

국내 대학병원에서 분리된 *Escherichia coli*의 Extended-spectrum β -Lactamase (ESBL) 현황

이계남 · 김우주¹ · 이연희*

서울여자대학교 생물학과 항생제내성균주은행, ¹고려대학교 의과대학 감염내과

최근 extended-spectrum β -lactamase 생산 임상 균주의 급속한 증가와 확산은 매우 심각한 문제를 야기하고 있다. 이에 국내에서 extended-spectrum β -lactamase 생산 임상 균주의 발생을 파악하고자 국내 한 대학병원에 입원한 환자로부터 대장균을 분리하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 총 233 균주 중 184 균주 (78.9%)가 ampicillin에 대해 내성을 나타냈으며, 80 균주 (34.3%)가 cephalothin에, 93 균주 (39.9%)가 gentamicin에, 64 균주 (27.5%)가 norfloxacin에 대해 내성을 나타내었다. 이중 17 균주 (7.3%)가 double disk synergy test에 의해 양성반응을 나타낸 것으로 확인되었고, 이들에 대해서 6가지 항생제에 대한 최소 억제 농도를 추가적으로 시험한 결과, 13 균주가 4가지 이상의 다른 계열의 항생제에 대한 다중 약제 내성인 것으로 나타났다. Isoelectric focusing gel electrophoresis에 의한 pI 값과 DNA 염기서열을 분석한 결과 5 균주가 TEM-1, 1 균주가 TEM-15, 1 균주가 TEM-20, 4 균주가 TEM-52, 2 균주가 TEM-1과 AmpC, 1 균주가 TEM-1과 OXA-30, 1 균주가 TEM-1과 OXA-33, 1 균주가 TEM-1, CTX-M-3, AmpC, 그리고 1 균주가 AmpC를 생산하는 것으로 나타났으며, SHV를 생산하는 균주는 없었다. 이들의 항생제내성 유전자가 전달되는지 확인한 결과 동물로부터 분리된 대장균 (CCARM No. 1203)에 extended-spectrum β -lactamase 생산 유전자가 전달되는 것을 확인하였다. Random amplified polymorphic DNA와 pulsed field gel electrophoresis 분석을 사용하여 genomic DNA에 대한 유전형질을 분석한 결과 균주간의 유전적 연관성은 매우 낮은 것으로 나타나 한 병원에서 발견되는 균주는 clonal spread에 의한 것이라는 일반적인 보고와 다른 결과를 얻었다.

Key words □ antimicrobial resistance, extended spectrum β -lactamase (ESBL), TEM, OXA, CTX-M, *Escherichia coli*

세균이 항생제에 대한 내성을 획득하는 기전은 매우 다양하다. 이중 β -lactam 항생제에 대한 내성 획득의 가장 중요한 기전은 β -lactamase 생성에 의한 항생제의 불활성화이다(3, 12). Penicillin계 항생제인 ampicillin의 도입 이후 그람음성 세균에 의한 감염증 치료에 광범위하게 사용되어왔던 β -lactam 항생제의 사용은 내성 세균의 출현을 유도하였고, 이들 내성 세균의 치료를 위해서는 보다 강력한 항생제를 개발해야하는 실정에 이르게 되었다. TEM-1, TEM-2, SHV-1 등 broad-spectrum β -lactamase (BSBL) 생성 세균의 감염증 치료를 위해 제3세대 cephalosporin과 aztreonam 등과 같은 광범위 항생제가 사용되고 있다. 이들 광범위 항생제는 BSBL에 안정하며, 세포외막 투과도가 높기 때문에 그람 음성세균에 강한 항균력을 발휘한다. 그러나 이들 광범위 항생제가 임상에서 사용된 후, 전세계적으로 다양한 유형의 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성균주가 분리되고 있으며, 그 빈도는 계속 증가하고 있다(5, 6, 8, 22-26).

TEM 및 SHV형 ESBL은 bla_{TEM-1} , bla_{TEM-2} , bla_{SHV-1} 등 BSBL 유전자의 접변이에 의한 아미노산 치환에 의해서 생성되었다(2,

4). 플라스미드에 의해 매개되는 이들 ESBL은 가수분해 활성범위가 매우 넓은 효소로, 이들은 penicillin, 혈범위 cephalosporin 뿐만 아니라 제 3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등 광범위 항생제도 가수분해하지만, clavulanic acid, sulbactam 등 β -lactamase inhibitor에 의해서는 활성이 억제되는 특징이 있다(15).

