

한국에서 분리된 Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도와 유전자형의 분포

송원근 · 김재석 · 김미나* · 김의종** · 박연준*** · 용동은**** · 이경원***** · 이위교***** · 정석훈***** · 이규만

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실, 울산대학교 의과대학 아산중앙병원 진단검사의학교실,* 서울대학교 의과대학 진단검사의학교실,**
가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실,*** 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실,**** 아주대학교 의과대학 진단검사의학교실,*****
고신대학교 의과대학 진단검사의학교실*****

Occurrence and Genotypic Distributions of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea

Wonkeun Song, M.D., Jae-Seok Kim, M.D., Mi-Na Kim, M.D.,* Eui-Chong Kim, M.D.,** Yeon-Joon Park, M.D.,***
Donggun Yong, M.D.,**** Kyungwon Lee, M.D.,**** Wee Gyo Lee, M.D.,*****
Seok Hoon Jeong, M.D.,***** and Kyu Man Lee, M.D.

Departments of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine; University of Ulsan,* College of Medicine and Asan Medical Center; Seoul National University College of Medicine;** College of Medicine,*** The Catholic University in Korea; Yonsei University College of Medicine,**** Seoul; Ajou University College of Medicine,***** Suwon; Kosin University College of Medicine,***** Busan, Korea

Background : Plasmid-mediated AmpC β -lactamases (PABL) are cephalosporinases that confer resistance to a wide variety of β -lactam drugs and that may thereby create serious therapeutic problems. The PABL-producing organisms are a major concern in nosocomial infections and should therefore be monitored in surveillance studies. Although reported with increasing frequency in Korea, the occurrence and genotypic distributions of PABL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* remain unknown.

Methods : We tested a total of 911 consecutive, nonduplicate isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* at 12 university hospitals and a commercial laboratory in Korea. Antimicrobial susceptibilities were tested using the disk diffusion method. PABL production was determined by the modified Hodge test and multiplex PCR. The PCR differentiated the six PABL-specific families in *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Results : Overall, 110 (12.1%) yielded cefoxitin non-susceptible isolates and that 28 (3.1%) demonstrated PABL producers by multiplex PCR. Based on the species, of 544 *E. coli* and 367 *K. pneumoniae* isolates tested, 8 (1.5%) and 20 (5.4%), respectively, demonstrated PABL producers. The genotypes of PCR amplification showed that the MOX, DHA, and CIT family were harbored by 4, 2, and 2 of 8 PABL-producing *E. coli*, and the DHA, MOX, and EBC family were harbored by 13, 6, and 1 of 20 PABL-producing *K. pneumoniae* isolates, respectively.

Conclusions : These data confirm that the occurrence of PABL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* is relatively high and the kinds of genotypes are variously distributed in Korea. (*Korean J Lab Med*

2002; 22: 410-6)

접 수 : 2002년 11월 2일

접수번호 : KJCP1623

수정본접수 : 2002년 12월 23일

교신저자 : 송원근

우 150-071 서울시 영등포구 대림 1동 948-1

한림대학교 강남성심병원 진단검사의학과

전화 : 02-829-5259, Fax : 02-847-2403

E-mail : swonkeun@hallym.or.kr

Key words : Plasmid-mediated AmpC β -lactamase, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Modified Hodge test, Multiplex PCR, Korea

*본 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발사업인 독성물질 국가관리사업의 일환으로 이루어졌음.

서 론

AmpC β -lactamase를 과잉 생성하는 균주는 cefepime, cefpirome 및 carbapenem제를 제외한 모든 β -lactam제에 내성을 보인다[1]. 그람음성세균이 AmpC β -lactamase를 구성적(constitutive)으로 과잉 생성하는 기전은 ampC 염색체 유전자의 deregulation에 의한 것과 plasmid에 있는 ampC 유전자의 전이에 의한 것이 있다. 후자와 같은 전이성 ampC 유전자에 의해 생성된 효소를 plasmid성 AmpC β -lactamase (PABL)라고 한다[2].

