

## 국내에서 2003년에 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 CTX-M형 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase 생성 현황

이정현<sup>1</sup>, 배일권<sup>2</sup>, 권수봉<sup>2</sup>, 정석훈<sup>2</sup>, 우건조<sup>3</sup>, 이종욱<sup>4</sup>, 이위교<sup>5</sup>, 강정옥<sup>6</sup>, 안지영<sup>7</sup>, 홍성근<sup>8</sup>  
신종희<sup>9</sup>, 어 영<sup>10</sup>, 박연준<sup>11</sup>, 김의종<sup>12</sup>, 이경원<sup>13</sup>, 용동은<sup>13</sup>

고신의대 소아과학교실<sup>1</sup>, 진단검사의학교실<sup>2</sup>, 식품의약품안전청 식품미생물과<sup>3</sup>, 건양의대<sup>4</sup>, 아주의대<sup>5</sup>,  
한양의대<sup>6</sup>, 순천향의대<sup>7</sup>, 포천중문의대<sup>8</sup>, 전남의대<sup>9</sup>, 원주의대<sup>10</sup>, 가톨릭의대<sup>11</sup>, 서울의대<sup>12</sup>, 연세의대<sup>13</sup>  
진단검사의학교실

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

Jung Hyun Lee<sup>1</sup>, Il Kwon Bae<sup>2</sup>, Su Bong Kwon<sup>2</sup>, Seok Hoon Jeong<sup>2</sup>, Gun Jo Woo<sup>3</sup>, Jongwook Lee<sup>4</sup>,  
Wee Gyo Lee<sup>5</sup>, Jung Oak Kang<sup>6</sup>, Ji Young Ahn<sup>7</sup>, Seong Geun Hong<sup>8</sup>, Jong Hee Shin<sup>9</sup>, Young Uh<sup>10</sup>,  
Yeon Jun Park<sup>11</sup>, Eui-Chong Kim<sup>12</sup>, Kyungwon Lee<sup>13</sup>, Dongeun Yong<sup>13</sup>

Departments of Pediatrics<sup>1</sup> and Laboratory Medicine<sup>2</sup>, Kosin University College of Medicine; Division of Food  
Microbiology, Korea Food and Drug Administration<sup>3</sup>; Departments of Laboratory Medicine, Keonyang University  
College of Medicine<sup>4</sup>, Ajou University College of Medicine<sup>5</sup>, Hanyang University College of Medicine<sup>6</sup>, Sooncheonhyang  
University College of Medicine<sup>7</sup>, Pochon CHA University College of Medicine<sup>8</sup>, Chonnam National University Medical  
School<sup>9</sup>, Yonsei University Wonju College of Medicine<sup>10</sup>, The Catholic University of Korea College of Medicine<sup>11</sup>, Seoul  
National University College of Medicine<sup>12</sup>, Yonsei University College of Medicine<sup>13</sup>

**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  $\beta$ -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 $\alpha$  and *E. coli* Top10-F by transformation. MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics were determined by the agar dilution method. Searches for *bla*<sub>CTX-M</sub> genes was performed by PCR amplification; pls of  $\beta$ -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*<sub>CTX-M-3</sub> gene, 4 *E. coli* isolates harbored *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, and 1 *E. coli* and 5 *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 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.kosimmed.or.kr

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

## 서 론

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)는 가수분해 활성 범위가 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  $\beta$ -Lactamase, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15.

체특이성에 따른 Bush 등[1]의 분류에서 group 2be, 분자 구조에 따른 분류에서는 class A에 속한다[2]. 이들 효소는 penicillin, 헤파범위 cephalosporin과 제 3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등의 광범위  $\beta$ -lactam 항균제를 분해하지만, clavulanic acid, sulbactam, tazobactam 등  $\beta$ -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 유전형질을 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 먼봉으로 Mueller-Hinton한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10  $\mu$ g, BBL, Cockeysville, Mich., USA), 주위에는 30  $\mu$ g의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37 °C항온기에 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 °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

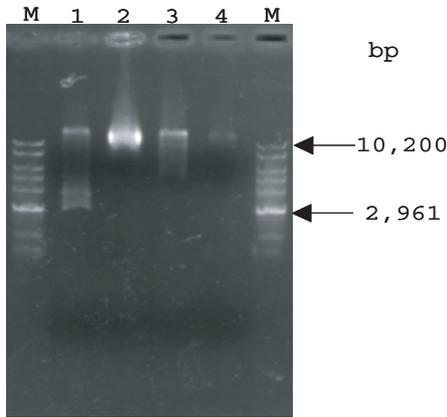


Fig. 1. Banding patterns of cell extracted plasmids containing *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene in 2 clinical isolates and 2 transformants after 1.0% agarose gel electrophoresis. Lane M, 1 kb DNA ladder DNA; lane 1, *K. pneumoniae* WK6; lane 2, *E. coli* trf-WK6, lane 3, *K. pneumoniae* WK15; lane 4, *E.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

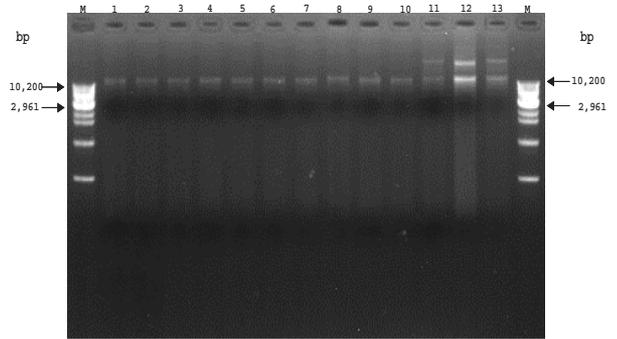


Fig. 2. Plasmid patterns of *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene in Kyonggi A and Gangwon A hospitals after 1.0% agarose gel electrophoresis. Lane M, 1 kb DNA ladder DNA; lane 1-8, CTX-M-3-producing *K. pneumoniae* isolates obtained in Kyonggi A hospital; lane9 and 10, CTX-M-3-producing *E. coli* isolates obtained 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' -tcgtccatttattgcatca-3'		
CTX-M-2F	5' -cccatggttaaaaaatcactg-3'	AF488377	891
CTX-M-2R	5' -ccgttccgctattacaac-3'		
CTX-M-3F	5' -atgtaatgacgacagcctgtg-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  $\beta$ -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  $\beta$ -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*<sub>CTX-M-3</sub> (Genbank accession no. AJ632119)와 일치하였으며, 같은 primer에 의한 *E. coli* 4주의 증폭산물은 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (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*<sub>CTX-M-14</sub> (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 ceftazidime의 MIC가 >256 mg/L로 cefotaxime의 256 mg/L보다 높은 양상을 보였다. Isoelectric focusing으로 *bla*<sub>CTX-M-3</sub> 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.4, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>를 지닌 균주에서는 pI 8.1, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.6의  $\beta$ -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  $\beta$ -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-1~5*와 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*<sub>CTX-M-3</sub> 유전자, *E. coli* 4주가 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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  $\beta$ -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*<sub>CTX-M-3</sub> 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 증임을 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  $\beta$ -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. 한천회색법으로  $\beta$ -lactam 항균제의 최소억제 농도를 측정하였으며, PCR로 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자를 검출하였고, PCR 산물의 염기서열을 양방향으로 분석하였다. Isoelectric focusing으로  $\beta$ -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*<sub>CTX-M-3</sub> 유전자, *E. coli* 4주에서 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 유전자, *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 5주에서 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-704.
4. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
5. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:393-6.
  32. Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, S enz Y, Garcia M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2056-8.