

## CTX-M형 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase 생성 *Escherichia coli*의 확산 및 CTX-M-12의 출현

오지은 · 홍종식<sup>1</sup> · 배일권<sup>1</sup> · 송은향<sup>1</sup> · 정석훈<sup>1</sup> · 이경원<sup>2</sup> · 용동은<sup>2</sup> · 이종욱<sup>3</sup> · 이위교<sup>4</sup> · 강정옥<sup>5</sup> · 안지영<sup>6</sup> · 홍성근<sup>7</sup> · 신종희<sup>8</sup> · 어 영<sup>9</sup>  
박연준<sup>10</sup> · 김의중<sup>11</sup> · 광효선<sup>12</sup> · 우건조<sup>12</sup>

고신외대 소아과학교실, 진단검사의학교실<sup>1</sup>; 연세의대, 건양의대, 아주의대, 한양의대, 순천향의대, 포천중문의대, 전남의대, 원주의대, 가톨릭의대<sup>10</sup>, 서울의대<sup>11</sup>, 진단검사의학교실; 식품의약품안전청 식품안전평가부<sup>12</sup>

### Dissemination of CTX-M Type Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases and Emergence of CTX-M-12 in *Escherichia coli*

Chi Eun Oh, M.D., Jong Sik Hong, M.D.<sup>1</sup>, Il Kwon Bae, M.P.H.<sup>1</sup>, Eun Hyang Song, M.T.<sup>1</sup>, Seok Hoon Jeong, M.D.<sup>1</sup>, Kyungwon Lee, M.D.<sup>2</sup>, Dongeun Yong, M.D.<sup>2</sup>, Jongwook Lee, M.D.<sup>3</sup>, Wee Gyo Lee, M.D.<sup>4</sup>, Jung Oak Kang, M.D.<sup>5</sup>, Ji Young Ahn, M.D.<sup>6</sup>, Seong Geun Hong, M.D.<sup>7</sup>, Jong Hee Shin, M.D.<sup>8</sup>, Young Uh, M.D.<sup>9</sup>, Yeon Jun Park, M.D.<sup>10</sup>, Eui-Chong Kim, M.D.<sup>11</sup>, Hyo-Sun Kwak, Ph.D.<sup>12</sup>, and Gun Jo Woo, Ph.D.<sup>12</sup>

Departments of Pediatrics and Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Kosin University College of Medicine, Busan; and Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine<sup>2</sup>, Seoul; Keonyang University College of Medicine<sup>3</sup>, Daejeon; Ajou University College of Medicine<sup>4</sup>, Suwon; Hanyang University College of Medicine<sup>5</sup>, Guri; Sooncheonhyang University College of Medicine<sup>6</sup>, Gumi; Pochon Cha University College of Medicine<sup>7</sup>, Sunnam; Chonnam National University Medical School<sup>8</sup>, Gwangju; Yonsei University Wonju College of Medicine<sup>9</sup>, Wonju; The Catholic University of Korea College of Medicine<sup>10</sup>, Seoul; and Seoul National University College of Medicine<sup>11</sup>, Seoul; and Center for Food Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration<sup>12</sup>, Seoul, Korea

**Background** : Clinical isolates of *Escherichia coli* were evaluated to determine the prevalence and genotypes of Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs).

**Methods** : Clinical isolates of *E. coli* were collected from 12 hospitals from February through July, 2004. Antimicrobial susceptibility was tested by disk diffusion and agar dilution methods, and ESBL-production was determined by double-disk synergy test. TEM, SHV, CTX-M, PER-1, VEB, IBC, GES, and TLA type ESBL genes were detected by PCR amplifications, and the PCR products were subjected to direct sequencing.

**Results** : The double-disk synergy test was positive in 90.9% (149 in 164) of the ceftazidime- or cefotaxime-resistant *E. coli* isolates. The most prevalent types of Ambler class A ESBLs in *E. coli* isolates were CTX-M-15 (n=53). CTX-M-14 (n=24), CTX-M-3 (n=9), CTX-M-9 (n=3), CTX-M-12 (n=3), SHV-2a (n=1), SHV-12 (n=5) and TEM-52 (n=3) were also found. CTX-M-12 ESBL had never been reported before in Korea.