PABL 유전자는 주로 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*에서 발견되며 *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *K. oxytoca* 등에서도 드물게 보고되고 있다[3-6]. 이 유전자는 *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* 등에 있는 염색체성 ampC 유전자에서 유래된 것으로 1989년 Bauernfeind 등[7]이 한국에서 분리된 *K. pneumoniae*가 penicillin제, oxyimino-cephalosporin제, monobactam제 뿐만 아니라 cefoxitin과 cefotetan에도 내성이며 이 내성이 *E. coli*에 전달됨을 밝혀내어 이 효소를 CMY-1이라고 명명하였다. Papanicolaou 등[8]은 α -methoxy-와 oxyimino- β -lactam제의 내성이 전달되는 MIR-1 효소를 발견하였으며 이 효소가 *E. cloacae*의 ampC 유전자와 90% 유사함을 밝혀 내었다. 이후 지금까지 약 30종의 PABL 유전자가 전세계적으로 발견되었다[9]. 이 효소들은 ESBL과 마찬가지로 plasmid에 있는 유전자이기 때문에 다른 균종으로의 전파가 용이하여 역학연구나 병원감염 관리의 측면에서 매우 중요하나 한 균종이 여러 종류의 ESBL 유전자를 갖고있거나 ESBL과 AmpC 유전자를 같이 갖고있는 경우 이를 검출하는 것이 쉽지 않다[10].

PABL 생성균주의 검출법으로 비교적 정확하고 간편한 방법인 3차원 추출(three-dimensional extract) 시험[4]과 변법 Hodge 시험[11] 등이 개발되었고 지금까지 밝혀진 대부분의 PABL 유전자를 6개군으로 나누어 검출할 수 있는 multiplex PCR[9]이 보고되어 이용되고 있다. 외국의 경우 PABL 생성균주에 대한 내성기전이나 발생빈도 및 분자유전학적 성상에 대한

연구가 많이 보고되고 있으나 국내에는 이에 대한 연구 보고가 미미한 실정이다. 이에 저자들은 국내의 각 지역에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 PABL 생성균주의 항균제감수성 양상, 빈도 및 유전자형의 분포 등을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

한림대학교 강남성심병원에서 2002년 4월에서 6월 사이에 분리된 연속 분리주이면서 반복 분리되지 않은 *E. coli* 316주와 *K. pneumoniae* 129주 및 전국 12개 대학병원과 1개의 검사센터에서 같은 기준으로 분리된 각각의 약 20주씩의 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 수집하여 총 544주의 *E. coli*와 367주의 *K. pneumoniae*를 대상으로 이 균주가 분리된 환자의 지역, 검체, 연령, 성 등을 조사 분석하였고 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 디스크확산법[12]으로 항균제감수성시험을 실시하였다. 대상 항균제는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam, cephalothin, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, cotrimoxazole (이상 BBL, Cockeysville, MI, USA)이었다. 이 중 cefoxitin에 중간 또는 내성을 보이는 균주와 변법 Hodge 시험에 양성인 균주를 대상으로 multiplex PCR을 시행하였다. 변법 Hodge 시험은 혈액한천배지에 계대배양한 *E. coli* ATCC 25922 집락을 McFarland No. 0.5에 맞춘 후 1/10로 희석하여 Mueller-Hinton 배지(BBL)에 바른 다음 cefoxitin 디스크를 중앙에 놓고 대상균주를 cefoxitin 디스크의 가장자리부터 plate 끝까지 굵고 35°C에서 하룻밤 배양한 후 억제대가 찌그러지면 양성, 즉 plasmid-mediated AmpC β -lactamase 생성균주로 판독하였다[11]. Multiplex PCR은 Perez-Perez와 Hanson이 고안한 방법[9]을 약간 변형하여 시행하였다. 혈액한천배지에 계대배양된 대상균주의 집락 4-5개를 Brain Heart Infusion 액체배지(BBL)에 풀어

Table 1. Primers used for amplification*

Target	Primer	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	Nucleotide position
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 TO CMY-11	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	358-378
	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C		877-856
	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA		478-498
LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462	939-919
	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T		1244-1265
	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC		1648-1628
ACC	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	861-881
	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC		1206-1186
	MIR-1, ACT-1	EBCMF		TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG
EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	1416-1396		
FOX-1 to FOX-5b	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	1475-1496
	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		1664-1644

*From reference[9].