ESBL을 생산하는 균주 자체가 숙주의 질병과 직접적인 연관성은 없다할지라도, 대부분의 ESBL 유전자가 플라스미드, 특히 다중 약제 내성(multi-drug resistance, MDR)을 나타내는 플라스미드에 존재하는 경우가 있기 때문에 플라스미드를 매개로한 유전자 전달현상에 의해 내성유전자가 다른 질병에 관련된 균주에 옮겨가게 되는 경우에 매우 심각한 상황에 이르게 된다(19). 이런 경우에는 aminoglycoside계나 fluoroquinolone계 항생제에 내성을 가지게 되어 항생제의 선택이 매우 제한되기 때문에 심각한 상황을 초래하게 된다(24).

최근 국내에서 ESBL을 생산하는 임상균주들이 증가하고 있는 추세에 있다는 보고들이 있다(10, 11, 16, 17). 이에 본 연구에서는 국내 한 대학병원에서 분리된 *E. coli*의 항생제 내성을 조사하고, 이들 중 ESBL 생산 균주를 분리해 내었다. 분리된 균주에 대해서 등전점과 유전자 염기서열을 분석하여 내성유전자의 유전형질을 규명하고, 내성 유전자 전이를 확인하고자 하였으며,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-970-5664, Fax: 02-970-5901
E-mail: yhlee@swu.ac.kr

RAPD와 PFGE를 이용하여 균주의 유전자 구조를 규명하여 이들의 기원이 단독 균주로부터 전파되었는지, 혹은 각각의 균주 자체의 돌연변이 결과인지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

대상 균주

2001년 고려대학교 구로병원에 입원한 환자의 뇨로부터 *E. coli* 233주를 분리하여 시험대상으로 하였다.

최소억제농도 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (13) 기준에 따라서 한천희석법으로 시험하였다. 시험 항생제로는 ampicillin, cephalothin, gentamicin, norfloxacin (Sigma, Louis, MO, USA)를 사용하였다. 특히, β -lactamase와 ESBL 생산균주에 대해서는 추가로 tetracycline, chloramphenicol (Acros, NJ, USA), trimethoprim, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 항생제에 대해서 시험하였다. 순수 배양된 집락을 멸균된 0.85% NaCl 용액에 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞춘 후 각각의 항생제가 0.25~128 μ g/ml 농도로 함유된 Muller-Hinton (MH) 한천배지에 시험균주 10^4 CFU를 접종하였다. 37°C 항온기에 18 시간 배양 후 집락의 증식 양상을 관찰하여 10개 이하의 콜로니가 자란 농도를 최소억제농도로 결정하였다. 결과의 정확성을 위하여 참조 균주 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

ESBL 생성 균주의 검출

NCCLS 기준에 따라 double disk synergy 시험법을 사용하였다. 순수 배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, 0.85% NaCl 용액에 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞추었다. 세균 부유액을 면봉으로 MH 한천배지에 고르게 접종한 후, 일정한 간격을 두고 cefotaxime (30 μ g), cefotaxime과 clavulanic acid (cefotaxime 30 μ g과 clavulanic acid 10 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftazidime과 clavulanic acid (cefotaxime 30 μ g과 clavulanic acid 10 μ g)이 함유된 디스크를 올려놓았다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양한 후 각 항생제 디스크 주위에 생긴 억제대의 크기를 측정하여 NCCLS 기준에 따라 감수성을 판정하였다. 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제환의 확장현상이 5 mm 이상으로 관찰되면 양성으로 판정하였다. 결과의 정확성을 위하여 참조 균주 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

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

β -lactamase의 pI를 측정하기 위해 IEF를 실시하였다. 대수기의 세균을 초음파 파쇄기로 파쇄한 crude extract를 ampholite gel (pH 3.0 to 10.0)에 놓고, Mini IEF 111 apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 100 V에서 15분, 200 V에서 15분, 450 V에서 1시간 전기영동 하였다. Gel에 nitrocefin 용액 (500 μ g/ml)를 떨어뜨려 β -lactamase의 위치를 확인하였고 이를

marker 단백질의 regression curve와 비교하여 pI를 결정하였다.

ESBL 유전자 검출

ESBL를 생산하는 균주를 대상으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 ESBL 유전자 검출 시험을 하였다. 시험에 사용된 프라이머의 염기서열은 Table 1과 같다. 반응은 95°C에서 denaturation 10분, denaturation(95°C 30 초), annealing(TEM과 CTX-M, 46°C 1분; OXA, 49°C 1분; AmpC, 56°C 1분), extension(72°C 1분) 과정을 30회 반복하고, 마지막 단계로 72°C 10분의 과정으로 이루어 졌다. 증폭산물 5 μ l를 1% agarose gel에 전기 영동하여 생산된 DNA 절편을 확인하였다.

ESBL 유전자의 유전형 분석

PCR 증폭 산물을 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)을 이용하여 agarose gel로부터 분리, 정제한 후 dideoxy-mediated chain termination 법에 따라 ABI DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA)로 염기서열을 분석하였다.