**Conclusions** : CTX-M type ESBL-producing *E. coli* isolates are spreading and CTX-M-12 is emerging in Korea. (*Korean J Lab Med* 2005; 25: 252-8)

**Key Words** : *Escherichia coli*, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-12, CTX-M-14, CTX-M-15

접 수 : 2005년 5월 24일      접수번호 : KJLM1857  
수정본접수 : 2005년 7월 5일  
교신저자 : 정 석 훈  
우 602-702 부산광역시 서구 암남동 34  
고신대학교 의과대학 진단검사의학교실  
전화 : 051-990-6373, Fax : 051-990-3034  
E-mail : kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

### 서 론

Ampicillin이 개발된 이후  $\beta$ -lactam 항균제는 그람음성간균에 의한 감염증의 주요 치료제로 사용되어 왔다[1]. 그러나 TEM-

\*본 연구는 2005년 식약청 위탁과제 지원에 의하여 이루어진 것임(05062항 내안602).

1, -2, SHV-1 등  $\beta$ -lactamase 생성에 의해 ampicillin에 대한 내성을 획득한 세균에 의한 감염증이 확산됨에 따라서 oxyimino-cephalosporin, monobactam, carbapenem 등 광범위  $\beta$ -lactam 항균제가 1980년대 초부터 임상에서 사용되어 왔다[2]. 이들 광범위  $\beta$ -lactam 항균제는 그람음성간균의 세포외막을 용이하게 투과하고, penicillin-binding protein과의 친화도가 높으며, 그람음성간균이 생성하는  $\beta$ -lactamase에 비교적 안정하기 때문에 ampicillin에 내성인 세균에 의한 감염증 치료에 유효하였다.

근래 다양한 기전에 의해서 이들 광범위  $\beta$ -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한 세균이 등장하였으며, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)의 생성은 그람음성간균이 이들 항균제에 대한 내성을 획득하는 가장 중요한 기전이다[3, 4]. 가장 널리 알려진 ESBL인 TEM형 및 SHV형 효소는  $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{TEM-2}$ ,  $bla_{SHV-1}$  등  $\beta$ -lactamase 유전자의 점 변이에 의한 아미노산 치환에 의해서 생성되었다[5]. Plasmid에 의해 매개되는 이들 ESBL은 가수분해 활성범위가 매우 넓어서 penicillin, 헤파범위 cephalosporin과 제 3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등의 광범위  $\beta$ -lactam 항균제를 분해하지만, clavulanic acid에 의해 활성이 억제되며, cephamycin과 carbapenem에는 활성이 없는 특징이 있다[6]. 현재까지 80가지 이상의 TEM형과 50가지 이상의 SHV형 ESBL이 보고되었다[7].

CTX-M형 ESBL 역시 plasmid에 의해 매개되며, 가수분해 기질특이성 및 억제특이성이 TEM형이나 SHV형 ESBL과 유사하지만, ceftazidime에 비해 cefotaxime에 대한 가수분해 활성이 상대적으로 강한 특성이 있다[7]. 1996년 Bauernfeind 등[8]이 CTX-M-1과 CTX-M-2를 보고한 이후 현재까지 40여종이 알려졌다[9]. 국내에서는 2001년 CTX-M-14 생성 *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 및 *Shigella sonnei*가 보고되었으며, 2003년 12개 국내 대형병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 한 조사에서는 CTX-M-3, -14, -15 등 CTX-M 형 ESBL을 생성하는 균주의 빈도가 2002년에 비해서 현저하게 증가되었음이 보고되었다[10, 11]. 또한 홍 등[12]은 부산의 한 대학병원에 CTX-M-9을 생성하는 *Enterobacter cloacae*가 만연되어 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 전국 12개 대학병원에서 2004년에 분리된 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 내성인 *E. coli*를 대상으로 ESBL 생성현황을 조사함으로써 국내에 유행하는 ESBL 유전형의 변화 양상을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집

서울(3), 경기도(3), 강원도(1), 대전(1), 광주(1), 경상북도(1), 부산(1), 제주도(1) 등 전국 12개 병원이 본 조사에 참여하

였다. 2004년 2월에서 7월까지 이들 12개 병원에서 분리된 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 중간 혹은 내성인 *E. coli*를 수집하였으며 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., USA)로 확인하였다.