서 15분간 10,000×g로 원심분리하여 상층액을 버리고 500 μL 멸균증류수로 재 부유시킨 다음 95°C에서 10분간 가열하여 세포를 파괴시키고 15분간 10,000×g로 원심분리하여 상층액 2 μL를 PCR에 이용하였다. PCR은 최종 부피가 20 μL가 되게 하였다. 사용된 primer들은 Table 1과 같다. 각각의 반응에는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 각각의 0.2 mM dNTP; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 1.5 mM MgCl₂; 각각의 10 pM primer MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF, DHAMR, ACCMF, ACCMR, EBCMF, EBCMR, FOXMF, FOXMR; 1 U Taq DNA polymerase (Bioline, Luckenwalde, Germany)가 포함되었다. 각각의 DNA (2 μL)에 18 μL의 반응액을 넣었다. PCR 프로그램은 처음 denaturation이 94°C, 5분, 그 다음 cycle은 denaturation 94°C, 30초; annealing 64°C, 30초; extension 72°C, 1분간 25 cycle 시행하고 마지막 extension은 72°C, 7분간으로 하였다. PCR 산물은 2% agarose (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)에 전기영동하여 분석하였다. Gel은 10 μg/mL의 ethidium bromide로 염색하였고 자외선 투사기로 판독하였다. 100-bp DNA ladder (Bioneer, Daejun, Korea)를 marker로 사용하였다. Cefoxitin 비감수성 균주를 대상으로 extended-spectrum β-lactamase (ESBL)도 갖고있는지를 알아보기 위해서 Jarlier 등[13]의 방법으로 double disk synergy (DDS) 시험을 시행하였다. 이 시험에 사용한 항균제 디스크는 중앙에 amoxicillin-clavulanate를, 그 주변에는 cefotaxime, ceftazidime, cefepime 및 aztreonam을 이용하였다.

결 과

Cefoxitin의 감수성 결과를 기준으로 *E. coli* 544주와 *K.*

pneumoniae 367주에 대한 항균제감수성시험 결과를 비교하였다. Cefoxitin에 감수성이 아닌 균주는 *E. coli*가 49주(9.0%)이었고 *K. pneumoniae*가 61주(16.6%)이었다. *K. pneumoniae*에 대한 ampicillin을 제외하고 cefoxitin에 비감수성인 균주는 cefoxitin에 감수성인 균주에 비해 모든 대상 β-lactam제에 대하여 비감수성률이 높았다. 단, imipenem의 경우는 cefoxitin 비감수성 및 감수성 균주 모두에서 중간 또는 내성인 균주는 없었다. 또한 aminoglycoside제, ciprofloxacin 및 cotrimoxazole에 대해서도 cefoxitin 비감수성균주의 감수성률이 더 낮았다(Table 2).

E. coli 8주(1.5%)와 *K. pneumoniae* 20주(5.4%)가 PABL 생성균주이었으며 대상 지역에서 고르게 분리되었다. 이중 50%가 요검체에서 분리된 균주이었고 객담과 창상에서 각각 18%씩 분리되었다. 입원 환자가 23명(일반병동, 17명; 중환자실, 6명)이었고 외래환자가 5명이었으며 나이는 1세부터 82세까지 분포하였고 중간값은 65세이었다. 남녀의 성비는 1.5:1이었다. 변법 Hodge 시험은 28주의 PABL 생성균주 중 26주가 양성을 보였고 81주의 비생성균주 중 78주가 음성을 보여 예민도와 특이도가 각각 93%와 96%이었다. 위음성을 보인 2주는 모두 DHA군 유전자형인 *E. coli*이었다. PABL 생성균주 중 DHA군 유전자형인 15주 중 12주가 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam에 모두 감수성 또는 중간의 결과를 보였다. MOX, EBC 또는 CIT군 유전자형인 균주들은 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 중 한가지 이상에서 내성을 보였고 PABL 생성균주 중 cefepime이나 imipenem에 내성인 균주는 없었다. *E. coli*에서는 MOX군 유전자형인 균주가 4주(50%)로 가장 많았고 CIT와 DHA군 유전자형인 균주가 각각 2주씩이었다. *K. pneumoniae*에서는 DHA군 유전자형인 균주가 13주(65%)로 가장 많았고 MOX와 EBC군 유전자형인 균주가 각각 6주와 1주이었다. PABL 생성균주 중 DDS 시험에도 양성을 보인 균주가 14.3% (4/28)이었으며 *E.*

