CTX-M-9형 Extended-Spectrum β-Lactamase 생성 Enterobacter cloacae의 출현

홍유라¹, 유호연¹, 배일권², 권수봉², 정석훈^{2,3*}, 김현주³, 김윤화³, 이상희⁴

고신대학교 의과대학 소아과학교실¹, 진단검사의학교실², 고신대학교 복음병원 의료질관리실³, 명지대학교 생명과학정보학부⁴

배 경: 부산의 한 대학병원에서 분리된 *Enterobacter cloacae*를 대상으로 Ambler class A extendedspectrum β-lactamase (ESBL)의 종합적인 생성 현황을 조사하고 이들 효소를 생성하는 균주의 감염역학을 조사하고자 하였다.

방법: 2003년에 고신대학교 복음병원 환자에서 분리된 *E. cloacae*를 대상으로 항균제에 대한 감수성을 디스크확산법으로 시험하였으며, ESBL 생성은 double disk synergy (DDS) 시험으로 조사하였다. ESBL 생성 군주의 cefotaxime 내성 전달성을 접합으로 시험하였다. β-lactam 항균제의 최소억제농도를 한천회석법으로 측정하였으며, TEM형, SHV형, CTX-M형, PER-1형, VEB형, IBC형, GES형 및 TLA형 유전자를 polymerase chain reaction (PCR)으로 검출하였고 PCR 산물의 염기서열을 양방향으로 분석하였다. β-lactamase의 pI값을 Isoelectric focusing으로 측정하였다. CTX-M-9 유전자를 지닌 균주를 대상으로 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR로 유전형을 분류하고 균주의 역학적 연관성을 조사하였다.

결과:시험기간 중 분리된 *E. cloacae* 148주의 ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam에 대한 내성율은 각 각 50.0%, 29.6% 및 48.0%이었으며, 광범위 β-lactam 항균제 하나 이상에 중간 혹은 내성인 50주 중 41주 (27.7%)가 DDS 양성이었다. 대상 균주 중 1주(2%)는 *bla*_{TEM-52}, 16주(32%)는 *bla*_{SHV-12}, 4주(8%)는 *bla*_{CTX-M9} 유전 자만을 지니고 있었으며, 19주(38%)는 *bla*_{SHV-12} 와 *bla*_{CTX-M9} 유전자를 동시에 지니고 있었다. *bla*_{CTX-M9} 유전자 를 지닌 균주(23주)는 ERIC PCR에 의하여 9가지 형으로 분류되었다.

결 론 : 부산의 한 대학병원에서 분리되는 *E. cloacae*는 ESBL을 흔히 생성하며, SHV-12와 CTX-M-9이 가장 흔한 ESBL임을 확인할 수 있었다. CTX-M-9 생성 *E. cloacae*는 ERIC PCR에 의하여 다양한 유전형으 로 분류되어 동일 감염원에서 유래되지 않았음을 확인할 수 있었다.

서 론

Enterobacter cloacae는 장내세균과(family Enterobacteriaceae)에 속하는 그람음성간균으로, 물, 토양, 분변 등 인간이 생존하는 환경에 광범위하게 분포하고 있다[1]. 병원감염의 중요 원인균 중 하나로 미국에서는 요로, 창 상 및 혈액 병원감염의 5번째로 흔한 원인균이며, 병원감 염 폐렴의 3번째로 흔한 원인균으로 보고되었다[2]. E.

본 연구는 2004년 대한임상미생물학회 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임. 접 수 일:05/1/12 게재승인일:05/2/28 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 cloacae에 의한 감염증은 Staphylococcus aureus, Escherichia coli 등 중요 병원감염균에 비해서 빈도는 낮지만 임 상적으로 더 위중한 증세를 보이는데, 이 세균에 의한 패 혈증의 사망률은 그람양성세균에 비해서 2배에 달하며 [3], 창상감염 검체에서 검출된 E. coli나 S. aureus가 실제 감염의 원인균일 확률은 30%-55%에 불과하지만 E. cloacae는 확률이 100%에 달한다[4].