### 2. 항균제 감수성 시험

미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 기준[13]에 따라서 ceftazidime과 cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였다. 정도관리를 위해서 표준균주 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

### 3. ESBL 생성 확인

Double-disk synergy법을 사용하였다[14]. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천(Difco, Cockeysville, Mich., USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid 디스크(20/10  $\mu$ g; BBL, Cockeysville, Mich., USA), 주위에는 30  $\mu$ g의 ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam 디스크(BBL)를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

### 4. 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다[15]. 시험 항균제로는 ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime-clavulanic acid 및 cefotaxime-clavulanic acid를 사용하였으며, clavulanic acid의 농도는 4  $\mu$ g/mL로 고정하였다. 시험균주  $10^4$  colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256  $\mu$ g/mL농도로 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 표준균주 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

### 5. 접합에 의한 내성 전달

Filter mating법[16]으로 시험하였다. Azide에 내성인 *E. coli* J53을 내성 수여자로 사용하였고, 내성 공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (Difco) 액체배지에 접종하여서 3시간 진탕 배양 하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37°C에서 1시간 배양 후, ceftazidime 2  $\mu$ g/mL와 azide 100  $\mu$ g/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다.

37°C에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위해서 transconjugant의 ceftazidime에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였다.

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

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

## 7. 분자생물학적 방법에 의한 내성유전형 확인

강 등[11]의 고안에 따라서 primer를 제작하였다(Table 1). 시험세균을 Tryptic soy broth (Difco)에 접종하여 37°C로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 5분간 13,000 $\times$ g로 원심 후, 상층액은 버리고, 침사는 증류수 500  $\mu$ L에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 $\times$ g로 원심하고, 상층액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5  $\mu$ L, primer 각 1  $\mu$ L, deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 2.5 mM (8  $\mu$ L), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5  $\mu$ L), 10X buffer 10  $\mu$ L 및 증류수 75.5  $\mu$ L를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)으로 94°C로 25초간 denaturation, 58°C로 40초간 anneal-

Table 1. Sequence of the PCR primers

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

ing, 72°C로 50초간 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다. 증폭산물 10  $\mu$ L를 2% agarose gel (Promega, Madison, Wi., USA)의 홈에 넣고 40분간 전기영동하여서 band를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, 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[17]으로 양방향으로 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 1. ESBL 생성 현황

시험기간 중 국내 12개 병원에서 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 중간 혹은 내성인 *E. coli* 164주를 수집하였다. 이 중 149주(90.9%)가 double-disk synergy 양성 소견을 보였다. 조사에 참여한 12개 병원 모두에서 double-disk synergy 양성인 균주가 검출되었다(Fig. 1). Double-disk synergy 양성인 149주 중 47주(31.5%)의 ceftazidime 내성이 azide 내성인 *E. coli* J53으로 전달되었다.

### 2. ESBL 유전형

TEM형, SHV형, CTX-M-1형 및 CTX-M-9형 ESBL 검출을 위한 PCR에 double-disk synergy 양성인 *E. coli* 149주 중 각각 67주, 7주, 65주 및 27주가 양성반응을 보였다. TEM형 PCR에 양성인 67주의 증폭 산물 중 3주의 증폭 산물만이 *bla*<sub>TEM-52</sub> 유전자와 염기서열이 일치하였고 나머지 모두는 ESBL이 아닌 *bla*<sub>TEM-1</sub> 유전자와 염기서열이 일치하였다. SHV형 PCR에 양성인 7주의 증폭산물 중 5주는 *bla*<sub>SHV-12</sub>, 2주는 *bla*<sub>SHV-2a</sub> 유전자와 염기서열이 일치하였다. CTX-M-1형 PCR에 양성인 65주의 증폭산물 중 53주가 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 유전자와 염기서열이 일치하여서 가장 흔하였고, 9주는 *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, 3주는 *bla*<sub>CTX-M-12</sub> 유전자와 염기서열이 일치하였다(Fig. 1). 또한 CTX-M-9형 PCR에 양성인 27주의 증폭산물 24주는 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, 3주는 *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 유전자와 일치하였다. 2주에서는 *bla*<sub>SHV-12</sub>와 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 유전자, 1주에서는 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>와 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 유전자가 동시에 검출되었다.