Table 2. The rate of non-susceptible *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates according to susceptibility of cefoxitin

Antimicrobial agent	% non-susceptible to:					
	<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>		
	FOX-NS (n=49)	FOX-S (n=495)	Total (n=544)	FOX-NS (n=61)	FOX-S (n=306)	Total (n=367)
Ampicillin	98	72	74	98	100	100
Ampicillin-sulbactam	98	58	61	89	26	36
Piperacillin-tazobactam	51	9	13	65	16	23
Cephalothin	94	37	42	93	26	37
Cefotaxime	69	3	10	60	20	26
Ceftazidime	55	4	12	46	26	31
Cefepime	22	2	3	12	8	8
Aztreonam	67	5	10	45	21	24
Imipenem	0	0	0	0	0	0
Amikacin	43	4	8	41	17	20
Gentamicin	75	26	31	54	20	25
Tobramycin	82	26	31	68	25	31
Ciprofloxacin	71	22	27	41	10	15
Cotrimoxazole	54	46	47	52	13	19

Abbreviations: FOX-NS, non-susceptible to cefoxitin; FOX-S, susceptible to cefoxitin.

Table 3. Characteristics of the plasmid-mediated AmpC β -lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates studied

Strains	Location	Source of specimen	Patient type	Age/Sex	Antibiogram*	MHT	PCR type	DDS
<i>E. coli</i>								
CN-14	Gwangju	Urine	IPD	70/F	RIISSSSRR	N	DHA	N
HL-61	Seoul	Peritoneal fluid	ICU	47/M	RRRRSSRSRR	P	CIT	N
HL-91	Seoul	Urine	IPD	82/F	RRRRSSRRRR	P	CIT	N
KS-5	Busan	Wound	IPD	68/F	RRIRISRRRR	P	MOX	P
KY-8	Daejun	Urine	IPD	66/M	RRRISSRSSR	P	MOX	N
PC-5	Kyunggi	Urine	OPD	7/M	RSSSSSSSSR	N	DHA	N
SE-6	Seoul	Urine	IPD	75/M	RRSSSSRRRR	P	MOX	N
WJ-12	Kangwon	Wound	ICU	66/M	RRRRSSRRRR	P	MOX	N
<i>K. pneumoniae</i>								
AJ-5	Kyunggi	Sputum	ICU	1/M	RRRRSSIRRR	P	DHA	N
CN-10	Gwangju	Urine	OPD	4/M	RRISSSSRRR	P	MOX	P
CN-17	Gwangju	Urine	IPD	2/M	RSSSSSSRRR	P	DHA	N
CT-4	Seoul	Wound	IPD	59/M	RSSSSSISS	P	DHA	N
CT-14	Seoul	Sputum	IPD	69/F	RISSSSSSSR	P	DHA	N
CT-16	Seoul	Sputum	IPD	47/F	RISSSSSSSR	P	DHA	N
HL-23	Seoul	Blood	ICU	73/F	RRRRSSSIRR	P	MOX	N
HL-90	Seoul	Urine	IPD	1/M	RSSSSSSRS	P	DHA	N
KS-1	Busan	Wound	IPD	68/M	RRRRSSRRRR	P	DHA	N
KS-16	Busan	Tip	IPD	77/M	RRSSSSSSRR	P	MOX	N
KY-13	Daejun	Urine	IPD	59/F	RRRRSSRRRR	P	DHA	P
KY-16	Daejun	Urine	OPD	65/F	RSSSSSSRRR	P	DHA	N
ND-7	Seoul	Urine	IPD	46/M	RSSSSSSRRR	P	DHA	N
ND-14	Kyunggi	Urine	OPD	2/M	RSSSSSSRRR	P	DHA	N
ND-16	Kangwon	Sputum	ICU	73/M	RRRRSSRSR	P	EBC	N
PC-2	Kyunggi	Urine	OPD	1/M	RRSSSSSSSR	P	MOX	N
SE-6	Seoul	Tip	IPD	68/M	RRRISSRSRR	P	MOX	N
SC-4	Kyungbuk	Sputum	ICU	68/F	RRRRSSRRRR	P	MOX	P
WJ-13	Kangwon	Wound	IPD	41/F	RSSSSSIRRR	P	DHA	N
WJ-15	Kangwon	Urine	IPD	27/F	RISSSSRRRR	P	DHA	N

*cefotaxin/cefotaxime/ceftazidime/aztreonam/cefepime/imipenem/ciprofloxacin/amikacin/gentamicin/tobramycin.