Oxyimino-cephalosporin은 AmpC β-lactamase에 의해서 가수분해되나 유도능(inducibility)이 작으므로, 염색체성 유도성 AmpC β-lactamase를 생성하는 *E. cloacae*에 높은 항균력을 가진다[5]. 그러나 탈억제에 의한 AmpC β-lactamase의 과량 생성[6] 혹은 plasmid에 의하여 매개되는 Ambler class A extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 생 성[7,8]에 의해서 이들 광범위 cephalosporin에 대한 내성 을 획득한 세균이 만연되고 있어서 임상적으로 심각한 위협이 되고 있다. 임상검체에서 분리되는 *E. cloacae*는 Ambler class A ESBL을 흔히 생성하는 것으로 알려졌다. 그리스에서는 1998년에서 1999년에 분리된 *Enterobacter* 68주 중 21주 (31%)가 CTX-M형 ESBL을 생성하였다고 하며[9], 스페 인에서는 CTX-M-10을 생성하는 *Enterobacter*가 다수 분 리되었다는 보고가 있었다[8]. 또한 프랑스에서는 1996 년 이후 3년 동안 TEM-24를 생성하는 *Enterobacter aerogenes*에 의한 대형 집단감염이 발생하였다고 한다[10]. 국내에서 분리되는*E. cloacae*도 ESBL을 흔히 생성하는 것으로 보고되었는데, 1999년-2000년에 부산의 한 대학 병원에서 분리된 cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. cloacae* 중 26%가 Ambler class A ESBL을 생성하였다고 하 며, SHV-12 등이 흔하다고 하였다[11]. 그러나 국내에서 는 *E. cloacae*의 TEM형 및 SHV형 ESBL 생성 현황만 보 고되었을 뿐 기타의 Ambler class A ESBL 생성 현황에 대

한 조사는 드물다. 이에 본 연구에서는 고신대학교 복음병원에서 분리된 *E. cloacae*를 대상으로 TEM형과 SHV형 ESBL뿐 아니라 CTX-M형, PER형, VEB형, GES형, IBC형, TLA형 등 Ambler class A ESBL의 종합적인 생성현황을 조사하고, 이들 효소를 생성하는 균주의 감염역학을 알아보고자 하 였다.

재 료 및 방 법

1. E. cloacae의 분리 및 동정

2003년에 고신대학교 복음병원 환자의 임상검체에서 분리된 *E. cloacae*를 대상으로 하였다. 분리된 균주는 도 말 염색하여서 그람음성간균임을 확인하고, 전통적인 생 화학적 방법[1] 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)를 사용하여서 동정하였다. 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 연구 대상에서 제외하였다.

2. 항균제 감수성 시험

미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 기준에 따라서 디스크 확산법으로 시험하 였다[12]. 항균제 디스크로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, amikacin, gentamicin 및 tobramycin 디스크 (BBL, Cockeysville, Mich., USA)를 사용하였다. 표준균주 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다[13]. 시험 항균제 로는 cefotaxime (한독, 서울), ceftazidime (한미, 화성), az-

treonam (동아, 안산) 및 cefepime (중외, 서울)을 사용하였 다. 정도관리를 위하여 *E. coli* ATCC 25922에 대한 MIC 를 동시에 측정하였다.

4. Double-disk synergy 시험

Jarlier 등[14]의 방법으로 시험하였다. 즉, 순배양된 집 락을 백금침으로 채취한 후, Tryptic soy broth (Difco, Cockeysville, Mich., USA)에 접종하여 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천 (Difco)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid 디스크 (20/10 µg), 그 주위에는 30 µg의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디 스크 (BBL)를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간 격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 35℃ 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스 크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰 되면 양성으로 판정하였다.

5. 접합에 의한 내성 전달

Filter mating법[15]으로 시험하였다. Azide에 내성인 *E.* coli J53을 내성 수여자로 사용하며, 내성 공여자와 수여 자를 각각 brain heart infusion (Difco) 액체배지에 접종하 여서 3시간 진탕배양 하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수 여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37℃에서 1시간 배양 후, cefotaxime 8 µg/mL와 azide 100 µg/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. 37℃에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위 해서 transconjugant의 cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였다.

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

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

7. Primer의 고안

Ambler class A ESBL 각 유전자의 염기서열을 Gen-Bank (http://www.ncbi.nlm.gov)에서 취하였다. DNASpace version 3.02 (Genetic Systems, Hitachi, Japan)와 Vector NTI Suite (InforMax, Frederick, Md., USA)을 사용한 mul-