접합에 의한 내성 전달

Filter binding 방법으로 내성유전자 전달여부를 시험하였다. Cephalothin에 내성, tetracycline에 감수성인 두 균주(CCARM No. 1336과 1353)를 내성 공여자로 하고, cephalothin에 감수성, tetracycline에 내성인 동물분리 균주(CCARM No. 1203)를 내성 수여자로 사용하였다. 내성 공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (BHI, Difco) 액체배지에 접종하여 하룻밤 진탕 배양 하였다. 공여자 배양액 50 μ l와 수여자 배양액 450 μ l를 새 BHI 액체배지 4.5 ml이 들어있는 시험관에 넣어서 진탕한 후, 1 ml을 0.45 μ m nitrocellulose 여과지 (Milipore, Bedford, MA)에 여과하여 부착시킨 다음 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 배양된 여과지를 1 ml의 새 BHI 액체배지에 넣어 진탕한 후 100 μ l를 취해, cephalothin과 tetracycline 이 함유된 MacConkey 한천배지에 접종하였다. 37°C에서 18시간 배양후 transconjugants를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위하여 transconjugants로부터 TEM-특이 프라이머를 사용하여 PCR를 실시하여 생산된 DNA 절편을 확인하였고, MIC를 평판희석법으로 확인하였다.

Table 1. PCR primers specific to each β -lactamase gene

ESBL	Primer Sequence	Product size (bp)	Reference
TEM	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3'	1,100	17
	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'		
OXA	5'-TCAACTTTCAAGATCGCA-3'	609	21
	5'-GTGTGTTTAGAATGGTGA-3'		
CTX-M	5'-TCGTCCTTCCAGA-3'	1,000	7
	5'-CAGCGCTTTTGCCGCTCTAAG-3'		
AmpC	5'-CTACGGTCTGGCTGCTA-3'	169	14
	5'-TGGAGCAAGAGGCGGTA-3'		

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 이용한 유전자 구조 분석

RAPD 반응액은 genomic DNA 20 ng, 10X reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) 3 µl, sterile H₂O 9.5 µl, 25 mM MgCl₂ 1.5 µl, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphates 2.5 µl, primer (5'- AAGAGCCCTT-3') 2.0 pM, Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 5.0 U으로 제조하였다. PCR 반응은 94°C에서 denaturation 5분, 45회 반복과정의 94°C 1분, 36°C 1분, 72°C 2분, 그리고 마지막 단계 72°C 5분으로 이루어졌다. 반응산물은 1.0% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동한 후 Bioprofile image analysis system (Viber Lourmat, Marnela Vallee, France)을 이용하여 분석하였다.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)를 이용한 유전자 구조 분석

BHI 액체배지에 하룻밤 배양한 배양액을 cell suspension buffer(10mM Tris-Cl, 1 M NaCl, pH 7.6)에 잘 혼합한 후 1% InCert agar (Bio-Rad)를 이용하여 plug를 만들고, 1mg/ml의 lysozyme을 37°C에서 하룻밤 처리하여 세포벽을 용해시켰다. XbaI (MBI Fermentas, Hanover, MD, USA)을 이용하여 genomic DNA를 절단한 후 CHEF DRIII system (Bio-Rad)를 이용하여 14°C에서 6 V/cm로 10-40 초의 pulse time으로 23시간 전기 영동하였다. 결과는 Bioprofile image analysis system을 이용하여 분석하였다.

결 과

임상균주의 항생제 내성 양상

총 233 균주의 임상 *E. coli* 가운데 184 균주(78.9%)는

Table 2. Comparison of antimicrobial susceptibility among 233 clinical isolates of *Escherichia coli*

Antimicrobial agents	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range (µg/ml)
Ampicillin	>128	>128	0.5~>128
Cephalothin	16	>128	<0.25~>128
Gentamicin	4	128	<0.25~>128
Norfloxacin	<0.25	>128	<0.25~>128

ampicillin에 대해 내성을 나타냈으며, 80 균주(34.3%)는 cephalothin에, 93 균주(39.9%) gentamicin에, 그리고 64 균주 (27.5%)는 norfloxacin에 대해 내성을 나타냈다. 이들의 MIC₅₀과 MIC₉₀은 Table 2에 정리하였다. 특히, 7 균주 (3.0%)는 4가지 항생제에 대해 고도내성 (128 µg/ml 이상)을 나타냈다.