### 3. ESBL 생성 균주의 MIC 특성

SHV-12를 생성하는 *E. coli*에 대한 ceftazidime과 cefotaxime의 MIC 범위는 각각 64->256  $\mu$ g/mL 및 16-128  $\mu$ g/mL이었다. 이들 균주에 대한 ceftazidime-clavulanic acid와 cefotaxime-clavulanic acid의 MIC 범위는 8-16  $\mu$ g/mL 및 0.5-16  $\mu$ g/mL로 clavulanic acid를 첨가한 경우 MIC가 감소하는 양상을 보였다.

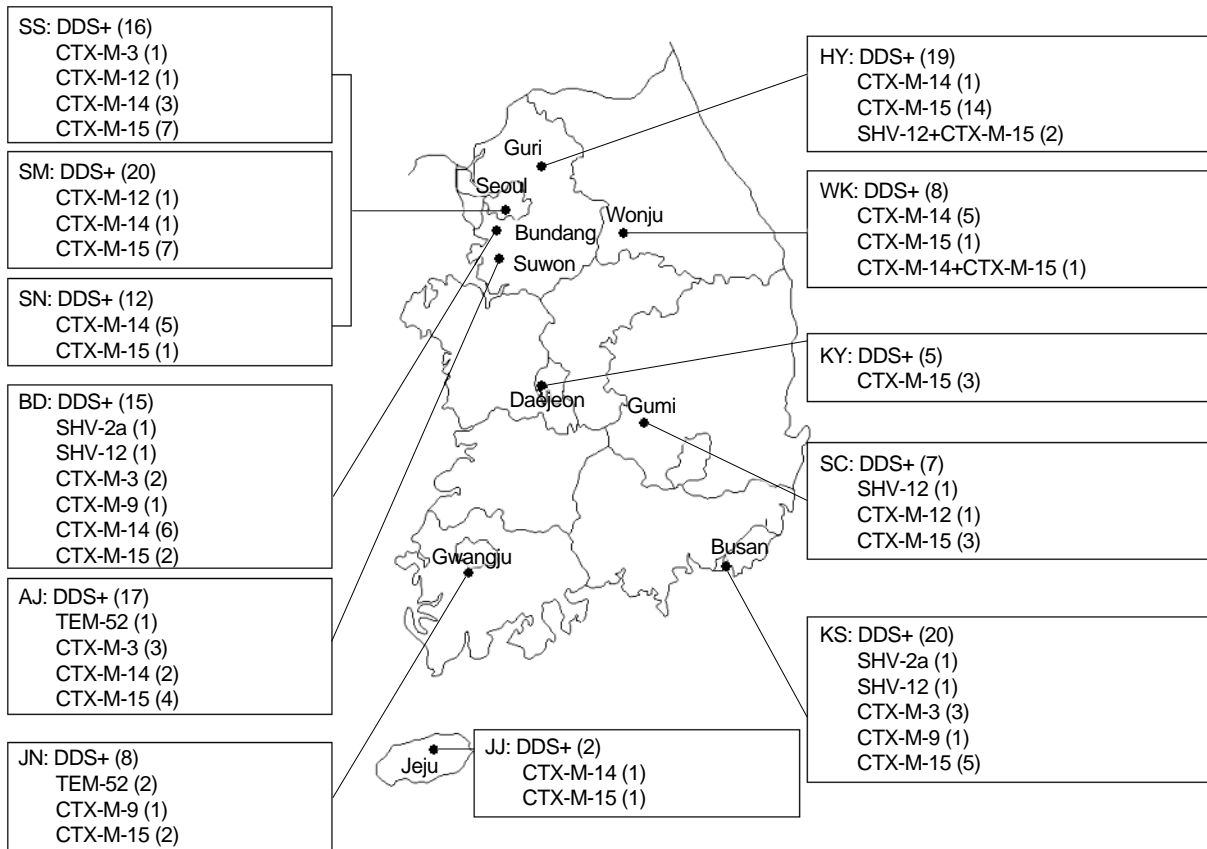


Fig. 1. Location of Korean hospitals involved in this survey. The figures in the parentheses indicate a number of double-disk synergy-positive (DDS+) *E. coli* isolates and Ambler class A ESBLs at each hospital.

