

대구지역에서 분리된 Extended-Spectrum β -Lactamase를 생성하는 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 분자역학적 분석

류남희 · 전동석 · 김재룡 · 전창호¹ · 서현석¹

계명대학교 의과대학 진단검사의학교실, 대구가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실¹

Molecuolepidemiological Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains in Daegu

Nam Hee Ryoo, M.D., Dong Seok Jeon, M.D., Jae Ryong Kim, M.D., Chang Ho Jeon, M.D.¹, and Hun Suk Suh, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine, Keimyung University College of Medicine; Department of Laboratory Medicine¹, Daegu-Catholic University College of Medicine, Daegu, Korea

Background : The importance of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) produced in gram-negative bacilli is now well recognized, but most clinical laboratories have problems in detecting and interpreting ESBL and implicating the findings in nosocomial infections caused by ESBL producing gram-negative bacilli. The present study aims primarily to evaluate the distributions of these enzymes among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, the most frequent isolates of Enterobacteriaceae producing ESBL, to differentiate the types of enzymes in these isolates and finally to relate the clonality of specific types within a part of Daegu city.

Methods : The clinical isolates of 1,242 *E. coli* and 859 *K. pneumoniae* were screened for ESBL production by the disk diffusion method of the National Committee of Clinical Laboratory Standard, and it was confirmed by the double-disk synergy test (DDS). Antimicrobial susceptibility test was performed by the agar dilution method. The presence of β -lactamase was tested by polymerase chain reaction (PCR) and plasmid analysis. Isoelectric focusing and nucleotide sequence analysis were performed to evaluate ESBL types. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Xba*I-digested DNA fragments was carried out to determine the extend of clonality within the hospital.

Results : Of 34 isolates of *E. coli* and 31 isolates of *K. pneumoniae* randomly selected from those isolates screened for ESBL production were further tested by DDS to confirm its production: 30 (88.2%) *E. coli* and 29 (93.5%) *K. pneumoniae* were positive. TEM-52 and SHV-12 were present both in *E. coli* and *K. pneumoniae*, but SHV-2a was distributed only in *K. pneumoniae*. The resistance was transferable in 66.7% of *E. coli* and 68.9% of *K. pneumoniae*. Six and 5 PFGE patterns were shown by *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively. Among the 5 patterns of *K. pneumoniae*, type B was dominant, suggesting a clonal outbreak in the hospital.

Conclusions : The ESBL specific enzyme types were TEM-52, SHV-2a and SHV-12. Despite many different PFGE patterns of the ESBL producing isolates, a few outbreak and endemic clones appear to be prevalent in Dongsan Medical Center. (Korean J Lab Med 2004; 24: 96-106)

Key Words : Extended-spectrum β -lactamase, Double disk synergy test, TEM, SHV

접 수 : 2003년 10월 21일
수정본접수 : 2004년 1월 12일
교 신 저 자 : 류 남 희

접수번호 : KJCP1720

서 론

우 700-712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 동산의료원 진단검사의학과
전화 : 053-250-7950, Fax : 053-250-7275
E-mail : nhryoo@dsmc.or.kr

그람음성세균의 감염증에는 많은 β -lactam 제제가 임상적으로 사용되어 왔으나 항균제 사용량이 증가함으로 내성세균이 증

가하게 되었다. 특히 이들 내성세균에서 내성을 획득하는 기전은 β -lactamase를 생성하여 항균제의 불활성화를 초래하는 것이다 [1]. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)는 carbapenem과 cephamycin을 제외한 거의 대부분의 β -lactam 항균제를 가수분해하며 기존의 TEM-1, TEM-2 또는 SHV-1 유전자의 아미노산 중 1-4개가 점 돌연변이를 일으켜 다른 아미노산으로 치환됨으로 여러 효소로 진화되고 더 넓은 내성범위를 가지게 되었다 [2, 3]. ESBL은 효소 유전자의 분자구조에 따른 분류로 A 군, Bush 등의 효소 기질특이성과 억제 특이성에 따른 분류로 2be군에 속하며, 그 유형은 현재까지 150종 이상 발견되고 있다 [4-6]. ESBL은 나라마다 종류가 다양하게 보고되며 또한 그 나라의 지역 내에서도 효소의 종류, 작용과 염기서열에 따른 점 변이의 분포가 다르기 때문에 많은 연구가 되고 있다 [7-9].

이에 본 연구는 아직 조사가 되지 못한 대구지역내 3차 종합병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 균주에 대해 National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 선별기준 [10]에 따른 항균제 감수성 양성, ESBL의 생성률, ESBL의 종류를 알아보고자 하였고 원내에 토착형의 유무를 조사하였다. 아울러, 그로 인한 적합한 항균제의 선택과 사용을 유도하여 적절한 치료를 가능하게 함으로서 ESBL이 분리된 환자에 대한 원내 감염관리에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

2000년 12월 21일부터 2001년 10월 20일까지 계명대학교 동산의료원 진단검사의학과 미생물검사실로 배양검사가 의뢰되어 임상 검체에서 *E. coli*와 *K. pneumoniae*로 분리 및 동정된 일련의 1,242주와 859주 중, 2001년 NCCLS 기준에 따른 디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 검사상 cefotaxime, aztreonam과 ceftazidime에 대해 각각 27, 27 및 22 mm 이하의 감수성을 보이는 균을 선별한 후 20% 탈지유 배지에 부유하여 -20°C에 보관하였다.

2. 한천배지 희석법을 이용한 항균제 감수성 검사

보관균주 중 중복검체와 소실검체를 제외하고 무작위로 선정된 *E. coli* 34주와 *K. pneumoniae* 31주를 McConkey 배지에 계대배양하여 35°C 항온기에서 하룻 밤 배양한 후, lactose를 분해하는 분홍색 집락을 선택하여 NCCLS 기준에 따라 한천배지 희석법을 이용한 감수성검사를 실시하였다. 항균제는 ampicillin, aztreonam, cephalothin, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime 및 imipenem이며 농도는 0.5 μ g/mL에서 512 μ g/mL로 하였다.

3. ESBL 생성 유무의 확인을 위한 이중 디스크 상승 효과 검사

상기 무작위로 선정한 *E. coli* 34주와 *K. pneumoniae* 31주에 대해 항균제 감수성 검사를 실시하여 cefotaxime의 MIC가 2 μ g/mL 이상인 균주를 대상으로 ESBL 생성 확인검사인 이중 디스크 상승 효과 검사(double disk synergy test, DDS)를 실시하였다. 평판 중앙에는 amoxicillin/clavulanic acid 디스크(20 μ g/10 μ g, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)를 놓고, 그 가장 자리에서 20 mm 간격으로 되게 30 μ g의 cefotaxime, ceftazidime 그리고 aztreonam 디스크를 놓았다. DDS 결과는 amoxicillin/clavulanic acid 디스크로 인해 cefotaxime, ceftazidime 또는 aztreonam의 억제대가 커지거나 디스크 사이에 억제대가 생겼을 때를 양성으로 판정하였다.