Abbreviations: IPD, inpatient department; OPD, outpatient department; ICU, intensive care unit; M, male; F, female; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; MHT, modified Hodge test; P, positive; N, negative; DDS, double disk synergy test.

*coli*가 12.5% (1/8)이었고 *K. pneumoniae*가 15% (3/20)이었다 (Table 3).

고 찰

*E. coli*와 *K. pneumoniae*는 임상검체에서 가장 흔하게 분리되는 장내세균이지만[14] 이 균주들의 PABL 생성 균주의 빈도에 대한 연구는 매우 드물다. Gazouli 등[15]은 그리스의 10개 병원에서 분리된 2,133주의 *E. coli* 중 63주(3%)가 cefoxitin의 내성기준인 억제대 14 mm 이하라고 하였고, 이중 8주는 외막 단백질 결핍에 의한 것이었고 나머지 55주(2.6%)는 PABL에 의한 내성이었다고 보고하였다. 미국의 일개 병원에서 분리된 1,286주의 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* 중 cefoxitin 디스크에 대한 억제대가 18 mm 이하인 것이 45주(3.5%)이었고 이 중 *E. coli* 11주(1.6%), *K. pneumoniae* 4주(1.1%), *P. mirabilis* 1주(0.4%) 즉, 총 16주(1.2%)가 PABL 생성균주이었다[4]. 저자

들의 경우는 *E. coli*의 49주(9%)와 *K. pneumoniae*의 61주(16.6%)가 cefoxitin 비감수성 균주이었고 이 중 *E. coli* 8주(1.5%)와 *K. pneumoniae* 20주(5.4%)가 PABL 생성균주로 나타나 전체적으로 위의 결과들에 비해 높은 빈도를 보였다. AmpC β -lactamase 비생성균주가 cefoxitin에 내성을 보이는 것은 porin의 결핍에 의한 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 저자들의 경우 cefoxitin에 비감수성인 110주 중 PABL 생성균주인 28주를 제외한 82주는 porin의 결핍에 의한 내성일 것으로 생각된다.

본 연구에서 28주의 PABL 생성균주는 요검체와 입원환자에서 분리된 것이 각각 50%와 82%로 가장 많았다. 이는 PABL 생성균주가 요검체(65%)와 입원환자(57%)에서 가장 흔하게 분리되었다고 보고한 Navarro 등[5]의 보고와 일치하였다.

현재까지 NCCLS 지침에는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 PABL을 검출하는 선별검사나 확인검사가 확립되어있지 않다[17]. Coudron 등[4]은 선별 기준으로 cefoxitin의 억제대 18 mm 미만은, 확인시험으로 3차원 추출시험을 제시하였는데,

cefotaxime 디스크확산법을 이용한 선별법은 cefotaxime의 감수성이 저하된 균주가 45주이었으나 그중 29주(65%)가 PABL 생성균주가 아닌 것으로 나타나 특이도가 매우 낮았다. Cefotaxime의 억제대 기준을 14 mm 이하로 했을 경우에는 PABL 비생성균주가 11주로 줄었으나 2주의 PABL 생성균주를 검출하지 못하였다. 3차원 추출시험은 16주의 PABL 생성균주 모두와 1주의 PABL 비생성균주에서 양성을 보여 유용성이 높았다. 용 등[11]은 PABL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 선별용 시험으로 3차원 추출시험 보다 간편한 방법인 변법 Hodge 시험에 대한 유용성을 분석하였는데, 예민도와 특이도가 각각 100%와 94.9%로 나타나 예민도와 특이도가 각각 100%, 97.4%를 보인 3차원 추출 시험과 비슷한 결과를 보여 변법 Hodge 시험이 간편하고 유용한 선별방법임을 보고하였다. 용 등[11]의 연구는 CMY-1 생성 균주만을 대상으로 하였으나 저자들은 다양한 PABL 유전자형들이 포함된 균주들을 대상으로 변법 Hodge 시험을 시행하였다. 그 결과 위의 연구들과 유사한 결과인 93%의 예민도와 96%의 특이도를 보여 3차원 추출시험의 효소추출 과정이 생략된 변법 Hodge 시험도 PABL 선별검사로 유용함을 다시 한번 입증할 수 있었다.