Table 2. Characteristics of Ambler class A ESBL-producing *E. coli* isolates

Type of Ambler class A ESBLs	No. (%) of isolates	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )													
		Cefoxitin		Aztreonam		Ceftazidime		Ceftazidime-clavulanic acid		Cefotaxime		Cefotaxime-clavulanic acid		Imipenem	
		Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>
CTX-M-3	9 (5.5)	4-64		8-256		1-16		0.5-16		32->256		1-256		0.1-0.5	
CTX-M-9	3 (1.8)	4-8		1-32		0.3-4		0.1-8		8-128		1-64		0.1-0.3	
CTX-M-12	3 (1.8)	4-32		8-64		1-4		0.5-8		32-256		1-64		0.1-0.3	
CTX-M-14	23 (14)	1-256	8	1->256	8	0.5-32	2	0.3-16	1	16->256	128	1-256	16	0.1-0.5	
CTX-M-15	50 (30.4)	2->256	16	32->256	256	8->256	128	1->256	32	128->256	>256	2->256	64	0.1-0.5	
CTX-M-14+ CTX-M-15	1 (0.6)	8		>256		128		128		>256		256		0.3	
CTX-M-15+ SHV-12	2 (1.2)	8->256		128-256		256		16-256		256		32-256		0.3-0.5	
SHV-12	3 (1.8)	4-64		256->256		64-256		8-16		16-128		0.5-16		0.1-0.3	
SHV2a	1 (0.6)	64		32		16		2		8		1		0.5	
TEM-52	3 (1.8)	2->256		8-32		32-128		16-64		32-256		8-256		0.3	

SHV-2a를 생성하는 균주에 대한 이들 항균제의 MIC는 SHV-12를 생성하는 균주에 비해서 낮은 분포를 보였다. CTX-M형 ESBL을 생성하는 *E. coli*에 대한 cefotaxime의 MIC는 8->256  $\mu\text{g/mL}$ 으로 ceftazidime의 0.25->256  $\mu\text{g/mL}$ 에 비해서 높은 분포를 보였다. CTX-M-14나 CTX-M-15를 생성하는 균주에 대한 cefo-

taxime의 MIC<sub>50</sub>는 각각 128  $\mu\text{g/mL}$ 와 >256  $\mu\text{g/mL}$ 으로 높았다. 그러나 CTX-M-14를 생성하는 균주에 대한 ceftazidime의 MIC는 2  $\mu\text{g/mL}$ 로 cefotaxime에 비해 현저하게 낮은데 반하여, CTX-M-15 생성균주에 대한 ceftazidime의 MIC<sub>50</sub>은 128  $\mu\text{g/mL}$ 로 높았다. CTX-M-14와 CTX-M-15를 동시에 생성하는 *E. coli*

1주에 대한 cefotaxime과 ceftazidime의 MIC는 각각 >256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. CTX-M-12를 생성하는 *E. coli*에 대한 cefotaxime과 ceftazidime의 MIC 범위는 각각 32-256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 1-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, clavulanic acid를 첨가하면 MIC가 낮아지는 현상을 보였다(Table 2). Isoelectric focusing을 통하여 SHV-2a, SHV-12, TEM-52, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-12, CTX-M-14 및 CTX-M-15에 해당하는 pI 7.6, 8.2, 6.0, 8.4, 8.0, 9.0, 8.1 및 8.6의 band를 확인할 수 있었다.