Table 1. Sequences of the PCR primers

Name	Nucleotide Sequence	Product size (bp)	GenBank Accession No.	References
TEM F TEM R	5'-atg agt att caa cat ttc cgt-3' 5'-tta cca atg ctt aat cag tga-3'	861	AY302260	This study
SHV F SHV R	5'-ccg ggt tat tct tat ttg tcg ct-3' 5'-tag cgt tgc cag tgc tcg-3'	831	X98100	This study
CTX-M-1F CTX-M-1R	5'-gga cgt aca gca aaa act tgc-3' 5'-cgg ttc gct ttc act ttt ctt-3'	624	X92506	This study
CTX-M-2F CTX-M-2R	5'-cgg tgc tta aac aga gcg ag-3' 5'-cca tga ata agc agc tga ttg ccc-3'	891	X92507	This study
CTX-M-8F CTX-M-8R	5'-acg ctc aac acc gcg atc-3' 5'-cgt ggg ttc tcg ggg ata a-3'	490	AF189721	This study
CTX-M-9F CTX-M-9R	5'-gat tga ccg tat tgg gag ttt-3' 5'-cgg ctg ggt aaa ata ggt ca-3'	947	AJ416345	This study
PER-1 F PER-1 R	5'-gtt aat ttg ggc tta ggg cag-3' 5'-cag cgc aat ccc cac tgt-3'	855	Z21957	16
VEB F VEB R	5'-acc aga tag gag tac aga cat atg a-3' 5'-ttc atc acc gcg ata aag cac-3'	727	AF220758	This study
IBC/GES F IBC/GES R	5'-gtt aga cgg gcg tac aaa gat aat-3' 5'-tgt ccg tgc tca gga tga gt-3'	903	AY260546	This study
TLA F TLA R	5'-cgc gaa aat tct gaa atg ac-3' 5'-agg aaa ttg tac cga gac cct-3'	992	AF148067	This study

tialignment 분석 결과에 기초하여 각 Ambler class A ES-BL 유전자에 특이적인 부분을 primer로 고안하였다. 고 안된 primer와Ambler class A ESBL 유전자 염기서열 동정 은 BLAST로 분석하였다. PER-1 ESBL 유전자 검출을 위 한 primer를 제작하였고[16], CTX-M형 ESBL은 상동성에 따라서 네 군으로 나누어서 각 군의 검출을 위한 primer 를 고안하였다. CTX-M-1형 primer는 CTX-M-1, -3, -12 및 -15, CTX-M-2형 primer는 CTX-M-2, -4, Toho-1 및 klu-1~ klu-5, CTX-M-8형 primer는 CTX-M-8, -25 및 -26, CTX-M-9형 primer는 CTX-M-9, -13, -14, -16, -17 및 Toho-2를 검 출할 수 있도록 하였다. 상동성이 높은 GES형과 IBC형 ESBL은 한 쌍의 primer로 유전자를 검출할 수 있도록 고 안하였다. VEB형과 TLA형 ESBL 유전자 검출을 위한 primer는 새로이 고안하였다(Table 1).

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

시험균주 및 대조균주를 TSB에 접종하여 37℃로 하룻 밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여서 5분간 13,000 X g로 원침하였다. 상층액은 버리고 침사는 증류 수 500 µL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 X g 로 원침하고, 상청액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용 하였다. 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 36 µL를 혼합 하여 50 µL의 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)으로 94℃에서 5분간 predenaturation 후 94℃로 20초 간 denaturation, 58℃로 20초간 annealing, 72℃로 45초간 extension하는 30 cycle의 중합연쇄반응을 시키고 72℃로 7분간 postdenaturation하였다. 증폭산물 10 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, Wi., USA)에 40분간 전기영동 하여서 band를 각각 확인하였다.

9. ESBL 유전자의 유전형 분석

PCR에 의하여 증폭된 산물의 염기서열을 분석하여서 유전형을 규명하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, 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[17]으로 염기서열을 분석하였다. 결과의 정확성을 위해서 양방향으로 분석하였다.

10. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR

ERIC PCR로 균주의 역학적 연관성을 조사하였다. Primer로는 ERIC 1R (5'-atg taa gct cct ggg gat tca c-3')과 ERIC 2 (5'-aag taa gtg act ggg gtg agc g-3')를 사용하였다 [18]. 증폭반응은 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각 0.2 mM, 50 pM primer, 입상균주에서 채취한 10 ng의 주형 DNA, 25 mM의 TAPS [N-Tris(hydroxy)methyl-3-amino-propane sulfonic acid, pH 9.3], 50 mM KCl, 4 mM MgCl2 및 1.25 U 의 TaKaRa *Ex Taq* polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Nor-