Perez-Perez와 Hanson[9]은 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* 및 *S. enterica* serovar Typhimurium에 대하여 지금까지 발견된 29종의 PABL 유전자형을 6개 군으로 분류하여 검출할 수 있는 6개 set의 *ampC*-specific primer를 이용한 PCR을 개발하여 그 유용성을 입증한 바 있다. 본 연구에서도 이 방법을 이용하여 PCR을 시행한 결과 *E. coli*는 MOX군 유전자형이 4주로 가장 많았고 CIT와 DHA군 유전자형이 각각 2주씩이었다. *K. pneumoniae*에서는 DHA군 유전자형이 13주로 가장 많았고 MOX와 EBC군 유전자형이 각각 5주와 1주로 나타나 다양한 유전자형이 존재함을 알 수 있었다. PABL은 염색체성 AmpC β -lactamase와는 달리 구성적으로 내성이 표현되는 것이 특징이나 PABL 중 DHA-1과 DHA-2는 유도성(inducible) 내성을 나타내는 것으로 밝혀진 바 있다[18-20]. 이러한 유도성 내성을 검출하는 방법으로 disk antagonism법이 있는데 이는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam 및 cefepime 디스크와 유도 디스크인 clavulanic acid나 cefoxitin 디스크를 25 mm 간격을 두고 하루 밤 배양한 후 cefoxitin이나 clavulanic acid와 마주하는 쪽의 cephalosporin 디스크의 억제대가 D자 모양으로 좁아지면 유도성이 있다는 것을 알 수 있다[20]. 저자들의 경우도 DHA군 유전자형인 균주를 대상으로 disk antagonism 시험을 시행하여 본 결과 모두 양성을 보여 유도성 내성임을 알 수 있었다(미발표 자료).

PABL 생성균주는 amidinopenicillin과 temocillin을 제외한 모든 penicillin제, oximino group (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime)과 7- α -methoxy group (cefotaxime, cefotetan, cefmetazole, moxalactam)의 cephalosporin제에 내성이다. Aztreonam에도 활성이 있으나 MIC가 감수성 범위에 속하는 경우가 종종 있다. Cefepime과 ceftipime은 대부분 감수성이

고 carbapenem제에는 영향을 미치지 못한다[21]. 본 연구에서의 PABL 생성균주는 디스크확산법 상 ampicillin과 cefotaxime에 모두 내성이었다. Cefotaxime, ceftazidime, aztreonam에 대한 감수성 결과는 다양하였으나 이 중 aztreonam에 감수성이 있는 경우가 가장 많았고 aztreonam에 내성이면 cefotaxime과 ceftazidime도 모두 내성이었다. 그러나 DHA군 양성인 15주 중 12주는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam에 모두 감수성 또는 중간이었는데, 이는 프랑스와 대만에서 각각 분리된 바 있는 DHA-1과 DHA-2 생성균주의 결과와 유사하였다[18, 20]. 최근 들어 한 균주가 여러 종류의 ESBL 유전자를 갖고 있는 것은 물론이고 ESBL과 AmpC β -lactamase를 함께 갖고 있는 경우에 관한 보고가 증가하고 있다[22-24]. 이런 경우 이를 검출하는 것이 쉽지 않기 때문에 대부분의 임상미생물검사실에서 지금까지 PABL 생성균주가 실제보다 낮은 빈도로 검출되었다[10]. 저자들의 경우 PABL 생성균주 중 4주가 DDS 시험에 양성을 보여 ESBL을 함께 갖고있는 균주로 생각되었다.

한국은 선진국에 비해 다른 내성균종들과 마찬가지로 PABL 생성균주의 빈도가 높았고 다양한 유전자형들이 분포되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 임상미생물검사실에서는 이 균주에 대한 검출과 병원감염의 관리에 많은 주의가 필요할 것이다

요 약

배경 : Plasmid성 AmpC β -lactamase (PABL)는 β -lactamase에 광범위하게 내성을 나타내어 환자의 치료에 심각한 문제를 초래할 수 있는 cephalosporinase이다. 따라서 PABL 생성균주는 병원감염의 주요 관심대상이 되고 있다. 세계적으로 이 균주의 보고가 증가하고 있으나 한국의 경우 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대한 PABL 생성균주의 빈도와 유전자형의 분포는 아직 잘 모르고 있다.