## 고 찰

시험기간 중에 분리된 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 중간 혹은 내성 *E. coli* 중 90.9% (149/164)가 double disk synergy 양성이었다는, 이는 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 내성인 *E. coli* 대부분이 ESBL 생성에 의하여 내성을 획득하였음을 시사한다. 1997년 국내에서 분리된 *E. coli*의 ESBL 생성률이 4.8%인데 반하여 2003년 분리균주의 ESBL 생성률은 9.3%로 현저하게 증가하였다는 보고가 있었는데[11], 본 연구의 결과는 CTX-M형 ESBL의 확산이 *E. coli*의 ESBL 생성률 증가에 큰 영향을 미쳤음을 시사한다. 과거 가장 흔한 ESBL로 간주되었던 TEM-52[18, 19]와 SHV-12[20, 21]는 본 연구에서 각각 3주와 5주에서만 검출된데 반하여 CTX-M-1형과 CTX-M-9형 ESBL은 각각 67주와 27주가 분리되어 ESBL분포에 큰 변화가 있었다.

CTX-M-15 유전자는 53주에서 분리되어 가장 흔한 ESBL이었다. 이 효소는 인도에서 분리된 장내세균에서 처음 발견되었으며[22], CTX-M-3에 비하여 1개의 아미노산이 치환된(Asp240Gly) 효소로, 이 치환은 효소의 ceftazidime에 대한 활성을 강화시킨다[23]. 본 연구에서 분리된 CTX-M-15 생성 균주에 대한 ceftazidime의 MIC<sub>50</sub>은 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 다른 CTX-M형 ESBL 생성 균주에 대한 MIC보다 현저하게 높은 양상을 보였다. CTX-M-15 유전자는 plasmid에 매개되며 insertion sequence ISEcp1과 연관되어 존재하는 것으로 알려졌다[22, 23]. 국내에서 분리되는 CTX-M-15 유전자가 insertion sequence와 연관되어 존재하는지 여부에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각하며, 이 연구는 CTX-M-15의 확산 기전을 규명하는데 중요한 단서를 제공할 것으로 기대한다.

한편 본 연구에서는 CTX-M-12를 생성하는 *E. coli* 3주가 검출되었다. CTX-M-12는 CTX-M-3과 비교할 때 3개의 아미노산이 치환(Thr12Ala, Asp89Ser 및 Val278Ile)된 효소이다. 2000년 케냐[24]에서 이 효소를 생성하는 *K. pneumoniae*에 의한 집단감염이 처음 보고된 이후, 콜롬비아[25]에서도 이 효소를 생성하는 *K. pneumoniae*가 분리되었다. 본 연구에서 검출된 CTX-M-12 생성 *E. coli*는 이 효소를 생성하는 균주의 아시아 첫 분리 예로 생각된다. CTX-M-12 ESBL 생성균주에 대한 cefotaxime의 MIC 범위는 32-256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 ceftazidime의 1-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높았

며, clavulanic acid 첨가시 MIC가 감소하는 양상을 보였다. CTX-M-12의 출현은 국내의 CTX-M형 ESBL이 다양화되고 있음을 시사하며, 이에 대한 지속적인 감시의 필요성이 있다.

CTX-M-14는 24주가 분리되어 2번째로 흔한 ESBL이었다. 이 효소는 CTX-M-9에 비해서 아미노산 1개(Ala231Val)가 치환된 것으로, 국내에서는 2001년에 이 효소를 생성하는 *K. pneumoniae*, *E. coli* 및 *S. sonnei*가 보고되었다[10]. 이 효소는 cefotaxime에 대한 활성이 ceftazidime에 비해서 현저히 강한 전형적인 cefotaximase이며, 본 연구에서 분리된 23주 역시 cefotaxime에 대한 MIC<sub>50</sub>이 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 ceftazidime의 MIC<sub>50</sub> 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 양상을 보였다. 한편 본 연구에서는 2003년에 시행된 조사에서 검출되지 않았던 CTX-M-9 생성 균주도 3주가 분리되었으며, 이는 국내에서 분리되는 CTX-M-15 ESBL이 CTX-M-9에서 231번째 아미노산의 치환에 의해 출현하였음을 시사한다. 이들 CTX-M-9형 ESBL의 유전자는 plasmid에 의해 매개되며, insertion sequence ISEcp1과 연관되어 존재하거나 integron의 유전자 cassette 형태로 존재하는 것으로 보고되었다[26]. 국내에서 분리되는 CTX-M-9형 ESBL의 유전자 환경에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 국내에서 분리되는 *E. coli* 중 CTX-M형 ESBL을 생성하는 균주가 확산되고 있으며, CTX-M형 ESBL의 유형이 다양화되고 있음을 시사한다. CTX-M형 ESBL의 확산과 다양화를 감시하기 위한 지속적인 조사가 필요하며, 확산의 기전을 규명하기 위해서 CTX-M형 ESBL의 유전자 환경에 대한 조사가 필요한 것으로 생각한다.