Fig. 1. Representative ERIC patterns with primers of ERIC IR and ERIC 2 with clinical *E. cloacae* isolates from a university hospital, Busan, Korea. Lane M1, *Hind* $\parallel /EcoRI-$ digested phage λ ; lane M2, 100-bp DNA ladder; 1-23, CTX-M-9 ESBL- producing clinical *E. cloacae* isolates.

walk, Conn., USA)를 포함한 1 mM 2-mercaptoethanol 50 M의 혼합액으로 시행하였다. 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 52℃에서 1분, 70℃에서 5분, 92℃에서 1분씩 35회 증 폭 반응시키고, 70℃에서 10분간 연장 반응시켰다. 증폭 산물(10 µL)은 2% Seakem LE 한천 (BMA, Rockland, Ma., USA)에서 분석하였다(Fig. 1). Band의 강도와 상관없이 band의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상 의 band 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다[19].

결 과

1. 항균제 감수성

시험기간 중 총 148주의 *E. cloacae*가 임상검체에서 분 리되었다. 이들 균주의 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin 및 cefotetan에 대한 내성율은 각각 98.6%, 66.9%, 99.3%, 95.0% 및 59.8%이었고, ceftazidime, cefotaxime, cefepime 및 aztreonam에 대한 내성율은 각각 50.0%, 29.6%, 4.4% 및 48.0%이었다. Imipenem에 내성인 균주는 없었다. 또한 amikacin, gentamicin 및 tobramycin 에 대한 내성율은 각각 5.4%, 17.5% 및 45.3%이었다.

2. Double disk synergy 시험 및 접합에 의한 내성전달

Ceftazidime, cefotaxime, cefepime, aztreonam 등 광범위 β-lactam 항균제 하나 이상에 중간 혹은 내성인 균주 50주 를 대상으로 double-disk synergy를 시험하였으며, 41주 (27.7%)는 양성반응, 9주는 음성반응을 보였다. 접합에 의해서 29주(58%)의 내성이 azide 내성 *E. coli* J53으로 전 달되었다.

3. ESBL 유전형 시험 및 효소의 pl

광범위 β-lactam 항균제 하나 이상에 중간 혹은 내성인 50주 중 TEM, SHV 및 CTX-M-9형 유전자 양성인 균주는 각각 45주(90%), 35주(70%) 및 23주(54%)였다. CTX-M-9 형 이외의 CTX-M형 ESBL과 PER-1형, VEB형, GES형과 IBC형 혹은 TLA형 ESBL 유전자 양성인 균주는 없었다. TEM 유전자가 검출된 45주 중 1주만이 ESBL인 TEM-52 였고, 나머지 44주는 ESBL이 아닌 TEM-1이었다. SHV 유전자 양성 균주 35주 모두는 SHV-12이었고, CTX-M형 유전자 양성인 균주는 23주 모두 CTX-M-9이었다.

광범위 β-lactam 항균제 하나 이상에 중간 혹은 내성인 균주 50주 중 1주(2%)는 TEM-52 유전자, 16주(32%)는 SHV-12 유전자, 4주(8%)는 CTX-M-9 유전자 하나만을 갖고 있었으며, 19주(38%)는 SHV-12와 CTX-M-9 유전자 를 동시에 지니고 있었다. 내성균주 10주(20%)에서는 ESBL 유전자가 검출되지 않았으며, 이 중 7주는 TEM-1 유전자를 지니고 있었다. Double disk synergy 양성인 41 주 중 5주에서는 ESBL 유전자가 검출되지 않았으며, 이 중 2주에서는 TEM-1 유전자만 검출되었다. Double-disk synergy 음성인 균주 9주 중 4주에서 ESBL 유전자가 검출 되었는데, 이 중 1주는 SHV-12 유전자, 1주는 CTX-M-9

Tal	ole	2 . A	Ambler	Class	A	ESBL	genes	contained	in	Е.	cloacae	isol	ates
-----	-----	--------------	--------	-------	---	------	-------	-----------	----	----	---------	------	------

Double disk synergy (No. of isolates)	ESBL genotypes	No. of isolates
Positive (41)	TEM-52 only	1
	SHV-12 only	15
	CTX-M-9 only	3
	SHV-12 + CTX-M-9	17
	Subtotal	36
Negative (9)	SHV-12 only	1
	CTX-M-9 only	1
	SHV-12 + CTX-M-9	2
	Subtotal	4
Total (50)	TEM-52 only	1
	SHV-12 only	16
	CTX-M-9 only	4
	SHV-12 + CTX-M-9	19
	Total	40