방법 : 저자들은 한국의 12개 대학병원과 1개의 검사센터에서 총 911주의 연속적이고 중복되지 않게 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 디스크확산법으로 항균제감수성시험을 시행하였다. 변법 Hodge 시험과 PABL 유전자형을 6개군으로 분류하여 검출할 수 있는 multiplex PCR을 시행하여 PABL 생성여부를 검출하였다.

결과 : 총 110주(12.1%)가 cefotaxime에 비감수성이었고 이중 28주(3.1%)가 multiplex PCR 검사상 PABL 생성균주이었다. 균종별로는 544주의 *E. coli*와 367주의 *K. pneumoniae*에서 각각 8주(1.5%)와 20주(5.4%)가 PABL 생성균주이었다. 8주의 *E. coli*에서는 MOX, DHA, CIT군 유전자형이 각각 4, 2, 2주이었고 20주의 *K. pneumoniae*에서는 DHA, MOX, EBC군 유전자형이 각각 13, 6, 1주이었다.

결론 : 이 결과로 한국에서 분리된 PABL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 빈도는 선진국에 비해 높은 편이며 다양한 유전자

형이 분포되어 있음을 알 수 있었다.

감 사

본 연구에 사용된 균주 수집 등에 도움을 주신 건양의대 이종욱 교수님, 네오딘의학연구소 이선화 박사님, 순천향구미병원 안지영 교수님, 원주의대 어영 교수님, 전남의대 신중희 교수님, 포천중문의대 홍성근 교수님께 감사 드립니다.

참고문헌

- Thomson KS and Moland ES. *Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. Microbes Infect* 2000; 2: 1225-35.
- Bush K. *New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085-9.
- Lee SH, Kim JY, Lee GS, Cheon SH, An YJ, Jeong SH, et al. *Characterization of bla_{CMY-1L}, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase gene in a Korean clinical isolate of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 269-73.
- Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. *Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol* 2000; 38: 1791-6.
- Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. *CMY-2-producing Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Proteus mirabilis and Escherichia coli strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 383-9.
- Dunne EF, Fey PD, Kludt P, Reporter R, Mostashari F, Shillam P, et al. *Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant Salmonella infections associated with AmpC β -lactamase. JAMA* 2000; 284: 3151-6.
- Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. *Plasmid-encoded AmpC β -lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? Yonsei Med J* 1998; 39: 520-9.
- Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. *Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-9.
- Perez-Perez FJ and Hanson ND. *Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiology* 2002; 40: 2153-62.
- Thomson KS. *Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. Emerging Infect Dis* 2001; 7: 333-6.
- Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. *Further modification of the Hodge test to screen AmpC β -lactamase (CMY-1)-producing strains of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. J Microbiol Methods* 2002; 51: 407-10.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7th ed., Approved standard M2-A7. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.*
- 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* 1998; 10: 867-78.
- Liu PY, Gur D, Hall MC, Livermore DM. *Survey of the prevalence of β -lactamases amongst 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 429-47.
- Gazouli M, Tzouveleki LS, Vatopoulos AC, Tzelepi E. *Transferable class C β -lactamases in Escherichia coli strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to Citrobacter freundii AmpC β -lactamase. J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 419-25.
- Arduany C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. *Outer membrane profiles of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1636-40.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement, M100-S12. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.*
- Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. *Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from Klebsiella pneumoniae. J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 207-10.
- Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. *Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an ampR gene from Morganella morganii. Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2352-8.
- Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. *Emergence of Klebsiella pneumoniae isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. J Clin Microbiol* 2002; 40: 3121-6.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. *Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
- 김정만, 정석훈, 이상희, 김지혜, 김빛나, 김종철. *임상검체에서 분리된 Escherichia coli와 Klebsiella pneumoniae의 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성현황과 기전. 대한임상미생물학회지* 2002; 5: 6-14.
- Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn

- RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 377-80.
24. Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su IJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1438-42.