## 요 약

**배경 :** 국내에서 분리되는 *Escherichia coli*의 Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성 현황을 알아보고자 하였다.

**방법 :** 2004년 2월부터 7월까지 전국 12개 병원에서 분리된 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 중간 혹은 내성인 *E. coli*를 수집하였다. 항균제 감수성은 디스크 확산법으로 시험하였고, ESBL 생성은 double-disk synergy 시험으로 확인하였다. 한천회색법으로  $\beta$ -lactam 항균제의 최소억제 농도를 측정하였다. 중합연쇄 반응으로 TEM형, SHV형, CTX-M형, PER-1형, VEB형, IBC형, GES형 및 TLA형 유전자를 검출하였고, 중합연쇄반응 산물의 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

**결과 :** 국내 12개 병원에서 수집한 cefotaxime 혹은 ceftazidime에 중간 혹은 내성인 *E. coli*의 90.9% (149/164)가 double-disk synergy 양성 소견을 보였다. *E. coli*에서 가장 흔한 Ambler class A ESBL은 CTX-M-15 (53주)와 CTX-M-14 (24주)였으며, CTX-M-3, CTX-M-9 및 CTX-M-12가 9주, 3주 및 3주 검출되었고, SHV-2a, SHV-12 및 TEM-52 유전자를 지닌 균주가



1주, 5주 및 3주 검출되었다.

**결론 :** 본 연구를 통하여 CTX-M형 ESBL을 생성하는 *E. coli*가 국내에서 확산중이며 CTX-M-12 생성균주가 출현하였음을 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

- Quintiliani R, Sahn DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999: 1505-25.
- Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11: 315-7.
- 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.
- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 17-29.
- Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A. Extended broad-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.
- Tzouveleki 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.
- 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.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3724-32.
- 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* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Clin Microbiol 2001; 39: 3747-9.
- Kang JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Lee J, Lee WG, et al. Prevalence of Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2005; 8: 17-25. (강지혜, 배일권, 권수봉, 정석훈, 이종욱, 이위교 등. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 국내 분리 현황. 대한임상미생물학회지 2005; 8: 17-25.)
- Hong YR, Yu H, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Kim HJ, et al. Emergence of CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolates. Korean J Clin Microbiol 2005; 8: 57-65. (홍유라, 유호연, 배일권, 권수봉, 정석훈, 김현주 등. CTX-M-9형 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Enterobacter cloacae*의 출현. 대한임상미생물학회지 2005; 8: 57-65.)
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement, M100-S10. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385-92.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved standards. M7-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
- Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, et al. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. J Appl Microbiol 2005; 98: 921-7.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-7.
- Pai H, Lyu S, Lee JH, Kwon Y, Kim J-W, Choe KW. Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999; 37: 1758-63.
- Lee K, Yong D, Yum JH, Kim HH, Chong Y. Diversity of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 493-6.
- Hong SG, Kim S, Jeong SH, Chang CL, Cho SR, Ahn JY, et al. Prevalence and diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2003; 6: 149-55. (홍성근, 김선주, 정석훈, 장철훈, 조성란, 안지영 등. 국내에서 분리된 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도 및 유형. 대한임상미생물학회지 2003; 6: 149-55.)
- Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC, et al. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter species* in Korea. J Clin Microbiol 2003; 41: 2477-82.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Villegas MV, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al. CTX-M-12  $\beta$ -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 629-31.
26. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.