Abbreviation : ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

Table 3. Characteristics of *E. cloacae* isolates carrying *bla*_{CTX-M-9} gene

Age	Sex	Ward	Isolation	Underlying S	Specimen	$MIC (\mu g/mL)$				β -lactamase gene type	ERIC
			date	disease		ATM	CAZ	CTX	FEP	_	pattern
28	F	IP	JAN	Stomach ca	AF	128	64	128	8	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	Α
48	М	IP	FEB	CBD ca	bile	128	64	64	8	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	В
33	Μ	IP	MAR	Asthma	PF	256	256	128	16	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
67	Μ	ICU	MAY	ICH	CSF	64	32	64	4	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
62	М	ICU	MAY	Tuberculoma	PF	64	64	128	8	$bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
76	М	IP	MAY	CBD ca	bile	64	32	32	2	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	Α
50	F	IP	JUN	Tuberculoma	RS	256	128	64	8	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	С
82	F	IP	AUG	Pneumonia	RS	>256	256	128	32	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	С
74	М	ICU	AUG	RCC	RS	32	64	32	0.25	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	D
70	Μ	IP	SEP	Esophageal ca	RS	64	64	32	4	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
76	М	ICU	SEP	Esophageal ca	PF	>256	256	256	32	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	D
63	М	IP	SEP	Lung ca	RS	128	64	32	2	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
64	F	IP	OCT	HLD	RS	128	128	64	8	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	E
69	F	OP	OCT	Pancreatic ca	AF	16	128	64	0.5	$bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	С
56	F	IP	OCT	Lung ca	RS	>256	>256	128	32	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	F
64	М	ICU	OCT	Lung ca	RS	>256	>256	128	32	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	G
69	F	IP	OCT	Lung ca	RS	2	256	16	8	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	Н
61	М	IP	NOV	ICH	urine	8	32	256	4	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	А
48	М	IP	NOV	CBD ca	wound	>256	>256	64	16	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	В
58	М	IP	NOV	Esophageal ca	RS	128	128	16	2	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	E
46	М	ICU	DEC	Aneurysm	RS	>256	>256	128	64	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	Ι
63	М	IP	DEC	Esophageal ca	RS	>256	256	32	16	$bla_{\text{TEM-1}}$ + $bla_{\text{SHV-12}}$ + $bla_{\text{CTX-M-9}}$	Ι
62	F	IP	DEC	ICH	RS	256	256	256	16	$bla_{\text{TEM-1}}+bla_{\text{SHV-12}}+bla_{\text{CTX-M-9}}$	Ι

Abbreviations : MIC, minimum inhibitory concentration; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus; IP, inpatient; ca, cancer; AF, ascitic fluid; CBD, commom bile duct; PF, pleural fluid; ICU, intensive care unit; ICH, intracranial hemorrhage; CSF, cerebrospinal fluid; RS, respiratory specimen; RCC, renal cell cancer; OP, outpatient; HLD, herniated lumbar disc.



Fig. 2. Diagrammatic representation of the distribution of the CTX-M-9-producing *E. cloacae* isolates from patients during the 1-year period by ERIC patterns.

E alagaga with	MICs (µg/mL)												
E. cloacae with	ATM			CAZ				CTX		FEP			
(INO. OI ISOIALES)	Range	MIC ₅₀	MIC_{90}	Range	MIC ₅	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
$bla_{\text{CTX-M-9}}$ allele (4)	2->256	32	>256	64-256	64	256	16-256	32	256	0.25-32	4	32	
$bla_{\text{CTX-M-9}}$ and $bla_{\text{SHV-12}}$ alleles (19)	8->256	128	>256	32->256	128	>256	16-256	64	256	0.5 -64	8	32	
$bla_{\text{SHV-12}}$ allele (16)	4->256	128	>256	4-256	64	256	8-128	32	128	0.25-16	4	16	
$bla_{\text{TEM-52}}$ allele (1)	64	64	64	32	32	32	64	64	64	4	4	4	

Table 4. MICs of expanded-spectrum beta-lactam agents against Ambler Class A ESBL-producing-E. cloacae isolates

Abbreviations : MIC, minimum inhibitory concentration; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime.

유전자, 2주는 SHV-12와 CTX-M-9 유전자를 동시에 지 니고 있었다(Table 2). TEM-1, TEM-52, SHV-12 및 CTX-M-9 유전자가 검출된 균주의 추출액에서 각 효소에 해당 하는 pI 5.3, 6.0, 8.2 및 8.0의 band를 확인할 수 있었다.