4. 접합에 의한 내성 전달 검사

Grant 등 [11]의 방법을 변형하여 *E. coli* 34주 중 DDS 검사 결과 양성인 30주와 *K. pneumoniae* 31주 중 DDS 양성인 29주를 대상으로 접합에 의한 내성 전달검사를 실시하였다. 임상검체에서 분리된 균주와 계명의대 미생물학 교실에서 분양받은 피전달균주 *E. coli* RG 488을 각각 trypticase soy 액체배지에 접종하여 35°C에서 하룻 밤 배양시켰다. 다음 날 각각의 임상분리주와 피전달균주가 배양된 trypticase soy 액체배지에서 배양액 0.5 mL씩을 따로 5 mL trypticase soy 액체배지에 첨가하여 35°C 진동수조에서 3시간동안 배양시켰다. 배양된 증균액을 임상분리주와 피전달균주가 1:4의 비율로 되게 혼합하여 35°C 배양기에 하룻 밤 배양하였다. 임상분리주가 내성을 나타내는 항균제가 8 μ g/mL씩 그리고 피전달균주가 내성을 나타내는 rifampin 50 μ g/mL씩을 첨가하여 MH 배지를 제조하였다. 혼합 배양된 균액을 제조된 배지에 접종하여 35°C 배양기에 하룻 밤 배양하였다. 다음 날, 증식된 집락을 선택하여 MacConkey 배지에 계대배양하였으며 lactose를 비발효하면서 cefotaxime 디스크로 항균제 감수성을 시험하여 직경 27 mm 이하의 결과를 보일 경우 피전달균주에 내성이 전달된 것으로 판독하였다.

5. 플라스미드 분석 검사

상기의 대상균주를 각각 Luria-Bertani (LB) 액체배지가 든 시험관에 넣고 하룻 밤 흔들면서 배양하였고 배양액을 2-3회에 걸쳐 1.5 mL E-tube에 넣고 원심분리하여 침전물을 취한 후, RNase 50 μ g/mL가 함유된 차가운 제 1용액(0.9% glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0))을 넣고 잘 풀어주었다. 당일 제조한 제 2용액(0.2 N NaOH, 1% SDS, 증류수)을 넣고 뒤집어 섞은 후 얼음물에 5분 동안 담가둔 후 원심분리하였다. 차가운 제 3용액(3 M Potassium-acetate, glacial acetic acid, 증류

수)를 넣고 잘 섞은 후 얼음물에 5분 동안 담가둔 후 다시 원심 분리하였다. 상층액을 E-tube에 옮기고 동량의 phenol/chloroform 을 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리하고 상층액을 옮겼다. 새로 옮긴 상층액에 chloroform/isoamylalcohol을 첨가하고 원심분리하여 다시 상층액을 새 E-tube에 옮긴 후 차가운 100% ethanol을 첨가하여 잘 섞었다. 실온에 5-10분 둔 후 다시 원심분리하여 상층액은 버리고 70% ethanol로 섞었다. 원심분리하여 상층액을 버리고 잘 말린 다음 40-50 μ L의 증류수로 완전히 녹였다. 플라즈미드는 ethidium bromide로 염색하여 1% 한천 겔에 40 V로 2시간 전기영동하여 관찰하였다[12].

6. 중합효소 연쇄반응에 의한 ESBL 효소형 감별 검사

Muller Hinton (MH) 배지에서 하룻 밤 배양된 집락을 멸균 증류수에 부유시켜 10분간 끓여 DNA를 추출하였고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상층액 1 μ L를 주형으로 사용하였다. TEM 특이 시발체는 sense 5'-ATAAAATTCTTGAAGAC-GAAA-3'와 antisense 5'-GACAGTTACCAATGCTTAA-TC-3'을 이용하였고 SHV 특이 시발체는 sense 5'-CGGCCCC-GCAGGATTGACT-3'와 antisense 5'-TCCCGGCGATTT-GCTGATTTTC-3'을 사용하였다[13, 14]. 반응조건은 10 mM Tris-HCl (pH 7.4); 5.0 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 200 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각 시발체 0.5 μ M; 2.5 Unit Taq polymerase (AmpliTaq[®] DNA polymerase, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)로 하였다. TEM의 반응시간은 94°C에서 30초 denaturation, 45°C에서 90초 annealing, 72°C에서 60초 extension 반응을, SHV는 94°C에서 30초 denaturation, 54°C에서 30초 annealing, 72°C에서 60초 extension의 과정 35회 반복을 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)을 이용하여 실시하였고, 증폭 산물 10 μ L를 1.0% 한천 겔에 전기영동하여(Mupid-2, COSMO BIO, Co. Ltd., Tokyo, Japan) 각각 1,080 bp와 410 bp에서 산물이 생기는지 확인하였다.

7. 등전점 시험

TEM과 SHV PCR 검사를 실시한 *E. coli* 12주와 *K. pneumoniae* 14균주를 대상으로 실험을 하였다. MH 배지에 배양된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 증류수에 부유하여 1회 세척한 다음 다시 증류수에 부유하여 sonicator (Vibra Cell, Sonics & Material Inc, Danbury, CT, USA)로 10초간 8회 분쇄하였다. 이때 control로 사용될 TEM-1 (pI 5.4)를 생성하는 *E. coli*도 같이 분쇄하였다. 원심분리(12,000 rpm, 10분) 후, 상층액을 동량의 loading buffer와 섞어서 10 μ L를 5% Precast polyacrylamide 겔(pH 3-10)(Novex Experimental Technology, San Diego, CA, USA)의 홈에 넣고 ThermoFlow ETC unit (Novex Ex-

perimental Technology, San Diego, CA, USA)로 100 V에서 1시간, 200 V에서 2시간, 500 V에서 30분간 전기영동하였다. 전기영동 후 겔은 30 mM N-(acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid-NaOH buffer (pH7.0)에 nitrocefin 0.7 mg/mL (Unipath Ltd, Basingstoke, United Kingdom)이 함유된 용액에 적신 필터종이와 함께 발색시켜 판독하였다[15].

8. 염색체 DNA의 pulsed-field gel electrophoresis

시험세균을 준비하여 한천 plug를 만들었고 제한효소 *Xba*I (Takara Biotechnology, Shiga, Japan)으로 처리하여 6 V/cm, switch time 0.5-60초로 20시간 contour-clamped homogeneous field machine (CHEF-DRII, Bio-Rad Laboratories)으로 전기영동하였다[16]. 1 μ g/mL ethidium bromide 용액으로 30분간 염색 후, 20분간 탈색하였고, 자외선 조영하에서 PHC 34 Photoman camera (Polaroid, Cambridge, MA, USA)로 촬영하였다. 결과의 판독은 Uniband/Map software (Uvitech Ltd., Cambridge, United Kingdom) 프로그램을 이용하였고 Tenover 등의 방법에 따라 해석하였다[17].

9. β -lactamase 유전자 DNA의 염기서열 분석

PCR에서 얻어진 산물은 Montage Kit (Millipore Company, Bedford, MA, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제산물은 dideoxy chain termination법으로 3100 DNA sequencer 기기를 (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA) 이용하여 염기서열 결정에 사용하였다[18].

결 과

1. 제 3세대 cephalosporin에 대한 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 평균 내성률

연구기간동안 분리된 *E. coli* 1,242주의 aztreonam, ceftazidime 및 cefotaxime에 대한 내성률은 각각 16%, 15% 및 16%이었으며, *K. pneumoniae*는 각각 12%, 14%와 19%이었다.

