 분리되어서 CTX-M형 ESBL이 국내 각지에서 분리됨을 확인할 수 있었다. 지난 2002년의 조사와 비교하면 CTX-M-3 생성균주는 3주 (0.8%)에서 16주 (3.4%), CTX-M-15가 2주 (0.55%)에서 4

주 (0.9%), CTX-M-14가 4주 (1.1%)에서 6주 (2.3%)로 증가하였다. CTX-M-3은 3개 병원에서 5개 병원, CTX-M-15는 1개 병원에서 3개 병원, CTX-M-14는 3개 병원에서 4개 병원으로 증가하였다. 경기 A병원에서는 2002년 조사에서 CTX-M-3 생성 *E. coli* 1주가 분리되었는데, 본 연구에서는 이 효소를 생성하는 *K. pneumoniae* 8주와 *E. coli* 2주가 분리되었다. *K. pneumoniae* 8주는 동일한 분자량의 plasmid를 지니고 있어서 동일감염원에서 유래된 것으로 추측한다. *E. coli* 2주 역시 *K. pneumoniae*와 동일한 분자량의 plasmid를 지니고 있었으므로 *bla*_{CTX-M-3} 유전자를 지닌 plasmid가 균종간 수평전달을 통하여 내성을 확산하고 있는 것으로 추측하였다. 한편 강원 A병원에서는 2002년에 CTX-M-3 생성 *K. pneumoniae* 1주가 분리되었는데 2003년 조사에서도 *K. pneumoniae* 3주가 분리되었다. *K. pneumoniae* 3주 모두는 동일한 분자량의 plasmid 두개를 각각 지니고 있었으므로 역시 동일 감염원에서 유래된 균주에 의한 감염의 집단발생이 있었던 것으로 추측한다(Fig. 2).

이 결과는 국내 각지에 CTX-M형 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 존재하며 확산 중임을 시사한다. CTX-M형 ESBL의 만연과 변종 CTX-M형 ESBL의 출현을 감시하기 위한 정기적인 조사가 필요한 것으로 생각한다.

요 약

목 적 : 본 연구에서는 전국의 12개병원에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*를 대상으로 CTX-M형 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)의 생성빈도를 조사하고자 하였다.

방 법 : 2003년 2-7월에 전국 13개 병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 수집하였다. cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였으며, ESBL 생성은 double disk synergy 시험으로 조사하였다. ESBL 생성 균주의 cefotaxime 내성을 형질전환으로 *E. coli* DH5와 *E. coli* Top10-F에 전달하였다. 한천희석법으로 β -lactam 항균제의 최소억제 농도를 측정하였으며, PCR로 *bla*_{CTX-M} 유전자를 검출하였고, PCR 산물의 염기서열을 양방향으로 분석하였다. Isoelectric focusing으로 β -lactamase의 pI값을 측정하였다.

결 과 : 12개 병원에서 수집된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 cefotaxime 내성율은 각각 11.7%와 34.1%이었으며, *E. coli* 24주 (10.4%)와 *K. pneumoniae* 58주 (25.0%)가 double disk synergy 양성이었다. *E. coli* 3주와 *K. pneumoniae* 13주에서 *bla*_{CTX-M-3} 유전자, *E. coli* 4주에서 *bla*_{CTX-M-15} 유전자, *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 5주에서 *bla*_{CTX-M-14} 유전자가 검출되었다.

결 론 : 국내 병원에서 분리되는 *E. coli*나 *K. pneumoniae* 중 CTX-M형 ESBL을 생성하는 균주의 비율이 증가하고 있다. CTX-M형 ESBL의 만연과 변종 CTX-M형

ESBL의 출현을 감시하기 위한 정기적인 조사가 필요한 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
2. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(Suppl. 1):2-11.
3. Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-704.
4. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
5. Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Ernst S, Cassell JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:509-13.
6. Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 2001;39:3747-9.
7. 배일권, 우건조, 정석훈, 박광옥, 조병규, 김돌만 등. 국내에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 CTX-M형 Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 현황. *대한임상미생물학회지* 2004;7:48-54.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, Tenth informational supplement, M100-S10 (M2). Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
9. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Phillippon A. Extended-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-78.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. M7-A5. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. New York, Cold Spring

- Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
 13. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1980-94.
 14. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:137-43.
 15. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2269-75.
 16. Maria G, Eva T, Sergei V. Sequencing of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1259-62.
 17. Bauerfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990;18:294-8.
 18. Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2141-3.
 19. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:827-32.
 20. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201:237-41.
 21. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1936-42.
 22. Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verges C, Barbe J, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1970-3.
 23. Chanawong A, M' Zali FH, Heritage J, Xiong J-H, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:630-7.
 24. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Labia R, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2269-75.
 25. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-Like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1212-7.
 26. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1181-6.
 27. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:827-32.
 28. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:790-3.
 29. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Letters* 2001;201:237-41.
 30. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase, CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1031-4.
 31. Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:393-6.
 32. Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Senz Y, Garcia M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2056-8.