4. CTX-M-9 유전자를 지닌 E. cloacae의 특성

CTX-M-9 유전자를 지닌 E. cloacae는 위암, 담도암, 식 도암, 폐암 등 악성종양 환자 14명과 두개내 출혈, 천식, 결핵종 등 양성 질환자 9명에서 분리되었다. 이들 환자 중 6명은 중환자실, 16명은 일반 병동에 재원 중이었으 며, 1명은 외래환자였다. 검체별로는 13주는 호흡기 검 체, 6주는 체액 천자 검체(복수액, 흉수액 및 뇌척수액), 2 주는 담즙, 그리고 소변과 상처부위에서 각각 1주씩 분리 되었다. 19주는 SHV-12와 CTX-M-9 유전자를 동시에 지 니고 있었으며 4주는 CTX-M-9 유전자만을 지니고 있었 다. ERIC PCR에 의해 CTX-M-9 유전자를 지닌 균주를 9 가지 유전형으로 나눌 수 있었는데 A형이 8주, B형이 2 주, C형이 3주, D형과 E형이 각각 2주, F형, G형 및 H형이 각각 1주, I형이 3주였다(Table 3). 이 중 A형은 1월, 5월, 9 월과 11월에 분리되었는데, 5월에 3주, 9월에 2주가 분리 되었으며, I형은 12월에 일반 병동(2주)과 중환자실(1주) 에서 분리되었다(Fig. 2). bla_{CTX-M-9}과 bla_{SHV-12} 유전자를 동 시에 지닌 E. cloacae 19주에 대한 ceftazidime, cefotaxime 및 cefepime의 MIC는 blacTX-M9 유전자를 지니지 않은 E. cloacae 17주에 비해서 높은 분포를 보였다. 또한 blacTX-M.9 유전자만을 지닌 E. cloacae 4주에 대한 이들 광범위 βlactam 항균제의 MIC는 이 유전자를 지니지 않은 17주와 유사한 분포를 보였다(Table 4).

고 찰

본 연구에서 분리된 *E. cloacae*의 ceftazidime과 aztreonam에 대한 내성율은 50.0%와 48.0%로 2003년 전국 12 개 병원에서 분리된 *E. cloacae*의 평균 내성율 각 37%에 비해서 상대적으로 높은 반면, cefotaxime과 cefepime에 대한 내성율은 29.6%와 4.4%로 전국 평균 34%와 12%에 비해서 상대적으로 낮았다[20]. 한편 대상 균주중 27.7% (41/148)가 double disk synergy 양성이었는데 이는 2002년 전국 13개 병원에서 분리된 *E. cloacae*를 대상으로 한 조 사의 23.6% (54/229)와 유사한 결과였다[21].

본 연구에서는 TEM-52 (1주), SHV-12 (35주), CTX-M-9 (23주)의 3가지 ESBL 유전형만 검출되었으며, CTX-M-1형, CTX-M-2형, CTX-M-8형, PER-1형, VEB형, GES형, IBC형 및 TLA형 ESBL은 검출되지 않았다. TEM-52는 TEM-1의 아미노산 3개가 변이(Glu104Lys, Met182Thr 및 Gly238Ser)된 것이다[22]. 이 효소는 프랑스에서 분리된 K. pneumoniae에서 처음 발견되었으며, 국내에서 분리되 는 장내세균도 흔히 생성하는 것으로 알려졌다[23]. SHV-12는 SHV-1의 아미노산 3개가 변이 (Leu35Gln, Gly238Ser 및 Glu240Lys)된 효소이다[24]. 이 효소는 스위 스에서 분리된 E. coli와 K. pneumoniae에서 처음 발견되 었으며, 국내에서 분리되는 Enterobacter가 흔히 생성하 는 것으로 알려졌는데[18] 본 연구에서도 35주가 생성하 여 가장 흔한 ESBL이었다. CTX-M-9은 2000년 스페인에 서 분리된 E. coli에서 처음 발견되었으며[25], Toho-2와 88%의 상동성을 지닌 효소이다. 중국에서 이 효소를 생 성하는 E. coli, K. pneumoniae 및 E. cloacae의 분리가 보 고된 바 있으며[26], 국내에서는 본 연구에서 처음 분리 된 것으로 생각된다. CTX-M-9은 cefotaxime에 대한 가수 분해 활성이 ceftazidime 보다 강한 효소이다. 그러나 본 연구에서 분리된 CTX-M-9 생성 균주 등에 대한 cefotaxime의 MIC는 ceftazidime과 유사하였는데, 이는 균주들이 CTX-M-9과 함께 SHV-12를 동시에 생성하는 예가 많았 고 (19/23), E. cloacae의 염색체성 AmpC β-lactamase의 영 향도 있기 때문으로 생각된다.