Double-disk synergy (DDS) 시험을 통한 ESBL 생산균주의 검출

총 233주의 임상 *E. coli* 중에서 17 균주(7.3%)가 DDS에서 양성반응을 나타냈다. 이들 균주는 ampicillin과 cephalothin에 대해 내성을 나타냈다. 이 중에서 5 균주는 4가지 항생제에 대해 고도내성(128 µg/ml 이상)을 나타냈다. ESBL 생산균주에 대해서 6가지 항생제에 대해 추가적으로 MIC를 측정된 결과(Table 3), 13 균주(76.5%)는 multi-drug resistance (MDR)를 나타내고 있다. 이들 중 4 균주는 cefoxitin에 내성, 9 균주가 cefotaxime에 내성, 14 균주가 ceftazidime에 대해 내성을 나타내었다.

pI에 의한 ESBL 타입

IEF를 실시한 결과 ESBL들은 5.4에서 8.4까지 다양한 pI 값을 나타내었다. pI 8.0을 나타낸 1 균주(CCARM 1343)를 제외한

Table 3. Antimicrobial susceptibilities, pIs, and the types of beta-lactamase and ESBL in urinary isolates of *E. coli*

CCARM No.	MIC (µg/ml)										pIs	Types of beta-lactamase and ESBL		
	Amp ^a	Cep ^b	Gen ^c	Nor ^d	Tet ^e	Chl ^f	Tri ^g	Cef ^h	Ctx ⁱ	Cft ^j				
1333	>128	>128	8	64	2	8	<0.25	8	8	32	5.4		TEM-1	
1334	>128	64	64	64	>128	>128	32	8	<0.25	2	5.4	8.0		AmpC
1335	>128	128	64	0.5	>128	>128	32	8	128	128	5.4	5.9	TEM-1	TEM-52
1336	>128	>128	64	<0.25	4	>128	32	4	16	32	5.4	5.9	TEM-1	TEM-52
1338	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	16	128	128	5.4			TEM-1
1339	>128	>128	>128	1	>128	>128	32	16	32	32		5.9		TEM-52
1340	>128	>128	4	<0.25	2	8	0.5	4	128	128	5.4	8.0		TEM-1 AmpC
1341	>128	>128	>128	>128	>128	8	32	>128	64	64	5.4	8.0		TEM-1 OXA-33
1342	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	4	64	64	5.4			TEM-1
1343	>128	32	>128	>128	>128	>128	32	32	>128	>128		8.0		AmpC
1345	>128	>128	>128	2	>128	>128	32	32	128	128	5.4	5.9		TEM-1
1346	>128	128	64	<0.25	>128	4	<0.25	2	8	8	5.4			TEM-15
1348	>128	>128	128	<0.25	128	8	<0.25	2	32	32	5.4	5.9	TEM-1	TEM-20
1349	>128	>128	>128	>128	128	>128	<0.25	32	64	64	5.4	5.9	7.3	TEM-1 OXA-30
1350	>128	>128	>128	128	>128	>128	32	8	64	64	5.4	8.0	8.4	TEM-1 CTX-M-3 AmpC
1351	>128	64	1	0.5	128	>128	32	2	32	4	5.4			TEM-1
1353	>128	>128	>128	<0.25	2	32	32	8	128	128	5.4	5.9	TEM-1	TEM-52

^aAmpicillin ^bcephalothin; ^cgentamicin; ^dnorfloxacin; ^etetracycline ^fchloramphenicol; ^gtrimethoprim ^hcefoxitin ⁱcefotaxime; ^jceftazidime

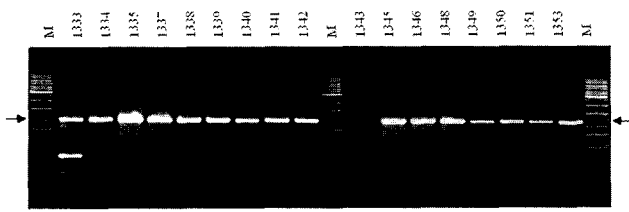


Fig. 1. PCR with specific primer to TEM. M, molecular size marker. Arrows indicate DNA fragment with expected molecular weight (1,100 bp). M, Supercoiled Marker.

16 균주의 pl는 TEM으로 추정되는 5.4와 5.9를 나타내어 이를 PCR로 확인한 결과 TEM으로 확인되었다(Fig. 1). 이들의 pl 값 으로부터 11 균주(64.7%)는 TEM을, 2 균주(11.7%)는 TEM과 AmpC, 2 균주(11.7%)는 TEM과 OXA, 1 균주(5.8%)는 TEM, CTX-M 그리고 AmpC, 1 균주(5.8%)는 AmpC를 생산하는 것으로 추정되었다(Table 4).