2. 한천배지희석법을 이용한 항균제 감수성 결과

보관균주 중 무작위로 선정된 *E. coli* 34주와 *K. pneumoniae* 31주는 aztreonam, ceftazidime 또는 cefotaxime에 대해 적어도 한 가지 이상의 항균제에 2 μ g/mL 이상의 MIC를 보여 선별기준을 만족시켰다. 또한, 모든 균주에서 ampicillin과 cephalothin에 대해 각각 ≥ 512 μ g/mL과 64- ≥ 512 μ g/mL의 내성을 보였다. Cefoxitin에 대해서는 2- ≥ 512 μ g/mL까지 다양한 결과를

Table 1. Antimicrobial susceptibility test results of *E. coli* screened by NCCLS extended-spectrum β -lactamase screening guidelines and the results of double-disk synergy test

Strains	MIC (μ g/mL) for clinical isolates (n=34)							DDS
	AMP	AZT	CFX	CTX	CPH	CAZ	IMP	
ECO1	>512	1	32	4	128	1	1	-
ECO3	>512	4	4	16	128	16	<0.5	+
ECO4	>512	2	>512	128	>512	16	<0.5	+
ECO5	>512	1	4	64	>512	<0.5	<0.5	+
ECO6	>512	256	256	16	>512	64	<0.5	+
ECO7	>512	64	8	512	>512	16	<0.5	+
ECO10	>512	4	>512	16	>512	1	1	+
ECO11	>512	32	32	512	512	128	<0.5	+
ECO12	>512	>512	8	128	>512	>512	<0.5	+
ECO13	>512	64	1	512	>512	8	<0.5	+
ECO14	>512	64	1	512	>512	8	<0.5	+
ECO15	>512	64	32	128	>512	8	<0.5	+
ECO16	>512	8	64	16	>512	8	2	+
ECO17	>512	16	128	16	>512	16	<0.5	+
ECO18	>512	64	128	128	>512	128	<0.5	+
ECO19	>512	128	32	>512	>512	16	<0.5	-
ECO20	>512	128	256	16	>512	16	<0.5	+
ECO21	>512	128	16	512	>512	128	<0.5	+
ECO22	>512	8	16	16	>512	1	<0.5	+
ECO23	>512	64	4	512	>512	128	1	+
ECO24	>512	32	8	256	>512	4	<0.5	+
ECO25	>512	4	4	64	>512	1	<0.5	+
ECO26	>512	8	8	128	512	4	<0.5	+
ECO27	>512	64	4	8	512	32	<0.5	+
ECO28	>512	4	4	8	128	8	<0.5	+
ECO29	>512	8	128	32	>512	16	<0.5	-
ECO30	>512	8	4	256	>512	1	<0.5	+
ECO31	>512	4	64	64	256	16	1	+
ECO33	>512	64	4	128	>512	<0.5	<0.5	+
ECO34	>512	256	8	128	>512	128	<0.5	+
ECO35	>512	32	4	128	>512	64	<0.5	+
ECO37	>512	65	4	128	>512	16	<0.5	+
ECO39	>512	4	512	8	>512	32	<0.5	-
ECO40	>512	4	2	8	64	32	<0.5	+
MIC ₅₀	>512	32	16	128	>512	16	<0.5	
MIC ₉₀	>512	128	256	512	>512	128	<0.5	

Abbreviations: NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; ECO, *E. coli*; AMP, ampicillin; AZT, aztreonam; CFX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CPH, cephalothin; CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; DDS, double-disk synergy test.

보였으며 imipenem에 대해서는 모두 $\leq 4 \mu$ g/mL의 감수성을 보였다(Table 1, 2).

3. 이중 디스크 상승 효과 검사 결과

ESBL 생성 확인을 위하여 amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam, ceftazidime 그리고 cefotaxime 디스크를 이용하여 실시된 DDS 검사 결과, *E. coli* 34주 중 30주(88.2%)가 양성되었고 *K. pneumoniae* 31주 중 29주(93.5%)에서 양성을 보였다(Table 1, 2).

Table 2. Antimicrobial susceptibility test results of *K. pneumoniae* screened by NCCLS extended-spectrum β -lactamase screening guidelines and the results of double-disk synergy test

Strains	MIC (μ g/mL) for clinical isolates (n=31)							DDS
	AMP	AZT	CFX	CTX	CPH	CAZ	IMP	
KPN1	>512	128	512	>512	>512	32	<0.5	-
KPN2	>512	128	8	32	>512	8	<0.5	+
KPN3	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
KPN4	>512	8	4	65	>512	32	<0.5	+
KPN5	>512	8	4	128	512	2	<0.5	+
KPN6	>512	16	256	32	256	32	<0.5	+
KPN7	>512	8	4	128	>512	4	<0.5	+
KPN8	>512	8	4	16	512	32	<0.5	+
KPN9	>512	8	4	64	512	32	<0.5	+
KPN10	>512	8	4	64	512	32	<0.5	+
KPN11	>512	8	4	64	256	32	<0.5	+
KPN12	>512	256	2	32	>512	128	<0.5	+
KPN13	>512	256	32	32	>512	256	<0.5	+
KPN14	>512	512	32	32	>512	512	<0.5	+
KPN15	>512	>512	8	64	>512	>512	<0.5	+
KPN16	>512	8	32	32	>512	16	<0.5	+
KPN17	>512	8	4	64	512	32	<0.5	+
KPN18	>512	8	4	64	256	32	<0.5	+
KPN19	>512	8	8	64	512	32	<0.5	+
KPN20	>512	8	4	32	256	16	<0.5	+
KPN21	>512	8	4	32	256	32	<0.5	+
KPN22	>512	256	64	32	>512	256	4	+
KPN23	>512	64	16	32	>512	64	<0.5	+
KPN24	>512	512	8	32	>512	512	<0.5	+
KPN25	>512	8	256	2	>512	2	1	+
KPN26	>512	8	64	4	512	32	<0.5	+
KPN27	>512	256	16	64	256	256	4	+
KPN28	>512	>512	16	32	>512	256	<0.5	+
KPN29	>512	256	16	16	512	256	<0.5	+
KPN30	>512	>512	32	16	>512	256	<0.5	+
KPN31	>512	256	128	16	>512	32	<0.5	+
MIC ₅₀	>512	16	8	32	>512	32	<0.5	
MIC ₉₀	>512	>512	128	128	>512	512		

Abbreviations: NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; KPN, *K. pneumoniae*; AMP, ampicillin; AZT, aztreonam; CFX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CPH, cephalothin; CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; DDS, double-disk synergy test.

4. 접합에 의한 내성 전달 및 플라스미드 분석

DDS 검사상 양성으로 나타나 내성 전달검사가 실시된 *E. coli* 30주에서 20주(66.7%), *K. pneumoniae* 29주 중 20주(68.9%)에서 광범위 beta-lactam 항균제에 대한 내성이 전달되었다. 야생주와 내성을 접합한 피전달균주에서 플라스미드를 분리하여 분석한 결과 다양한 수의 plasmid를 볼 수 있었다. *E. coli* 2주에서는 같은 크기의 플라스미드를 관찰할 수 있었고 항균제 감수성 결과 모든 항균제에 동일한 MIC를 보여주었다. 이들에 의한 접합주에 대해서도 비슷한 크기와 개수의 플라스미드를 발견할 수 있었다(Fig. 1).