Double disk synergy 음성이었던 *E. cloacae* 9주 중 4주 에서 ESBL 유전자가 검출되었는데, 이는 이 시험에 βlactamase 억제제로 사용한 clavulanic acid의 유도효과에 의해 *E. cloacae*가 염색체성 AmpC β-lactamase를 과량 생 성하여서 clavulanic acid에 의한 ESBL의 억제 효과가 차 폐된 때문으로 생각한다[27]. 또한 Double disk synergy 양 성인 41주 중 5주에서는 ESBL 유전자가 검출되지 않았 으므로 이들 균주가 본 연구에서 검출대상으로 삼은 ESBL 이외의 새로운 ESBL 유전자를 지니고 있을 가능 성을 생각할 수 있다. 이를 확인하기 위한 추가적인 연구

가 필요할 것으로 생각한다.

```
CTX-M-9을 생성하는 균주의 역학적 연관성을 보기 위
하여 ERIC PCR을 시행하였다. PCR을 토대로 하여 무작
위로 DNA를 증폭하는 기술은 역학 연구에 널리 이용되
어 왔다[28]. ERIC 염기서열은 많은 세균에서 발견된 것
으로 비유전적이며, 고도로 보존되고, 광범위하게 분포
된 DNA 서열을 사용하였다[19]. ERIC PCR은 pulsed-field
gel electrophoresis (PFGE)에 비해서 신속하고 간편한 분
석 방법이며 PFGE에 상당하는 변별력을 갖고 있기에 근
래 E. cloacae에 의한 집단 감염 발병의 연구에 흔히 사용
되고 있다[29]. CTX-M-9 생성 E. cloacae 23주에 대해
ERIC PCR을 시행하였는데 0.3 kb에서 5.1 kb까지의 band
가 4개에서 8개까지 관찰되었고 band 형태에 따라 9가지
형으로 구분하였다. 가장 흔하였던 A형(8주)은 일반병동
환자 6명과 중환자실 환자 2명에서 분리되었으며 연중
지속적으로 분리되었다. B형, C형, D형, E형, F형, G형, H
형 및 I형은 각각 1-3주만이 분리되었다. 12월에는 I형 3
주가 분리되어서 이 유전형의 균주에 의한 소규모 집단
감염이 발생했었음을 알 수 있었다. 다양한 유전형의 균
주가 연중 분리되었음은 고신대학교 복음병원에 CTX-
M-9 생성 E. cloacae가 만연되었음을 시사한다. 그러나
이 결과만으로 CTX-M-9 유전자를 지닌 plasmid에 의한
내성의 수평적 확산 여부를 확인할 수 없었으며 이를 위
한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.
```

본 연구를 통하여 고신대학교 복음병원에서 분리되는 *E. cloacae* 중 ESBL의 생성을 통하여 광범위 β-lactam 항 균제에 대한 내성을 획득하는 균주가 흔함을 확인할 수 있었다. SHV-12와 CTX-M-9이 *E. cloacae*가 가장 흔히 생 성하는 ESBL이었으며 두 효소를 동시에 생성하는 균주 도 드물지 않았다. ERIC PCR을 통하여 시험기간 중 분리 된 CTX-M-9을 생성하는 *E. cloacae*의 유전형이 다양하며 동일 감염원에서 유래되지 않았음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Abbott S. Klebsiella pneumoniae, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia. In : Murray PR, Baron EJ, et al. 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:S72-S75.
- Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Clin Infect Dis 1997; 24:387-95.
- 4. Twum-Danso K, Grant C, Al-Suleiman SA, Abdel-Khader S, Al-Awami MS, Al-Breiki H, Taha S, et al. Micro-

biology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds. J Hosp Infect 1992;21:29-37.

- 5. Livermore DM. β-lactamase in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
- 6. Bennett PM and 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, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero 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.
- 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.
- Mammeri 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. Kim JM, Jeong SH, Kim BN, Sung JH, Kim JC, Jang H. Characterization of extended-spectrum β -lactamase genes from clinical isolates of *Enterobacter* species. Korean J Clin Microbiol 2002;5:97-104.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000: M100-S10.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. ed. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000:M7-A5.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-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.
- Miller J. ed. Experiments in molecular genetics. Cold Sparing Harbor, N.Y:Cold Spring Harbor Laboratory, 1992:82-5.
- 16. Kim JM, Kang HK, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Cho

BK, et al. Prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital, Busan, Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:20-6.