ESBL의 유전형

β -lactamase 를 생산하는 유전자를 PCR로 증폭하여 염기서열을 분석한 결과 TEM을 생산하는 것으로 추정된 균주 중 10 균주(58.8%)는 TEM-1, 1 균주(5.9%)는 TEM-15, 1 균주(5.9%)는 TEM-20, 4 균주(23.5%)는 TEM-52를 생산하는 것으로 나타났다. OXA type을 나타내는 두 균주 중 1 균주는 OXA-1과 단 한군데 amino acid만이 다른 OXA-30 [131Arg(AGA) \rightarrow Gly(GGA)]이었고, 1 균주는 OXA-1과 amino acid가 세군데 다른 OXA-33 [48Ala(GCA) \rightarrow Val(GTA), 131Arg(AGA) \rightarrow Gly(GGA), 208Asp(GAT) \rightarrow Glu(GGA)]을 생산하는 것으로 나타났다. CTX-M type ESBL을 생산하는 균주는 염기서열 분석결과 CTX-M-1과 네 군데의 amino acid 가 다른 CTX-M-3 [77Val(GTT) \rightarrow Ala(GCT), 114Asp(GAT) \rightarrow Asn(AAT), 140Ser(TCT) \rightarrow Ala(GCT), 288Asn(AAT) \rightarrow Asp(GAT)]으로 나타났다. AmpC type의 ESBL을 생산하는 균주는 모두 chromosomal AmpC type의 ESBL을 생산하는 것으로 나타났다.

내성유전자의 전달

Table 4. Distribution of beta-lactamase and ESBLs produced by clinical isolates of *E. coli*

β -Lactamase and ESBL type	No. of isolates
TEM-1	5
TEM-15	1
TEM-20	1
TEM-52	4
TEM-1 + AmpC	2
TEM-1 + OXA-30	1
TEM-1 + OXA-33	1
TEM-1 + CTX-M-3 + AmpC	1
AmpC	1
Total	17

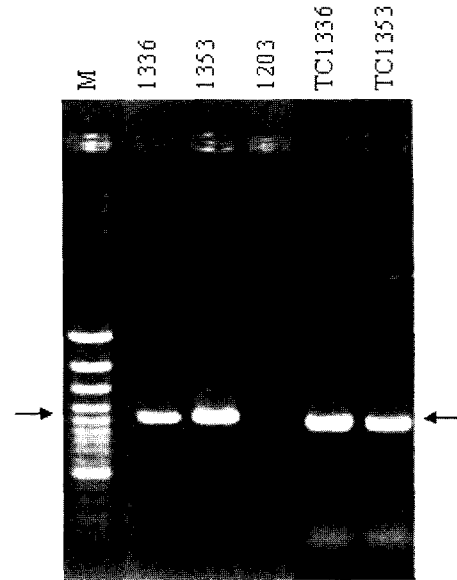


Fig. 2. PCR for transconjugants with specific primer to TEM. M, molecular size marker. Arrows indicate DNA fragment with expected molecular weight (1,100 bp).

내성유전자가 사람분리 균주 간에 뿐만 아니라 동물 분리 균주로 전달된다면 이는 급속한 항생제 내성 확산의 문제를 야기할 수 있기 때문에 심각한 문제가 아닐수 없다. 이에 filter mating 방법에 의해 TEM 유전자가 동물분리주인 *E. coli*(CCARM No. 1203)에 전달되는 것이 PCR로 확인되었으며(Fig. 2) 이들 transconjugants의 항생제에 대한 억제최소농도는 Table 5와 같다. TC1336에서는 TEM 유전자 뿐만 아니라 항생제 내성 유전자도 함께 전달되었던 반면, TC1353에서는 항생제 내성 유전자가 전달되지 않은 것으로 나타났다.

RAPD와 PFGE를 이용한 유전자 구조 분석

RAPD와 PFGE 패턴을 통해 유전자 구조를 분석한 결과 ESBL을 생산하는 *E. coli* 17 균주들은 균주 간에 연관성이 매우 낮은 것으로 나타났다(Fig. 3). RAPD 결과뿐만 아니라, PFGE 결과 역시 이들 균주 간에 유사성은 매우 낮은 반면에 다양성이 매우 높은 것으로 나타나 이들이 clonal spread의 결과가 아닌 것으로 확인됐다(Fig. 4).

고 찰

β -Lactam 항생제는 사람과 동물의 *Enterobacteriaceae*에 의한 감염증 치료에 가장 많이 사용되고 있는 항생제이다(1, 20). 이로 인해 사람과 동물에서 내성균의 유도가 증가되고 있고, 최근에는 특히 이들 내성균을 치료하기 위한 새로운 항생제를 분해하는 ESBL을 생산하는 균주가 증가되고 있어 임상에서 매우 심각한 문제로 대두되고 있다(18). 최근 우리나라 임상에서 발견되는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 ESBL을 생산하는 균주가 매년 증가하고 있는 추세에 있어 1997년에 4.8%에서 1993~1998 사이

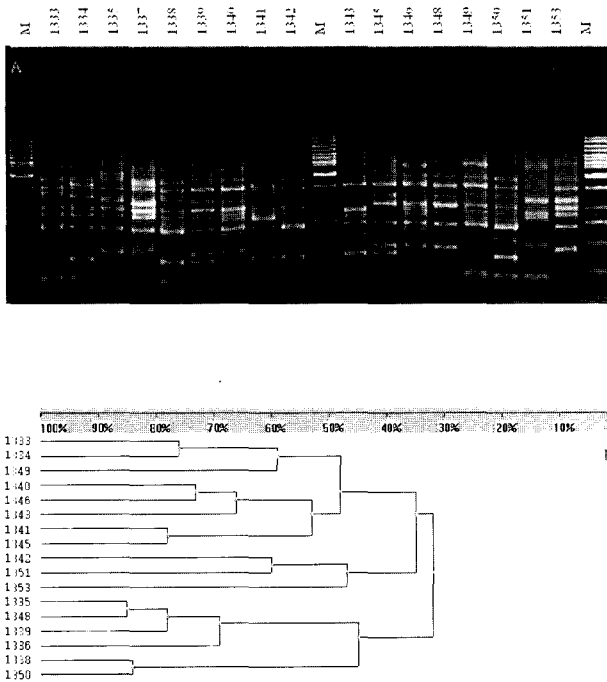


Fig. 3. RAPD pattern of genomic DNA of isolates (A) and their phylogeny (B). M, molecular size marker.

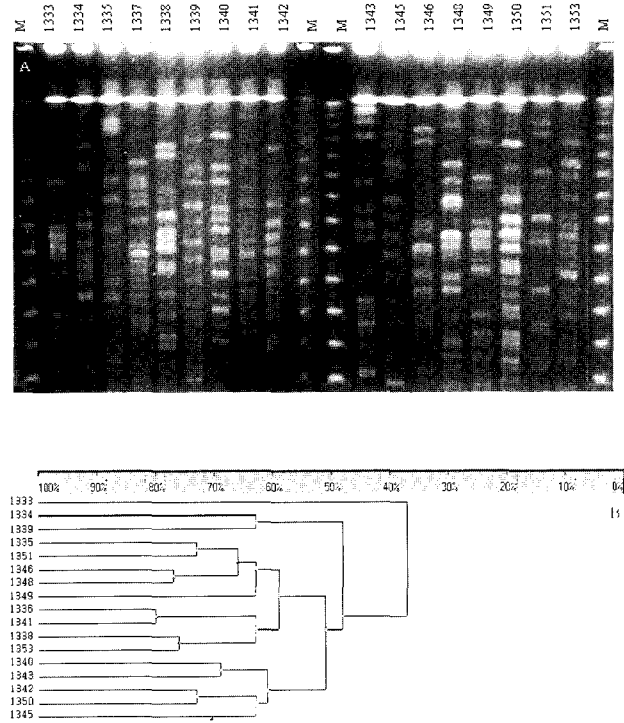


Fig. 4. PFGE pattern of genomic DNA digested with *Xba*I (A) and their phylogeny (B). M, lambda marker.

17.9%로, 그리고 2002년에는 19.8%로 증가되었다(9, 10, 17). 본 연구에서 2001년도에 국내 한 대학병원에 입원한 환자를 대상으로 분리한 *E. coli* 중 ESBL을 생산하는 균주의 비율은 4.8%로 기존의 보고와는 달리 ESBL 생산 균주의 발생율이 비교적 낮은 것으로 나타났다. 이는 하나의 대학 병원을 대상으로 시험하였기 때문에 국내의 전체적인 발생을 이라고 보기는 어려울 것으로 생각된다. ESBL 생산 균주에 의한 감염증은 치료제의 선택이 어려워지게 되어, 치료의 실패율을 증가시킬 수 있고, 이로 인해 환자의 입원 기간이 연장되며, 질병의 진단과 치료에 보다 더 강력한 항생제의 사용이 요구된다.

우리나라에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 가장 보편적으로 발견되고 있는 ESBL은 TEM과 SHV 타입이다. 특히 TEM 타입 중에서는 TEM-1, TEM-20, TEM-52가 가장 보편적으로 발견되고 있고, SHV에서는 SHV-2a와 SHV-12가 가장 많이 발견되는 것으로 보고 되어있다(9-11, 16-17). 본 연구의 결과에서는 TEM-1, TEM-52, TEM-15와 TEM-20의 순으로 나타났다.

특히 하나의 효소만을 생산하는 균주 외에 두 가지 이상의 효소를 동시에 생산하는 균주도 있었는데, 이들의 특징은 TEM-1과 함께 다른 효소를 동시에 생산하는 것으로 나타났다. 이들은 각각 OXA-30, OXA-33, 그리고 CTX-M-3형인 것으로 확인되었다.

이와 아울러 최근 플라스미드에 매개되는 AmpC 타입의 발견으로 임상에서 심각한 문제를 야기하고 있는 CMY, MOX, FOX 등 AmpC 타입의 생산 여부를 확인한 결과 플라스미드를 매개로 한 AmpC 타입은 발견되지 않았고, 본 연구에서 나타난 AmpC는 모두 크로모솜에 의한 것으로 나타났다. 그러나 기존의 보고와는 달리 본 연구에 사용된 균주 중 SHV를 생산하는 균주는 발견되지 않았다.

균주가 ESBL을 생산하게 되는 여러 가지 원인 중 대부분이 ESBL 생산 균주의 clonal spread인 것으로 알려져 있지만 최근에는 플라스미드에 의한 유전자의 전달 결과로 인한 전파 때문인 경우도 보고 되고 있다(7). *Gniadkowski et al.*(7)의 보고에 의

Table 5. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* clinical isolates, animal isolate, and their transconjugants

CCAMR No.	Amp ^a	Azt ^b	Cep ^c	Cfz ^d	Cft ^e	Cfx ^f	Gen ^g	Nor ^h	Tet ⁱ	Chl ^j	Tri ^k
1336	>128	2	64	128	32	2	32	0.5	8	>128	>128
1353	>128	4	>128	>128	128	4	64	<0.25	8	32	>128
1203 ^l	4	<0.25	16	0.5	<0.25	4	8	0.5	>128	2	<0.25
TC ^m 1336	>128	2	32	128	128	2	32	0.5	>128	>128	>128
TC1353	>128	<0.25	32	2	<0.25	2	64	0.5	>128	32	>128

^aAmpicillin; ^baztreonam; ^ccephalothin; ^dceftazidime; ^ecefotaxime; ^fcefexitin; ^ggentamicin; ^hnorfloxacin; ⁱtetracyclin; ^jchloromphenicol; ^ktrimethoprim; ^lanimal isolate of *E. coli* used for recipient bacteria; ^mtransconjugant

하면 폴란드의 같은 병원에서 발견된 ESBL 생산 균주의 경우 일부는 clonal spread에 의한 것으로 확인되었고, 이와 함께 ESBL 유전자를 가진 플라스미드의 전파에 의한 것이 함께 발견되었다. 국내에서 발견된 균주의 경우에는 플라스미드에 의한 ESBL 생산 유전자의 전파로 보고되어 있다(17).

이에 본 연구에 사용된 균주의 ESBL 생산 원인이 clonal spread 인지 혹은 균주 간 플라스미드에 의한 유전자 전달로 인한 결과인지 확인하고자 하여, RAPD와 PFGE를 실시하여 유전자형을 분석한 결과 균주 간의 유사성이 매우 낮은 것으로 나타났다. 이로부터 같은 병원 내에서 분리된 균주 간에도 유사성이 매우 낮은 것은 그 기원이 균주간의 clonal spread에 의한 것이 아니라, 플라스미드에 의한 유전자 전달 등을 통한 전파에 의한 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서 유전자 전이 실험을 시행한 결과 플라스미드를 매개로 한 유전자 전이가 일어나는 것으로 확인되었다. 특히 본 연구의 결과에서 사람으로부터 분리된 균주로부터 동물 분리 균주에 그 유전자를 전달하는 것으로 나타나 사람 간 또는 동물 간의 유전자 전달 뿐만 아니라, 사람과 동물 간의 직접적 또는 간접적인 접촉에 의해서도 유전자 전달에 의한 ESBL의 전파와 확산이 일어날 수 있는 여지가 있어 매우 심각한 문제가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림부(201102-3)와 보건복지부(03-PJI-PGI-CH03-0002)지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Bonnet, R., C. Chanal, E. Ageron, D. Sirot, C. De Champs, P. Grimont, and J. Sirot. 2002. Inducible AmpC β -lactamase of a new member *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3316-3319.
- Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century. *Clin. Microbiol. Rev.* 114, 933-951.
- Brinas, L., M. Zarazaga, Y. Senz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002. β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 246, 3156-3163.
- Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
- De Champs, C., D. Sirot, C. Chanal, R. Bonnet, J. Sirot, and the French Study Group. 2000. A 1998 Survey of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3177-3179.
- Emery, C.L. and L.A. Weymouth. 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2061-2067.
- Gniadkowski, M. and W. Hryniewicz. 1998. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3079-3085.
- Gniadkowski, M., I. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, and A. Bauernfeind. 1998. 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.* 42, 827-832.
- Jeong, S. H., I. K. Bac, S. G. Sohn, G. H. Kang, G. J. Jeon, Y. H. Kim, B. C. Jeong, and S. H. Lee. 2004. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2902-2906.
- Kim, Y.K., H. Pai, H.J. Lee, S.E. Park, E.H. Choi, J. Kim, J.H. Kim, and E.C. Kim. 2002. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1481-1491.
- Lee, S.H., J.Y. Kim, S.H. Shin, Y.J. An, Y.W. Choi, Y.C. Jung, H.I. Jung, E.S. Sohn, S.H. Jeong, and K.J. Lee. 2003. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type β -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2477-2482.
- Livermore, D.M. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard-Fifth Edition. NCCLS. 20, 7-10.
- Nelson, E.C., and B.G. Elisha. 1999. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 957-959.
- Oliver, A., M. Prez-Vzquez, M. Martinez-Ferrer, F. Baquero, L. De Rafael, and R. Canton. 1999. Ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanate susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates with different β -lactam resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 862-867.
- Pai, H., H.J. Lee, E.H. Choi, J. Kim, and G.A. Jacoby. 2001. Evolution of TEM-related extended-spectrum β -lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3651-3653.
- Pai, H., S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim, Y. Kwon, J.W. Kim, and K.W. Choe. 1999. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.
- Perilli, M., E. Dell'Amico, B. Segatore, M.R. De Massis, C. Bianchi, F. Luzzaro, G.M. Rossolini, A. Toniolo, G. Nicoletti, and G. Amicosante. 2002. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 40, 611-614.
- Philippon, A., G. Arlet, and G.A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1-11.
- Pitout, J.D., M.D. Reisbig, E.C. Venter, D.L. Church, and N.D. Hanson. 2003. Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3933-3935.
- Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneu-*

- moniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 15-22.
22. Siu, L.K., P.L. Lu, J.Y. Chen, F.M. Lin, and S.C. Chang. 2003. High-level expression of AmpC β -lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: Cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2138-2144.
23. Spanu, T., F. Luzzaro, M. Perilli, G. Amicosante, A. Toniolo, G. Fadda, and The Italian ESBL study group. 2002. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for resistance to β -lactamase and other antimicrobial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 196-202.
24. Sturenburg, E., D. Mack. 2003. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect.* 47, 273-295.
25. Yan, J.J., W.C. Ko, S.H. Tsai, H.M. Wu, Y.T. Jin, and J.J. Wu. 2000. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4320-4325.
26. Zhou, X.Y., F. Bordon, D. Sirot, M.D. Kitzis, and L. Gutmann. 1994. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 beta-lactamase conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1085-1089.

(Received August 9, 2004/Accepted December 6, 2004)

ABSTRACT : Prevalence of Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital, Korea

Kyenam Lee, Woo-Joo Kim¹, and Yeonhee Lee*(Department of Biology and Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea, ¹Department of Infectious Diseases, Kuro Hospital, Korea University, Seoul 152-703, Korea)

Recently, the rapid increase and global spread of extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates has become a serious problem. The incidence of extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* in Korea and susceptibility to antimicrobial agents were investigated. Total 233 isolates of *E. coli* were obtained from urine from hospitalized patients in Guro hospital, Korea University in 2001. One hundred and eighty four isolates (78.9%) were resistant to ampicillin, 80 isolates (34.3%) were resistant to cephalothin, 93 isolates (39.9%) were resistant to gentamicin, and 64 isolates (27.5%) were resistant to norfloxacin. Among 233 isolates, 17 isolates (7.3%) were positive as determined by the double disk synergy test. When minimal inhibitory concentrations were assayed with additional 6 antimicrobial agents, 13 isolates (76.5%) were multi-drug resistant to at least four different class antimicrobial agents. Extended-spectrum β -lactamases were characterized with isoelectric focusing gel electrophoresis and DNA sequencing. They were TEM-1 in 5 isolates, TEM-15 in 1 isolate, TEM-20 in 1 isolate, TEM-52 in 4 isolates, TEM-1 and AmpC in 2 isolates, TEM-1 and OXA-30 in 1 isolate, TEM-1 and OXA-33 in 1 isolate, TEM-1, CTX-M-3, and AmpC in 1 isolate, but SHV was not detected. Antimicrobial resistance genes were transferred to animal isolate of *E. coli* (CCARM No. 1203) by the filter mating method. Extended spectrum β -lactamase producers studied in the current study have low correlation to each other as determined by random amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis. This is a contradictory result from the general hypothesis that extended-spectrum β -lactamase producers in one hospital is a result from a clonal spread.