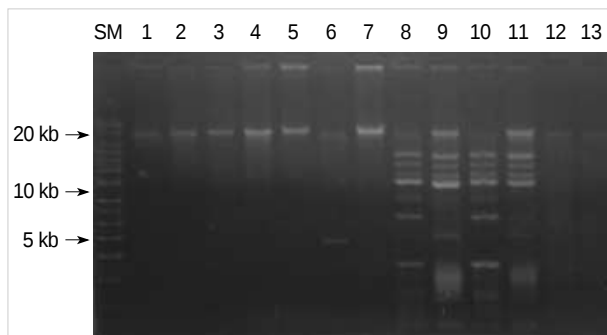


Fig. 1. Plasmid profiles of *E. coli* and transconjugant. Lane SM, supercoiled DNA ladder; Lane 1, ECO4; Lanes 2-3, ECO4 transconjugant; Lane 4, ECO6; Lane 5, ECO6 transconjugant; Lane 6, ECO10; Lane 7, ECO10 transconjugant; Lane 8, ECO13; Lane 9, ECO13 transconjugant; Lane 10, ECO14; Lane 11, ECO14 transconjugant; Lane 12, *E. coli* RG176; Lane 13, *E. coli* RG488.

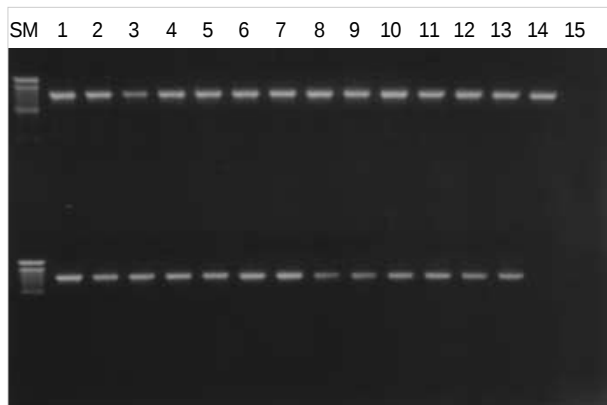


Fig. 2. TEM-specific polymerase chain reaction products by agarose gel electrophoresis of amplified DNA of studied isolates. Top lanes are presented with *K. pneumoniae* isolates whereas bottom with *E. coli* isolates. SM, molecular weight size-marker (100 bp DNA ladder); top lanes 1-14, isolates of *K. pneumoniae*; lane 15, negative control; bottom lanes 1-12, isolates of *E. coli*; lane 13, duplicate of ECO21; lane 14, negative control.

5. 중합효소 연쇄반응에 의한 ESBL 효소형 양상

ESBL를 생성하는 것으로 확인된 *E. coli* 30주와 *K. pneumoniae* 29주 중 외래검체를 제외하고 무작위로 선정된 *E. coli* 12주와 *K. pneumoniae* 14주를 대상으로 TEM 특이 PCR을 실시한 결과 *E. coli* 12주와 *K. pneumoniae* 14주 모두 TEM 양성을 보였다(Fig. 2). SHV 특이 PCR이 시행된 *E. coli* 12주 중 3주(25.0%)만 양성을 보였으나 *K. pneumoniae*는 14주 모두 양성을 보였다(Fig. 3). PCR을 시행한 각 균주의 aztreonam, ceftazidime, cefotaxime 및 cefoxitin의 MIC를 살펴본 결과, SHV가 양성인 *E. coli* 3주 모두 aztreonam에 대해 $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ 의 내성을 보였으나, *K. pneumoniae* 14주에서는 8- $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보였다(Table 3, 4).

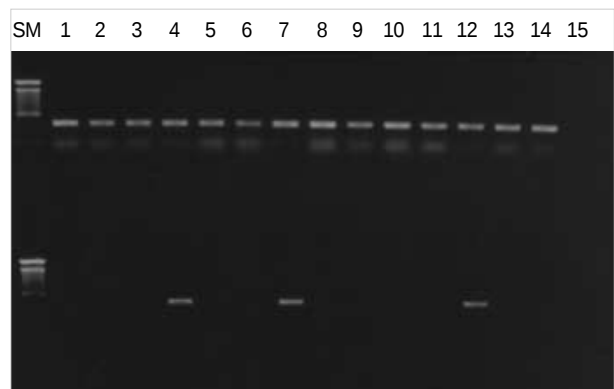


Fig. 3. SHV-specific polymerase chain reaction products by agarose gel electrophoresis of amplified DNA of studied isolates. Top lanes are presented with *K. pneumoniae* isolates whereas bottom with *E. coli* isolates. SM, molecular weight size-marker (100 bp DNA ladder); top lanes 1-14, isolates of *K. pneumoniae*; lane 15, negative control; bottom lanes 1, negative control; 2-13, isolates of *E. coli*.

Table 3. Minimal inhibitory concentrations of antibiotics with corresponding polymerase chain reaction results of *E. coli* and pl

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of				ESBL		pI	Genotype
	CFX	CTX	CAZ	AZT	TEM	SHV		
ECO3	4	16	16	4	+	-	5.4, 5.9	TEM52
ECO4	>512	128	16	2	+	-	5.4, 7.0, 7.6, 8.0	
ECO6	256	16	64	256	+	+	5.4, 8.2	SHV12
ECO10	>512	16	1	4	+	-	5.4, >8.2	
ECO11	32	512	128	32	-	-	5.4, 5.9	TEM52
ECO12	8	128	>512	>512	+	+	8.2	SHV12
ECO13	16	512	8	64	+	-	5.4, >8.2	
ECO14	16	512	8	64	+	-	5.4, >8.2	
ECO15	32	128	8	64	+	-	5.4, 5.9	TEM52
ECO18	128	128	128	64	+	-	5.4, 5.9	TEM52
ECO20	256	16	16	128	+	+	5.4, 8.2	SHV12
ECO21	16	512	128	128	+	-	5.4, 5.9	TEM52

Abbreviations: ECO, *E. coli*; CFX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam; ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

6. β -lactamase 등전점

*E. coli*의 경우 pI 5.4와 5.9인 β -lactamase를 동시에 가진 균주가 5주(38.5%)로 가장 많았으며, pI 5.4와 8.2 이상인 균주가 3주, 5.4와 8.2를 동시에 가진 균주가 2주, pI 5.4, 7.0, 7.6, 8.0 및 pI 8.2인 β -lactamase만을 가진 균주가 각각 1주씩 관찰되었다(Table 5). pI 5.4와 5.9를 가지는 5주에서 cefotaxime에 대한 MIC가 다른 항균제에 비해 비교적 높았고, pI 5.4와 8.2를 보인 2주와 pI 8.2만을 보인 1주에서는 비교적 aztreonam에 대해 고도 내성을 보였다. pI 5.4와 8.2 이상인 β -lactamase를 가지는 *E. coli* 3주 중 1주와 *K. pneumoniae* 2주 중 2주에서 cefoxitin에 대한 MIC가 각각 ≥ 512 , 4 및 $32 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 나머지 *E. coli* 2주에서는 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보였다(Table 3, 4). *K. pneu-*

*moniae*는 pI가 5.4, 5.9 및 7.6인 β -lactamase를 생산하는 균주가 총 14주 중 6주(42.9%)로 가장 많았고, 이들 중 4주에서는 aztreonam, ceftazidime 및 cefotaxime에 대해 동일한 MIC를 보여주었다. pI가 5.9와 7.6인 β -lactamase를 생산하는 균주는 3주(21.4%)로써 이 중 2주에서는, pI 5.4, 5.9 및 7.6을 보인 6주 중 4주에서 보인 MIC와 같은 결과를 보였다. 그 외 pI 5.4와 7.6인 β -lactamase를 동시에 가진 균주와 pI 5.4와 8.2 이상인 β -lactamase를 생산하는 균주가 각각 2주 관찰되었다. *K. pneumoniae*에서 pI 5.4와 8.2인 균주가 1주 존재하였으며, *E. coli*와 비교하여 aztreonam에 비교적 낮은 내성을 보였다(Table 4)(Fig. 4).

7. 염색체 DNA의 pulsed-field gel electrophoresis 양상별 분포

E. coli 12주와 *K. pneumoniae* 10주를 제한 효소인 *Xba*I에

Table 4. Minimal inhibitory concentrations of antibiotics with corresponding polymerase chain reaction results of *K. pneumoniae* and pI

Strains	MIC (μ g/mL) of				ESBL		pI	Genotype
	CFX	CTX	CAZ	AZT	TEM	SHV		
KPN2	8	32	8	128	+	+	5.4, 7.6	SHV2a
KPN4	4	64	32	8	+	+	5.9, 7.6	TEM52
KPN5	4	128	2	8	+	+	5.4, >8.2	
KPN8	4	16	32	8	+	+	5.9, 7.6	TEM52
KPN9	4	64	32	8	+	+	5.9, 7.6	TEM52
KPN10	4	64	32	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52
KPN11	4	64	32	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52
KPN14	32	32	512	512	+	+	5.4, 7.6	SHV2a
KPN15	8	64	>512	>512	+	+	5.4, 8.2	SHV12
KPN16	32	32	16	8	+	+	5.4, >8.2	
KPN17	4	64	32	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52
KPN18	4	64	32	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52
KPN19	8	64	32	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52
KPN20	4	32	16	8	+	+	5.4, 5.9, 7.6	TEM52

Abbreviations: KPN, *K. pneumoniae*; CFX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam; ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

의해 절단하여 염색체 DNA의 전기영동분석 결과, *E. coli*에서는 A, B, C, D, E 그리고 F까지 6가지의 PFGE 유형을 볼 수 있었고, *K. pneumoniae*는 A, B, C, D 그리고 E까지 5가지 형으로 분류할 수 있었다. *E. coli*의 경우 A형이 4/12주로 가장 많았으며 D형이 3주, B형이 2주씩 있었다. *K. pneumoniae*는 B형이 10주 중 5주에서 나타났으며 모두 소아과 환자였으며 동일한 클론에 의한 것으로 판독되었다(Fig. 5). Uniband/Map software (Uvitech Ltd., Cambridge, UK) 프로그램을 이용하여 dendrogram을 그려본 결과 Fig. 6과 같았다.

병실에 따른 PFGE 양상의 분포를 살펴본 결과, *E. coli*에서 A아형을 보인 4주는 모두 재활의학과와 신경외과 환자들에서 분리되었고 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam에 대해 비슷한 정도의 MIC를 보였다. 또한 D형을 보인 3주는 모두 소화기내과의 담즙과 창상검체에서 분리되었으며 3주가 유사한 항균제 감수성 양상을 보였다(Table 6). *K. pneumoniae*의 경우는 B형을 보인 5주 모두 소변 검체이며 소아과환자에서 분리되었고, 일반

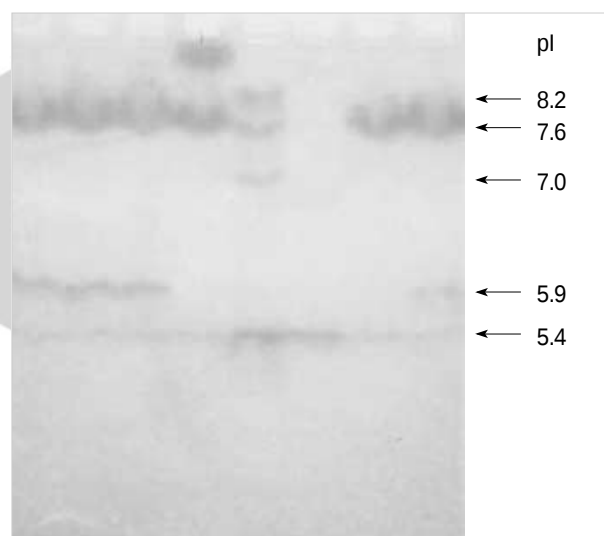


Fig. 4. Isoelectric focusing patterns of β -lactamases of *K. pneumoniae*.

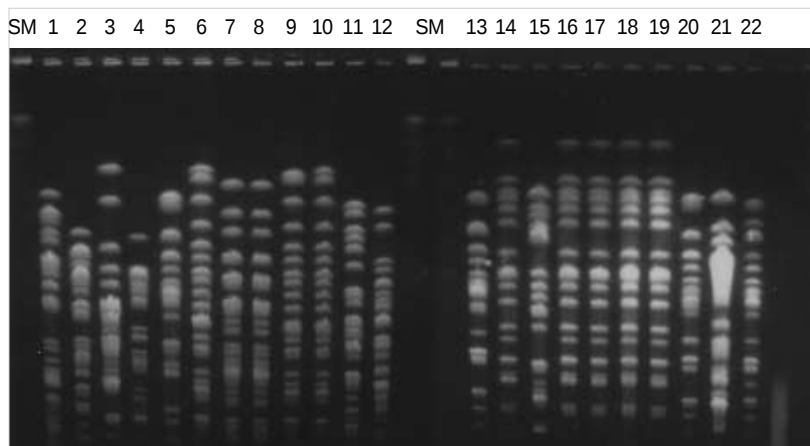


Fig. 5. PFGE patterns of *Xba*I-digested chromosomal DNA of ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. SM, size marker; Lanes 1, ECO6 (Type A1); lane 2, ECO3 (Type B1); lane 3, ECO4 (Type C); lane 4, ECO10 (Type F); lane 5, ECO12 (Type B2); lane 6, ECO11 (Type D1); lane 7, ECO13 (Type A2); lane 8, ECO14 (Type A2); lane 9, ECO15 (Type D2); lane 10, ECO18 (Type D2); lane 11, ECO20 (Type A3); lane 12, ECO21 (Type E); lane 13, KPN2 (Type A); lane 14, KPN4 (type B1); lane 15, KPN5 (Type D); lane 16, KPN8 (Type B1); lane 17, KPN9 (Type B1); lane 18, KPN10 (Type B2); lane 19, KPN11 (Type B1); lane 20, KPN14 (Type C1); lane 21, KPN15 (Type E); lane 22, KPN16 (Type C2).

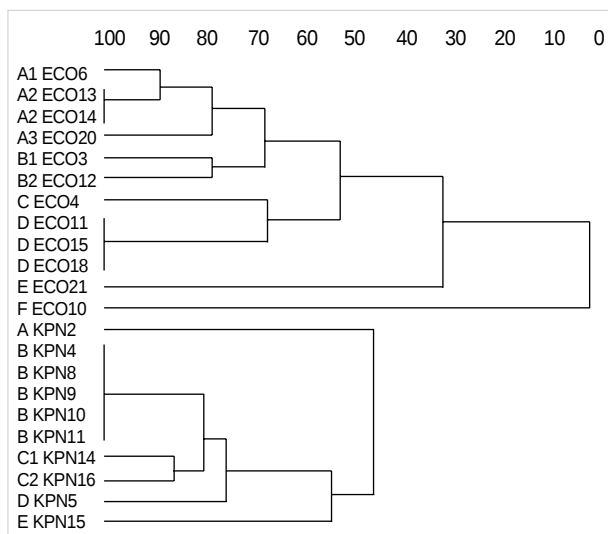


Fig. 6. Dendrogram showing relationship among *Xba*I-digested chromosomal DNA of extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Table 5. Isoelectric points with the relation of extended-spectrum β -lactamase types

Species	TEM		SHV		Combined	
	pI	No.	pI	No.	pI	No.
ECO	5.4, 5.9	5	8.2	1	5.4, 7.0, 7.6, 8.0	1
					5.4, 8.2	2
					5.4, >8.2	3
KPN					5.4, 5.9, 7.6	6
					5.4, 7.6	2
					5.4, 8.2	1
					5.4, >8.2	2
					5.9, 7.6	3

Abbreviations: pI, isoelectric point; ECO, *E. coli*; KPN, *K. pneumoniae*.

병동과 신생아실에서 각각 2주와 3주가 분리되었으며, aztreonam, cefotaxime 및 ceftazidime에 대해 유사한 MIC를 보였다. 또한 C형을 보인 2주는 신경과와 신경외과환자에서 분리된 것으로 모두 객담 검체이며 중환자실 환자들이었다. 그러나 일부 소아과 일반병동의 환자에서 분리된 소변 검체의 경우 다른 PFGE 양상을 보인 균주들도 있었다(Table 7).

8. β -lactamase 유전자 DNA의 염기서열

임상검체에서 분리되고 DDS 양성, TEM형과 SHV형 ESBL PCR 양성 그리고 β -lactamase 등전점 검사가 모두 실시된 *E. coli* 12주와 *K. pneumoniae* 14주를 대상으로 ESBL 유전자의 염기서열을 분석하였다. TEM형 ESBL은 아미노산 점변이에 따라 종류를 분류하였으며, *E. coli* 12주 중 5주(41.7%)에서 TEM-52 ESBL로 판명되었고 나머지는 TEM-1 β -lactamase로 판독

Table 6. PFGE pattern, specimen type, source and antimicrobial susceptibility results of 12 stains of *E. coli*

PFGE pattern	Isolate	Specimen	Department/ ward	MIC (μg/mL) of			
				CTX	CAZ	AZT	
A	A1	ECO6	ur	RE/21	16	64	256
	A2	ECO13	ur	NS/11	512	8	64
		ECO14	sp	NS/ICU	512	8	64
	A3	ECO20	ur	RE/31	512	8	64
B	B1	ECO3	ur	PD/51	16	16	4
	B2	ECO12	wd	GS/41	128	>512	>512
C		ECO4	wd	GS/41	128	16	2
D		ECO11	bl	GI/74	512	128	32
		ECO15	bl	GI/61	128	8	64
		ECO18	wd	GI/74	128	128	64
E		ECO21	ur	RE/31	512	128	128
F		ECO10	wd	GS/41	16	1	4

Abbreviations: ECO, *E. coli*; ur, urine; sp, sputum; wd, wound; bl, bile; RE, Rehabilitation; NS, Neurosurgery; ICU, intensive care unit; PD, Pediatrics; GS, General Surgery; GI, Gastrointestinal division of Internal Medicine; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam.

Table 7. PFGE pattern, specimen type, source and antimicrobial susceptibility results of 10 stains of *K. pneumoniae*

PFGE pattern	Isolate	Specimen	Department/ward	MIC (μg/mL) of		
				CTX	CAZ	AZT
A	KPN2	sp	NS/ICU	32	8	128
B	KPN4	ur	PD/51	64	32	8
	KPN8	ur	PD/Nursery	16	32	8
	KPN9	ur	PD/Nursery	64	32	8
	KPN11	ur	PD/51	64	32	8
	KPN10	ur	PD/Nursery	64	32	8
C	C1	KPN14	sp	NE/ICU	32	512
	C2	KPN16	sp	NS/ICU	32	16
D	KPN5	ur	PD/51	128	2	8
E	KPN15	ur	PD/51	64	>512	>512

Abbreviations: KPN, *K. pneumoniae*; sp, sputum; ur, urine; NS, Neurosurgery; ICU, intensive care unit; PD, Pediatrics; NE, neuroendocrine; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam.

되었으며 모두 pI 5.4와 5.9를 동시에 가졌다. 한편 *K. pneumoniae*의 경우, 9주(64.3%)에서 TEM-52 ESBL로 판명되었고 나머지 5주에서는 TEM-1 β -lactamase로 판독되었는데, 이들은 pI 5.4와 5.9인 β -lactamase를 동시에 가진 균주(6/9주)와 pI 5.9만을 가진 균주(3/9주)로 분류되었다. SHV형 효소의 점변이 근거로 분석한 결과, SHV-특이 PCR 양성인 *E. coli* 3주는 모두 SHV-12로 분석되었고 *K. pneumoniae* 14주 중 11주에서는 SHV-1 β -lactamase로 판독되었으며, 1주에서 SHV-12로 분석되었고 2주에서는 SHV-2a로 판명되었다. *E. coli* 12주 중 4주(33.3%)에서는 TEM-1 β -lactamase만 나타났고, *K. pneumoniae*의 경우 14주 중 2주(14.3%)에서 TEM-1과 SHV-1 β -lactamase만 관찰되었다.

고 찰

최근 많이 사용되고 있는 항균제인 β -lactam제에 대한 내성기 전 중에서 가장 흔한 것은 β -lactamase에 의한 항균제의 가수분해이다[1]. β -lactamase가 penicillin제와 협범위 cephalosporin제의 효과를 억제하게 됨에 따라 1980년대 초에 새로운 제3세대 cephalosporin제가 개발되어 β -lactamase에 내성인 균주에 대해 임상적으로 사용하였다. 그러나, 1983년 독일에서 cefotaxime 내성인 균주가 처음 보고되었으며[19], 이 후 세계적으로 ESBL을 생성하는 내성균이 많이 보고되었다[20-22]. 나라별로 보고되는 ESBL 생성균의 빈도는 큰 차이를 보이는데, 미국에서는 *K. pneumoniae*의 5-34%까지 보고되며[23,24] 일본에서는 1995년에 와서 ESBL 생성균에 대한 첫 보고가 있었고[25], Yagi 등[26]이 1997년부터 1998년까지 일년동안 ESBL 생성균의 빈도에 대해 연구한 결과, 16,805 *E. coli* 중 15주와 9,794 *K. pneumoniae* 중 34주에서 확인되었다고 하였다. 우리나라의 경우 Pai[8]는 *E. coli*의 4.8%가 ESBL 생성균이라 하였고 Lee 등[27]은 1999-2000년간 전국 12개 병원을 대상으로 조사한 결과 ESBL 생성 *E. coli*는 9.1%, *K. pneumoniae*는 29.2%라고 하였다. 또한 정 등[28]에 의하면 aztreonam, cefotaxime 그리고 ceftazidime에 대한 내성이 *E. coli*는 각각 5%, 6%와 3%이었고 *K. pneumoniae*는 각각 15%, 14% 그리고 17%라고 하였다. 본 연구에서 aztreonam, cefotaxime 그리고 ceftazidime에 내성을 보이는 *E. coli*는 각각 16%, 16%와 15%였으며 *K. pneumoniae*는 각각 12%, 19% 그리고 14%이었다. 국내 연구보고와 비교할 때 *E. coli*의 경우는 다소 높고 *K. pneumoniae*의 경우는 비교적 낮은 것으로 보이는데 그 이유로는 항균제 감수성 검사법의 차이, 원내 항균제 사용 양상, 병원 규모 그리고 같은 환자로부터 분리된 중복 검체 등을 생각할 수 있겠으며 이에 대한 추가 연구가 필요하리라 판단되었다. Bell 등[22]은 MIC를 이용한 선별검사 에서 ESBL 생성균으로 의심되어 ESBL 생성 확인검사를 실시한 결과, *E. coli*는 72%, *K. pneumoniae*는 85%에서 ESBL 생성균으로 밝혀졌다고 하였다. 본 연구에서는 디스크 확산법에 의한 감수성 검사결과로 ESBL 균주를 선별하였고, 그 균주들을 대상으로 DDS를 실시한 결과, *E. coli*는 88.2%, *K. pneumoniae*는 93.5%에서 양성률을 보였다. DDS를 통한 ESBL 생성의 선별검사 방법은 확인검사 결과 높은 예민도를 보이므로 미생물검사에서 통상적으로 선별을 시행하여 ESBL 생성균에 대해 보고한다면 임상에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

ESBL의 종류는 많으며 2001년까지 밝혀진 ESBL은 150종 이상으로 보고되었으나 더 많은 종류가 연구되고 있으며[4] TEM형은 90가지 이상이, SHV형은 25가지 이상이 보고되었다[5]. TEM형 및 SHV형 ESBL은 TEM-1과 SHV-1 β -lactamase에서 한 개 또는 그 이상의 아미노산 치환에 의해 생성된 효소들이며, oximinoccephalosporin과 monobactam제를 가수분해하고 clavulanic acid에 의해 억제될 수 있어 Group 2be에 속하는 효

소이다. TEM-1은 여러 형의 효소로 변화하는데[28] 국내에서 높은 빈도를 차지하고 있는 TEM-52는 TEM-1과의 염기서열 104, 182 그리고 238에서 각각 glutamic acid가 lysine, methionine이 threonine으로 그리고 glycine이 serine으로 변이를 보여 나타난 효소형이다[29, 30]. 국내에서 ESBL형의 빈도는 Pai[8]의 경우 *E. coli*에서는 TEM-52가 *K. pneumoniae*는 SHV-12가 가장 흔하다고 하였고, Kim 등[31]은 *K. pneumoniae*에서 SHV-12와 SHV-2a가 흔하다고 하였다. 한편, 홍 등[32]은 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 모두에서 TEM-52가 가장 많았으며 *E. coli*에서는 SHV-12, SHV-2a 순으로 많았고 *K. pneumoniae*는 SHV-2a, SHV-12 순으로 보고하였다. 본 연구에서도 홍 등[32]의 결과와 마찬가지로 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 TEM형 ESBL은 모두 TEM-52로 판독되었기 때문에 아마도 우리나라에서 흔한 TEM형 ESBL은 TEM-52인 것으로 생각되었다[28, 32, 33]. SHV형은 최근에 발표된 연구결과와 유사한 점으로 미루어 점차 사용하는 항균제의 경향이 다소 영향을 미친 것으로 사료되어 추후 계속되는 유전자형의 연구가 필요할 것이다.

한편 TEM-52로 판독된 균주에서는 일부는 pI 값이 5.4와 5.9를 가지면서 염기서열 분석상 TEM-52로 나타났고, pI 5.9만 가진 균주에서도 염기서열 분석상 TEM-52로 판명되었다. 이는 정 등[28]이 보고한 TEM-52의 모든 예에서 pI 5.9를 가진 것과 차이가 있었으나, 배 등[34]이 보고한 pI 5.4와 5.9를 동시에 가진 균주에서 TEM-52형을 보였다는 보고와 일치하였다. *E. coli* 1주에서는 pI 5.4를 가지고 동시에 pI 7.0, 7.6, 그리고 8.0을 가졌기에 pI 5.4는 TEM-1 β -lactamase로 추측되었으나, SHV 특이 PCR에서 음성인 것과 cefoxitin에 고도 내성인 소견으로 미루어 plasmid성 AmpC β -lactamase 생성균으로 생각되어 추후 분자역학적 검사를 실시해 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다[35]. 또한 pI 5.4와 8.2 이상의 β -lactamase를 가지는 균주가 *E. coli* 3주 *K. pneumoniae* 2주 있었는데 모두 pI 5.4에 해당하는 TEM-1은 판독되었으나, TEM 및 SHV 형 ESBL를 가지지 않는 것으로 판명되었고, pI 8.2 이상의 값을 보이는 것에 대한 세부적인 효소형은 알 수 없었다. DDS 검사 양성인 소견과 cefoxitin에 감수성인 것으로 미루어 clavulanic acid에 의해 가수분해 될 수 있는 class A 및 Bush 분류 2be군의 효소 중 CTX-M형일 것으로 추측되었다. 그러나, 5주 중 2주에서는 cefoxitin에 대해 내성을 보이므로 Class C 및 Bush 분류 1군에 속하는 AmpC 효소 혹은 외막단백질 porin의 소실에 의한 내성일 수도 있기 때문에 추후 연속적인 연구가 필요할 것이다[36, 37]. SHV형 ESBL의 경우 *E. coli*는 PCR 양성 3주 모두 pI 5.4와 8.2를 가져 TEM-1 β -lactamase와 SHV-12 ESBL로 분석되었다. *K. pneumoniae*는 SHV-2a 2주와 SHV-12 1주, 그리고 나머지는 pI 7.6에 해당하는 SHV-1으로 분석되었는데 이는 대부분의 *K. pneumoniae*가 염색체성 β -lactamase를 가지기 때문으로 사료되었다[38]. *E. coli*와 *K. pneumoniae* 모두 TEM형과 SHV형 ESBL을 동시에 가지는 균주는 없었다.

ESBL에 의한 내성은 수평 전이로 인한 원내 집단감염을 일으키며 그 사례들이 보고되고 있다[39, 40]. 본 연구에서 PFGE 결과상 특이사항은 유사한 아형을 보인 A형 *E. coli* 4주는 모두 재활의학과와 신경외과 환자들에서 분리된 것으로, 신경외과 환자에서 분리된 A2형 2주와 재활의학과 환자에서 분리된 A3형 1주는 동일한 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam MIC를 보였다. 본원에서는 신경외과에서 재활의학과로 전과하여 추적 관찰하므로 동일 클론의 ESBL 생성 균주가 병동간 전이된 것으로 판단되었다. 또한 소화기내과에 입원한 환자 3명의 담즙과 창상에서 분리된 *E. coli* 3주는 병동이 다른 층에 있었음에도 같은 PFGE 양상을 보인 것으로 보아 병동간의 전이가 이루어진 것으로 생각되었다. 한편 일반외과환자에서 분리된 *E. coli* 3주에서는 각각 다른 PFGE 양상을 보여 다른 클론의 분포도 관찰되었다. 동일한 양상을 보인 *K. pneumoniae* B형 5주는 모두 소아과 환자들의 소변검체에서 분리된 것으로서 일반병동과 신생아실에서 각각 2주와 3주가 분리되었다. 한 균주에서 cefotaxime에 대해 다소 저도 내성을 보인 것을 제외하면 이들 모두에서 동일한 MIC를 볼 수 있었다. 또한 연구기간 중 신생아실 환자의 혈액에서 분리된 *K. pneumoniae* 4주는 PFGE 양상이 매우 유사하게 판독되었고 9주 모두에서 TEM-52가 판명된 것으로 보아 원내 토착형의 클론이 존재할 것으로 사료되었으며 이로 인한 집단감염을 생각해 볼 수 있었다. 또한 C형을 보인 2주는 신경과와 신경외과환자에서 분리된 것으로 객담 검체이며 중환자실 입원환자들이었다. 그러나 일부 소아과 일반병동 환자의 소변 검체에서 분리된 균주의 경우 다른 PFGE 양상을 보인 것들도 있었다. 따라서 ESBL 생성균은 여러 병동에서 다양하게 분포하였으나 신경외과와 재활의학과와의 연관성, 소아과에서 특히 더 많이 분리되었고 PFGE 양상이 동일하다는 점, 그리고 연구기간 내에 집단감염이 발생한 결과로 볼 때 원내에 토착형 클론이 있는 것으로 추정될 수 있었다. 이는 추후 원내 토착형 균주에 대한 지속적인 연구와 지역내 다른 병원에서 분리된 균주의 비교 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 또한 TEM형 및 SHV형 ESBL은 물론이고 다른형의 ESBL의 존재와 추가적인 내성기전이 있을 수 있으므로 지역내에서도 광범위한 분자역학적 조사가 이루어져야 한다고 사료되었다.

결론적으로 본원에서 분리된 TEM 및 SHV형 ESBL 유전자는 다른 지역에서의 종류와 유사하였고 원내 토착형이 있는 것으로 판단되므로 추후 지역내 ESBL 유전자의 형별 분류가 비교 연구되어야 할 것이다.

요 약

배경 : 그람음성 간균에 의해 생성되는 광범위 β -lactamases의 중요성은 이미 잘 알려져 있지만 대부분의 검사실에서 이들 효소를 동정하고 판독하는 방법 그리고 병원감염 관리에서의 이

용은 어려운 실정이다. 이에 본 연구에서는 우선 장내세균 중 임상 검체에서 가장 흔히 접하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 균주에서 광범위 β -lactamases의 분포와 각각의 종류 그리고 이런 효소들에 의한 원내 단일 클론의 유행이 있는지를 알아보고자 하였다.

방법 : *E. coli* 1,242주와 *K. pneumoniae* 859주를 대상으로 NCCLS에서 권장하는 디스크 확산법에 의한 ESBL 선별기준에 적용하여 선별검사를 실시하였다. 이중디스크 확산법을 이용하여 ESBL의 생성을 확인하였으며 한천배지 희석법을 통한 각 균주의 항균제 감수성 검사를 실시하였다. ESBL의 종류를 구분하기 위해서는 균주가 갖는 pI 값과 PCR 중합산물의 염기서열 검사를 실시하였다. 분리된 *E. coli* 균주와 *K. pneumoniae* 균주를 *Xba*I 제한효소로 자른 후, pulsed-field 겔 전기영동을 실시하여 클론성을 알아보았다.

결과 : 선별검사 후, 무작위로 선정된 *E. coli* 34주와 *K. pneumoniae* 31주에 대해 ESBL 생성 확인검사를 실시한 결과, *E. coli*에서 88.2% *K. pneumoniae*에서 93.5%가 양성을 보였다. *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 TEM ESBL형은 모두 TEM-52였다. SHV형은 *E. coli*의 경우 모두 SHV-12형이었고 *K. pneumoniae*는 SHV-2a와 SHV-12 순이었다. *E. coli* 30주 중 20주(66.7%)와 *K. pneumoniae* 29주 중 20주(68.9%)에서 플라스미드 매개성 ESBL을 가진 것으로 밝혀졌다. PFGE 검사결과, *E. coli*는 6가지 그리고 *K. pneumoniae*는 5가지 유형으로 다양하게 나타났다. *K. pneumoniae*의 경우 반수에서 B형이 나타나 동일 클론에 의한 집단 감염이 발생된 것으로 판독되었다.

결론 : 본 연구에서 나타난 ESBL의 효소형은 TEM-52, SHV-2a와 SHV-12로 우리나라에서 흔히 발견되는 종류였다. PFGE 결과상 비교적 다양한 양상을 보여 여러 클론이 존재한다고 봐야 할 수도 있으나 소수의 원내 집단감염과 원내 토착화가 이루어진 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemther* 1998; 41: 25-41.
2. Phillippon A, Labia R, Jacoby GA. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-6.
3. Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-704.
4. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
5. 정윤섭, 이경원, 염종화, 용동은, 정소영. 세균의 새로운 항균제 내성과 기전. 서울: 서흥출판사, 2002: 84-101.
6. Bush K and Jacoby G. Nomenclature of TEM β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 1-3.

7. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
8. Pai HJ. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases in Korean isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Med J* 1998; 39: 514-9.
9. Steward CD, Rasheed K, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2864-72.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12, Wayne, PA: NCCLS; 2002.
11. Grant RB, Whiteley MH, Shapley AJ. Plasmids of incompatibility group P code for the capacity to propagate bacteriophage I ϕ K ϕ . *J Bacteriol* 1978; 136: 808-11.
12. Feliciello I and Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 1993; 212: 394-401.
13. Mercier J and Levesque RC. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 β -lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1577-83.
14. Mabilat C and Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2210-6.
15. Mathew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-78.
16. Poh CL, Yap SC, Yeo M. Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 1993; 24: 123-8.
17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 5463-7.
19. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-7.
20. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 7-22.
21. Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a veterans medical center: seek and you may find. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2593-7.
22. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN. The SENTRY APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 193-8.
23. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 14-20.
24. Quale JM, Landman D, Bradford PA, Visalli M, Ravishankar J, Flores C, et al. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 834-41.
25. Kurokawa H, Oguro K, Nagata A, Suzuki K, Arakawa Y. A report of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Jpn J Chemother* 1995; 43: 462-3.
26. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 53-6.
27. Lee K, Lim JK, Yong D, Yum J, Chong Y, Okamoto R, et al. Evaluation of efficiency of screening extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals where the bacteria are increasingly prevalent. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3696-9.
28. 정윤섭, 이경원, 오카모토 료이찌, 이노우에 마쓰히사. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 생성. *감염* 1997; 29: 477-86.
29. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75: 3737-41.
30. Ambler RP and Coulson AA. Standard numbering scheme for the Class A β -lactamases. *Biochem* 2001; 276: 269-72.
31. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1446-9.
32. 홍성근, 강명서, 최종락, 이경원, 정윤섭, 권오현. 임상검체에서 분리된 Enterobacteriaceae 균종의 Extended-spectrum β -lactamase 유형 및 분자역학적 특성. *대한임상병리학회지* 2001; 21: 495-504.
33. 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현. Extended Barad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *감염*

- 1994; 26: 341-8.
34. 배현주, 김정민, 권영미, 김중원. *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 TEM형 Extended-spectrum β -lactamase의 분석. 감염 1998; 30: 126-33.
35. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.
36. Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 342-8.
37. 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.
38. Chaves J, Lacona MG, Segura C, Coim A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2856-61.
39. Mammeri H, Laurans G, Eveillard M, Castelain S, Eb F. Coexistence of SHV-4- and TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital. J Clin Microbiol 2001; 39: 2184-90.
40. Quale JM, Landman D, Bradford PA, Visalli M, Ravishankar J, Flores C, et al. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* infection. Clin Infect Dis 2002; 35: 834-41.

K C I