- 17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
- 18. Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC, et al. Dissemination of SHV-12 and characterization of New AmpC-type β -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. J Clin Microbiol 2003;41:2477-82.
- Davin-Regli A, Monnet D, Saux P, Bosi C, Charrel R, Barthelemy A, et al. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: One-year prospective study in two intensive care units. J Clin Microbiol 1996;34: 1474-80.
- 20. Hong SG, Lee J, Yong D, Kim EC, Jeong SH, Park YJ, et al. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. Korean J Clin Microbiol 2004;7:171-7.
- 21. Park YJ, Lee SO, Yong D, Lee K, Kim BK, Kang CS. Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC β-lactamase-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a Korean Survey. Korean J Lab Med 2003;23:251-7.
- 22. Poyart C, Mugnier P, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P. A novel extended-spectrum TEM-type β-lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:108-13.

- Pai H, Lyu S, Lee JH, Kwon Y, Kim JW, Choe KW. Survey of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Eschcerichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999;37: 1758-63.
- 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.
- 25. 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.
- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, 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.
- 27. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum β lactamase-producing isolates? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:361-4.
- van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin Microbiol Rev 1994;7:174-84.
- Acolet D, Ahmet Z, Houang E, Hurley R, Kaufmann ME. *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit: account of an outbreak and its relationship to use of third generation cephalosporins. J Hosp Infect 1994;28: 273-86.

Emergence of CTX-M-9 Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacter cloacae Isolates

Yoo Rah Hong¹, Hoyen Yu¹, Il Kwon Bae², Su Bong Kwon², Seok Hoon Jeong^{2,3*}, Hyun Joo Kim³, Youn Hwa Kim³, and Sang Hee Lee⁴

Departments of Pediatrics¹, and Laboratory Medicine², Kosin University College of Medicine, Busan; Department of Quality Improvement³, Kosin University Gospel Hospital, Busan; Department of Biological Science⁴, Myongji University, Seoul, Korea

Background: The aim of this study is to assess the prevalence and to investigate the molecular epidemiology of Ambler class A extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacter cloacae* isolates in a university hospital in Busan, Korea.

Methods: Non-duplicated clinical isolates of *E. cloacae* from patients admitted in Kosin University Gospel Hospital were collected during the period from January through September, 2003. ESBL-production was examined by the double-disk synergy test (DDST) and the transferability of cefotaxime-resistance by conjugation. MICs of β -lactam antibiotics were determined by the agar dilution method and Ambler class A ESBL genes were searched by PCR amplification. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR was performed to investigate epidemiological relationships among $bl_{a_{CTX-M-9}}$ gene-carrying *E. cloacae* isolates.

Results: Antimicrobial resistance rates of *E. cloacae* isolates (n=148) to ceftazidime, cefotaxime, and aztreonam were 50.0%, 29.6%, and 48.0%, respectively. Among 50 *E. cloacae* isolates intermediate or resistant to more than one expanded-spectrum β -lactam agent, 41 (27.7%) showed positive results in DDST; of these 41 isolates, 1 was found to carry *bla*_{TEM-52} gene, 16 carried *bla*_{SHV-12} gene, 4 *bla*_{CTX-M-9} gene, and 19 both *bla*_{SHV-12} and *bla*_{CTX-M-9} genes. The 23 *E. cloacae* isolates carrying *bla*_{CTX-M-9} gene showed 9 different profiles by ERIC PCR.

Conclusion: ESBL-producing *E. cloacae* was not uncommon in a university hospital in Busan, Korea. The commonest types of ESBLs produced by *E. cloacae* isolates were SHV-12 and CTX-M-9. CTX-M-9 ESBL-producing *E. cloacae* isolates showed diverse ERIC-PCR profiles, indicating that they were not originated from a common source. **(Korean J Clin Microbiol 2005;8(1):57–65)**

Keywords: Enterobacter cloacae, SHV-12, CTX-M-9, Enterobacterial repetitive intergenic consensus, Polymerase chain reaction

Address reprint requests to : Seok Hoon Jeong, M.D., Department of Laboratory Medicine, Kosin University College of Medicine, 34 Amnam-Dong, Suh-Gu, Busan 602-702, Korea. Tel. 82-51-990-6373 Fax. 82-51-990-3034 E-mail: kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr