

Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamase Genotype *TEM*, *SHV* and *CTX-M* from Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and Comparison with Antibiotic Susceptibility Test

Yun-Tae Kim¹, Kwang-Seok Oh², Seok-Cheol Choi¹ and Tae-Un Kim^{1†}

¹Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea. ²Maritime Safety Team, Korea Institute of Maritime and Fisheries Technology, Busan 608-080, Korea

Recent studies have reported increased isolation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing strains at several hospital in Korea. We studied to investigate the isolation rates of ESBL strains from clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and to characterize differences in types using analyses of genotyping and antibiotic susceptibility test. Antibiotic susceptibility test with confirmation of ESBL by double disk synergy test was performed on the 54 ESBL strains of *Klebsiella pneumoniae* from a hospital in Busan. Transfer of resistant gene in ESBL strains resistant to 3rd generated antibiotics was confirmed by transconjugation test using *E. coli* RG176^{mal}[Ⓢ]. *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* genes were detected by PCR. ESBL producing strains had 100% of resistant rate to ampicillin, azteronam, cefazolin, cefepime and ceftriaxone (β -lactam antibiotics). Forty strains of *bla TEM* (74%), 41 strains of *bla SHV* (76%), 23 strains of *bla CTX-M* (43%) were found, respectively. The strains had one or more genes. They had high resistant rates to β -lactam antibiotics including cephalosporin. The resistant rates of strains with multiple resistant genes were higher than those of strains with single resistant gene.

Key Words: ESBL, *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic susceptibility test

서 론

세균이 발휘하는 여러 내성 기전들 중에서 주된 기전으로 는 항생제를 직접 파괴하거나 무력화시키는 물질의 분비가 있는데, β -lactamase가 이러한 기전의 대표격이다 (Bush, 1989). 1940년대부터 penicillin을 필두로 오늘날에 이르기까지 다양한 종류의 β -lactam 항생제들이 개발되어 왔으며, 이에 대응 하여 세균들 역시 다양한 종류의 β -lactamase를 만들어 왔는데, β -lactamase는 β -lactam 계열 항생제의 분자구조인 β -lactam ring을 잘라 버림으로써 β -lactam 항생제를 불활성화 시킨다 (Bush et al., 1995). 지금까지 밝혀진 β -lactamase는 수백 종에 달하고 있으며, 1970년대에는 Richmond와 Sykes의 분류법이, 1980년대에 들어서는 Ambler의 분류법이 발표된 바 있다 (Livermore, 1995). 그러나 1995년에 발표된 Bush의 분

류법이 최근에는 β -lactamase 분류의 표준으로 인정받고 있다 (Bush et al., 1995; Livermore, 1995). Bush의 분류법은 새로 이 밝혀지는 β -lactamase들에 일련번호를 부여함으로써 기존의 분류법들에 비해 비교적 파악하기 쉽고, 용이하다는 점에서 인정받고 있다 (Bush et al., 1995). 이 분류법의 근간이 되는 것은 penicillin, cephalosporin 등의 기질에 대한 반응의 양상과 clavulanate 및 EDTA 등의 β -lactamase 억제제에 대한 반응 여부에 두고 있다 (Kim et al., 1999). Extended spectrum β -lactam 항생제란, 기존의 cephalosporin 항생제의 7-aminocephalosporinic acid ring의 side chain을 변형시켜, 7- β -acyl side chain에 O-substituted oxyimino group을 포함시켜 aminothiazolyl기로 치환시킴으로써 PBP (penicillin binding protein)에 대한 친화력이 증강되고, 이것은 결국 세균 등이 생산하는 β -lactamase에 잘 견디어 내는 특성을 나타내게 한 것으로, oxyimino cephalosporin이라 불리며, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 등이 여기에 속 한다 (Jacoby, 1997). 이러한 종류의 항생제가 개발됨으로써 일단 이전까지 내성을 보이던 세균들에 관한 문제가 해결되는 듯 했다. 그러나 1980년대 초반부터 미국, 유럽 등지에서 이들 새 항생제들을 가수분해하는 새로운 효소들을 생성하는 세균들이 속속 출현하기 시작

*논문 접수: 2005년 8월 1일

수정제 접수: 2005년 8월 24일

†교신저자: 김태운, (우) 609-757 부산광역시 금정구 부곡3동 9, 부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과

Tel: 051-510-0562, Fax: 051-510-0568

e-mail: tukim@cup.ac.kr

하였다 (Jacoby, 1997). 이들 새로운 효소들에 대해 Du 등 (Du et al., 1995)은 각 효소가 정도의 차이는 있으나 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam 등의 oxyimino β -lactam 항생제들을 주로 분해하는 반면, carbapenem이나 cephamycin 계열의 항생제에는 별 작용이 없었으며, clavulanate에 억제된다는 공통적인 특징들을 보이는 oxyimino β -lactamase라고 보고하였는데, 이러한 효소들을 통틀어서 ESBL (Extended spectrum β -lactamase)이라 하였다 (Du et al., 1995). ESBL에 관한 분류도 역시 Bush 분류법 (Bush et al., 1995; Livermore, 1995)을 따르고 있는데, 최초로 발견된 TEM-1, SHV-1을 필두로 하여 이 효소들을 구성하는 아미노산에서 극소수의 돌연변이가 일어난다는 것이 밝혀짐으로써 여러 종류의 ESBL이 나오게 되었다 (Du et al., 1995). TEM-1과 SHV-1은 65% 정도의 homology를 보이며 Ambler의 분류상 class A에 해당한다 (Du et al., 1995; Jacoby, 1997).

또한, 최근에 심각하게 인식되고 있는 또 하나의 ESBL은 cefotaxime 항균제를 우선적으로 가수분해하는 CTX-M- β -lactamase들이다 (Bonnet, 2004). 이 효소는 1999년에 발표된 NCCLS (National Clinical Laboratory Standards) 가이드라인에 처음으로 검출하는 방법이 보고 되었으나, 이러한 가이드라인으로는 임상검사실 등에서 명확하게 밝혀내기 어렵다 (Johann et al., 2004). CTX-M- β -lactamases는 크게 4가지 그룹으로 나눌 수 있는데, 이들은 PCR과 sequencing을 통하여 내성유전자를 검출하는 것이 가장 정확한 방법으로 알려져 있다 (Johann et al., 2004). ESBL은 주로 장내세균 속에서 생성하며 (Jacoby et al., 1991), 특히 병원균주들에서 plasmid 등을 통한 종속간의 내성 전달로 인한 내성의 확산이 가장 큰 문제로 대두되고 있다 (Heritage et al., 1992). ESBL 생성균주의 격심한 확산은 1988년 프랑스의 14개 병원에서 SHV-4 gene을 가지고 있는 *Klebsiella pneumoniae* 균주가 분리되었고 또한 21개 병원에서 TEM-24 gene을 가진 *Enterobacter aerogenes*가 분리됨으로써 잘 증명되어졌다 (Arlet et al., 1995). 병원에서 분리되는 ESBL 생성균주의 분리율은 각 나라마다 다양하게 나타나는데 미국에서 분리되는 *Klebsiella pneumoniae*의 25% 이상이 ESBL이고, 유럽, 아시아, 남아메리카 등의 지역은 그 이상으로 보고 되었다 (Winokur et al., 2001). 국내에서 분리되는 *Klebsiella pneumoniae*의 ESBL 생성 현황과 유전형에 관한 보고는 여러번 있었다. 하지만 대부분이 TEM이나 SHV 등의 한 가지 형별에 대해서만 기술하였다. 이에 본 연구에서는 부산의 한 종합병원에서 분리되는 *Klebsiella pneumoniae*에서 ESBL을 분리한 후로 TEM, SHV, CTX-M 등의 형별을 동시에 시험하고 항생제 감수성 검사도 실시하여 형별그룹간의 차이를 조사함으로써 ESBL 생성세균에 의한 감염증의 치료지침에 도움이 되는 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주분리

2004년 9월부터 2005년 3월까지 부산 소재 종합병원인 메리놀병원 진단검사의학과 미생물 검사실에 분리된 188개의 *Klebsiella pneumoniae* 균주로부터 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* 54균주를 실험 대상으로 하였다. *K. pneumoniae*는 VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO)의 GNI card에 시험균을 접종하여 생화학적 시험을 하고 동정하였다. 분리된 검체는 urine이 26주 (48.1%), sputum 13주 (24.1%), tip이 6주 (11.1%), pus가 5주 (9.3%), fluid가 4주 (7.4%)로 urine 검체가 가장 많았으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 연구 대상에서 제외하였다.

2. 최소억제농도 (MIC, Minimum Inhibitory Concentration)의 측정

Disk 확산 시험결과 ESBL 균주로 추정되는 *K. pneumoniae*를 MacConkey agar에서 18시간 배양하여 멸균된 증류수에 부유시켜 5,000 rpm에서 3회 원심분리하여 세척시킨 다음, 멸균된 0.45% 식염수 1.8 ml에 현탁하여 McFarland No. 0.5로 조정하였다. 이 균액 200 μ L를 다시 멸균된 0.45% 식염수 1.8 ml에 가하여 항균제 최소억제농도 자동측정기인 Vitek의 GNS card에 접종하여 MIC를 측정하였다. 측정된 항균제는 19종으로 Table 1과 같았고, 각 약제에 대한 최소억제농도는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다 (NCCLS, 1994).

3. 이중디스크 확산법 (double disk synergy test)

McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적서 미리 만든 3 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA) 평판배지에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 μ g, Becton Dickinson, USA) disk를 놓고 그 주변 1.5 cm 간격에 cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g) disk를 올려놓아 37°C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과 (synergism)를 판정하였다.

4. 교차접합시험 (Transconjugation)에 의한 내성 전달

분리된 54주의 ESBL 생성 *K. pneumoniae*를 전달균주로 하고 *E. coli* RG176^{Na⁺}를 피전달균주로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 시험균주들은 모두 TSB에서 배양된 대수 증식기 중반의 신선한 균주를 선정하였다. 전달균주와 피전달균주의 균체수 비율을 1:4가 되게 하여 새로운 TSB에 혼합한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 멸균된 면

Table 1. Antimicrobial resistance of ESBL-producing *K. pneumoniae* using VITEK system

| Antimicrobial agents (resistance breakpoint, µg/ml) | Antimicrobial resistance rates (%; n=54) | | | | | |
|--|--|------|-----|------|-----|------|
| | R | | I | | S | |
| | No. | % | No. | % | No. | % |
| Amikacin (≥64) | 14 | 25.9 | 9 | 16.7 | 31 | 57.0 |
| Ampicillin (≥32) | 54 | 100 | | | | |
| Ampicillin/sulbactam (≥32/16) | 43 | 79.6 | 11 | 20.4 | | |
| Azteronomam (≥32) | 54 | 100 | | | | |
| Cefazolin (≥32) | 54 | 100 | | | | |
| Cefepime (≥32) | 54 | 100 | | | | |
| Cefoxitin (≥32) | 7 | 13.0 | 2 | 3.7 | 45 | 83.3 |
| Ceftriaxone (≥64) | 54 | 100 | | | | |
| Ciprofloxacin (≥4) | 31 | 57.4 | | | 23 | 43.6 |
| Gentamicin (≥16) | 22 | 40.7 | | | 32 | 59.3 |
| Imipenem (≥16) | | | | | 54 | 100 |
| Piperacillin/tazobactam (≥128/4) | 34 | 63.0 | 2 | 3.7 | 18 | 33.3 |
| Tobramycin (≥16) | 38 | 70.4 | 2 | 3.7 | 14 | 25.9 |
| SXT (≥4/76) | 22 | 40.7 | | | 32 | 59.3 |

*Abbreviations: R, Resistant; I, Intermediate; S, Susceptible; SXT, Trimethoprim/sulfamethoxazole

봉에 적서 ceftazidime (30 µg/ml) + nalidixic acid (16 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar에 고르게 도말하고 37°C에서 18시간 배양하여 균 집락 생성 유무를 조사하였다. MacConkey agar에 자란 균 집락을 재동정하여 생화학검사와 항균제 감수성 검사를 실시하여 피전달균주인 *E. coli*로 내성이 전달되었는지를 확인하였다.

5. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 ESBL 유전자 검출

1) DNA 분리 및 보관

시험균주를 TSB 액체배지 (tryptic soy broth)에 접종하고 37°C에서 진탕 배양하였으며, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 침전물에 InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, USA) 200 µL를 넣고 95°C에 10분간 반응 후 10,000 rpm에 15분간 원심분리시킨 후 상등액을 -70°C에 보관하였다. 그리고 다시 10,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 상등액을 제거하고, 침전물에 70% 알코올 300 µL를 넣고 가볍게 전도혼합 후 10,000 rpm에 10분간 원심분리 시켰으며, 상등액을 완전히 제거한 다음 건조 후 증류수 50 µL로 녹여 -20°C에 보관하였다.

2) PCR (polymerase chain reaction)

bla TEM 유전자 검출을 위하여 primer는 forward 5'-ATA-AAATCTTGAAGACGAAA-3'과 reverse 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'을 사용하였으며, 예상되는 PCR 생성물은 1080 bp였다. bla SHV 유전자 검출을 위하여 primer는 forward 5'-TCGTTATGCGTTATATTCGCC-3'과 reverse 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'을 사용하였으며, 예상되는 PCR

생성물은 893 bp였다.

bla CTX-M 유전자 검출을 위하여 primer는 forward 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'과 reverse 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'을 사용하였으며, 예상되는 PCR 생성물은 599 bp였다. Oligonucleotides의 제작은 TEM형, SHV형은 이와 김 (Lee and Kim, 2000)의 방법에 따랐으며, CTX-M형은 David 등 (David et al., 2003)의 방법에 따랐다. PCR에 사용된 시약은 AccuPower® PCR Premix Kit (BIONEER Co. Ltd. Seoul, Korea)를 사용하였는데, Kit의 시약 조성은 Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, dNTP 250 µM, Taq DNA polymerase 1U, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Stabilizer and tracking dye (제조회사에 따름)이 있으며, 여기에 primer (10 pmol) 각각 1 µL, template DNA 8 µL 3차 증류수 10 µL를 가하여 total volume이 20 µL 되게 맞추어 후 사용하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 TEM type은 free denaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 45°C에서 90초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. SHV type은 free denaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. CTX-M type은 free denaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. 반응이 끝난 PCR 생성물은 1.5% aga-

Table 2. The presence of ESBL-genes in current study

| ESBL gene type | No. of isolates | Gene detected isolates | ESBL DDS | | |
|----------------|-----------------|--|----------|-----|-----|
| | | | CAZ | CTX | CRO |
| TEM | 4 | YT-9, 19, 46, 53 | + | + | + |
| SHV | 2 | YT-26, 50 | + | + | + |
| CTX-M | 4 | YT-3, 36, 11, 12 | + | + | + |
| TEM+SHV | 22 | YT-1, 4, 5, 7, 8, 21, 22, 25, 29, 30, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 54 | + | + | + |
| | | YT-20 | + | - | - |
| TEM+CTX-M | 3 | YT-13, 23 | + | + | + |
| SHV+CTX-M | 4 | YT-10, 16, 24, 28, 33 | + | + | + |
| TEM+SHV+CTX-M | 12 | YT-14, 15, 17, 18, 31, 32, 34, 36, 37, 40 | + | + | + |
| | | YT-27, 35 | + | - | - |
| Not detected | 3 | YT-51, 52 | + | + | + |
| | | YT-2 | + | - | - |
| Total | | 54 | | | |

rose gel에서 100 volt로 25분간 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 U.V. transilluminator로 생성분획을 확인하였다.

6. 항생제 감수성 시험결과와 검출된 ESBL 유전자의 상관관계 분석

항균제 감수성 시험결과를 토대로 하여 검출된 ESBL 유전자와의 상관관계를 분석하기 위하여 항균제 종류별로 빈도분석 및 일원배치 분산분석 및 독립표본 T-검정을 시행하였다. 분석에 있어서 유의수준은 $P \leq 0.05$ 로 하였으며, 유의도의 신뢰성을 높이기 위하여 검출된 ESBL 유전자를 변수로 하여 유의도를 검정하였다. 통계학적 분석은 한글 SPSS (SPSS for Window ver 10.1, SPSS Datasolution Inc, Korea)를 이용하였다.

결 과

1. 항생제 감수성 시험결과

항생제 감수성 시험결과 100% 내성으로 나타난 항균제는 ampicillin, cafazolin, cefepime, ceftriaxone, azteronam이었고, ampicillin/sulbactam은 79.6%, tobramycin은 70.4%, piperacillin/tazobactam은 63.0%, ciprofloxacin은 57.4%, Trimethoprim/sulfamethoxazole과 gentamicin은 각각 40.7%, amikacin은 25.9%, cefoxitin은 13.0%이었으며, imipenem은 모든 균주가 감수성을 보였다.

2. ESBL 생성균주

VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO)에서 ESBL 생성균주로 판정된 *K. pneumoniae* 54균주 중에서 54주 (100%) 모두 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험에서 양성

이 확인되었다. 그러나 cefotaxime, ceftriaxone 디스크의 double disk synergy 시험에서는 54균주 중 4균주를 제외한 50주 (92.5%)가 양성으로 확인되었다 (Table 2).

3. 교차접합시험에 의한 내성 전달

ESBL 생성 *K. pneumoniae* 54균주 중 내성획득의 원인이 염색체성인가 혹은 plasmid 매개에 의한 것인가를 확인하기 위하여 교차접합시험을 실시하였다. 공시균주인 *K. pneumoniae*에서 피전달균주인 *E. coli* RG176^{Na}로 내성이 전달된 것을 확인하기 위하여 Ceftazidime (30 µg/ml)과 nalidixic acid (16 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar 배지에 균을 접종하여 배양한 결과 11균주만이 내성이 전달되었고, 나머지 균주는 3회 씩 반복해서 시험했지만 내성 전달이 일어나지 않았다. 내성 전달이 일어난 균주를 다시 위의 교차약제가 첨가된 배지에 접종하여 균의 성장을 재확인 한 결과 이들은 모두 성장하였다.

4. bla TEM, bla SHV, bla CTX-M 유전자 검출을 위한 PCR

ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주 54균주를 대상으로 bla TEM, bla SHV, bla CTX-M 유전자 검출을 위한 PCR을 시행하였다. bla TEM 유전자는 40주 (74%), bla SHV 유전자는 41주 (76%), bla CTX-M 유전자는 23주 (43%)가 양성반응을 보였다. 54균주 중 bla TEM만 가지고 있는 균주는 4주 (7.4%), bla SHV만 가지고 있는 균주는 2주 (3.7%), bla CTX-M만 가지고 있는 균주는 4주 (7.4%), 그리고, bla TEM, bla SHV 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 22주 (40.7%), bla TEM, bla CTX-M 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 3주 (5.6%), bla SHV, bla CTX-M 두 가지 유전자를 가지고

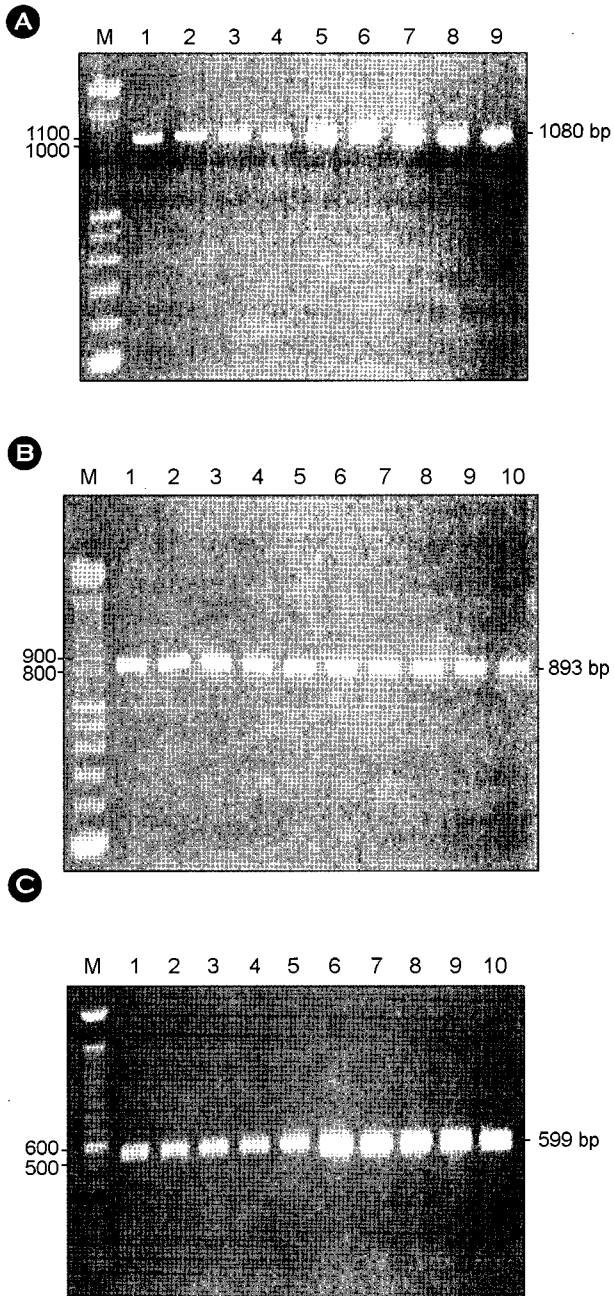


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments amplified from the bla TEM, bla SHV and bla CTX-M gene by PCR with primers. Lane M, the marker (100 bp DNA ladder); lane 1 to 10, strain of ESBL-producing Clinical isolates. The one band of the size ladder are A, bla TEM 1,080 bp; B, bla SHV 893 bp; C, bla CTX-M 599 bp, respectively.

있는 균주는 4주 (7.4%)였고, bla TEM, bla SHV, bla CTX-M 유전자 세 가지를 모두 가지고 있는 균주는 12균주 (22.2%)였다. 그리고 세 가지 유전자를 모두 가지고 있지 않은 균주는 3주 (5.6%)였다 (Fig. 1 & Table 2).

Table 3. Comparison of strains with single ESBL-gene to strains with multi ESBL-gene on mean value of MIC

| Anti-microbial agents | Mean MIC value \pm SD (μ g/ml) | | P value |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------|
| | detected only one gene (n=10) | detected more than one gene (n=41) | |
| AMI | 13.80 \pm 13.74 | 29.26 \pm 26.96 | 0.016* |
| AM | 32.00 \pm 00.00 | 32.00 \pm 00.00 | - |
| AMS | 28.80 \pm 06.74 | 28.87 \pm 06.41 | 0.974 |
| AZT | 25.60 \pm 10.53 | 23.21 \pm 10.40 | 0.531 |
| CZ | 32.00 \pm 00.00 | 32.00 \pm 00.00 | - |
| CPM | 8.80 \pm 09.00 | 15.90 \pm 11.47 | 0.050* |
| CXT | 6.40 \pm 09.32 | 9.70 \pm 09.85 | 0.337 |
| CRO | 48.00 \pm 21.33 | 47.80 \pm 22.52 | 0.980 |
| CIP | 2.60 \pm 01.80 | 2.53 \pm 01.69 | 0.921 |
| GM | 3.45 \pm 04.65 | 9.41 \pm 07.03 | 0.004* |
| IPM | 4.00 \pm 00.00 | 4.00 \pm 00.00 | - |
| PIP | 85.60 \pm 57.07 | 84.68 \pm 57.85 | 0.964 |
| TOB | 9.80 \pm 08.00 | 12.47 \pm 06.07 | 0.342 |
| SXT | 48.00 \pm 98.07 | 170.73 \pm 155.23 | 0.005* |

Abbreviation: SD, standard deviation; AMI, Amikacin; AM, Ampicillin; AMS, Ampicillin/sulbactam; AZT, Azteronam; CZ, Cefazolin; CPM, Cefepime; CXT, Cefoxitin; CRO, Ceftriaxone; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamicin; IPM, Imipenem; PIP, Piperacillin/tazobactam; TOB, Tobramycin; SXT, Trimethoprim/sulfamethoxazole

*bold letter, level of significance by unpaired *t*-test

5. 항생제 감수성 시험과 ESBL 유전자 보유균주간의 관계

ESBL 유전자를 보유하고 있는 총 51균주 중 ESBL 유전자를 한 가지만 보유하고 있는 균주는 10주이었고, 두 가지 이상을 보유하고 있는 균주는 41주였다. 이들의 MIC 평균값과 ESBL 유전자의 보유 개수 별로 그 상관관계를 분석해보면, amikacin의 경우 ESBL 유전자를 한 가지만 보유한 균주들은 13.30 \pm 13.74 μ g/ml, 두 가지 이상 보유한 균주들은 29.26 \pm 26.96 μ g/ml ($P=0.016$), cefepime의 경우 ESBL 유전자를 한 가지만 보유한 균주들은 8.80 \pm 9.00 μ g/ml, 두 가지 이상 보유한 균주들은 15.90 \pm 11.47 μ g/ml ($P=0.05$), gentamicin의 경우 ESBL 유전자를 한 가지만 보유한 균주들은 3.45 \pm 4.65 μ g/ml, 두 가지 이상 보유한 균주들은 9.41 \pm 7.03 μ g/ml ($P=0.004$), 그리고, trimethoprim/sulfamethoxazole의 경우 ESBL 유전자를 한 가지만 보유한 균주들은 48.00 \pm 98.07 μ g/ml, 두 가지 이상 보유한 균주들은 170.73 \pm 155.23 μ g/ml ($P=0.005$)으로 나타나, 총 14종류의 항생제 중 4종류의 항생제에서 ESBL 유전자를 두 가지 이상 보유한 균주의 MIC 평균값이 높게 나타났다 (Table 3).

고찰

그람음성 간균은 임상검체에서 흔히 분리되는 균속인데,

이 세균에 의한 감염증 치료에는 흔히 β -lactam제가 이용되어 왔다. 그러나 근래 중증감염을 일으키는 *Klebsiella pneumoniae* 중에 ESBL 생성균이 증가하고 있으며, ESBL 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 전달될 수 있고 원내감염을 일으킬 수 있기 때문에 심각한 문제가 되고 있다 (Livermore, 1995). 송 등 (Song et al., 2000)의 전국적인 조사에 의하면 우리나라의 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*도 중환자실 환자에서 분리율이 높았고, 다른 항균제에 대한 내성률이 ESBL 비생성균주에 비해 높다고 하였다 (Song et al., 2000). 본 연구에서도 항생제 감수성 시험결과 ampicillin, cefazolin, cefepime, ceftriaxone, azteronam이 100% 내성으로 나타났고 ceftaxitin의 내성률은 13.0%로 가장 낮았으며, imipenem은 모든 균주가 100%의 감수성을 나타냄으로써 ESBL 생성균주의 전형적인 양상을 나타내었다 (Table 1). 본 연구에서는 아직 까지 carbapenem 제제인 ipipenem에 내성을 보이는 ESBL 생성균주가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

임상 분리주에서 ESBL 생성률과 유형은 나라 및 조사기관에 따라 다르다. 네덜란드의 경우 1999년도의 발표에 의하면 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 1%만이 ESBL 유전자를 가지고 있었고 (Stobberingh et al., 1999), 미국은 기관에 따라 0~25%로 다양하나 전체적으로 3%의 장내세균이 ESBL을 생성하였으며 (Jone et al., 1998), 반면 프랑스의 경우는 분리된 *K. pneumoniae*의 약 40%가 ceftazidime에 내성을 보인다고 하였다 (Branger et al., 1998). 인접한 일본은 *E. coli*의 0.1%, *K. pneumoniae*의 0.3%만이 ESBL을 생산하였다고 보고하였다 (Yagi et al., 2000). 병원의 규모가 크거나 대학병원일수록 ESBL 생성균주의 분리율이 높다는 보고가 있다 (Itokazu et al., 1996).

우리나라의 경우 그 비율은 균종, 병원 및 분리연도에 따라 달랐지만, 대체로 *E. coli*는 9.1%, *K. pneumoniae*는 29.2%로 적지 않게 보고 되었다 (Hong et al., 2003). 본 연구에서는 500병상 정도의 병원 환자에서 분리된 *K. pneumoniae* 중 ESBL 생성균주의 비율이 28.7%로 전국 평균과 거의 비슷하였다.

ESBL 균주를 검출하는 방법으로는 NCCLS에서 제안한 방법 외에 이중 디스크 확산법, E-test, 분자생물학적 방법, 자동화기기를 이용한 방법 등이 있다. 이중에서 최근에 개발된 자동화기기를 이용한 ESBL 검출법은 기존의 검출법과 비교 시 매우 일치율이 높으며, 또한 빠르고 간편하게 ESBL 생성균를 검출할 수 있는 장점이 있다 (Cho and Lee, 2003). 국내에서도 ESBL 생성균주를 검출할 수 있는 Vitek ESBL (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO, USA) 시험도 도입되어 항균제 감수성 검사를 동시에 시행할 수 있다. Vitek ESBL 시험은 4개의 well에 cefotaxime, cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime/clavulanic acid가 들어 있고 균 접종 및 배

양 후에 항균제만 들어있는 well과 항균제와 clavulanic acid가 첨가된 well에서의 성장을 비교하여 ESBL을 검출하는 방법이다. Sanders 등 (Sanders et al., 1996)은 ESBL 균주로 확인된 157균주의 Vitek ESBL 시험의 검출 예민도와 특이도는 각각 99.5%와 100%로 매우 높음을 보고하였다. 본 연구에서도 분리된 *K. pneumoniae* 균주 118주를 Vitek system의 GNS 433 card를 이용하여 항균제 감수성 시험 시행과 동시에 ESBL 생성균주 54주를 검출하였다.

Double disk synergy 시험은 TEM 및 SHV형 ESBL이 clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성을 이용한 것으로, 이 효소를 생성하는 세균의 검출에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 ceftazidime cefotaxime, ceftriaxone 디스크와 clavulanic acid 디스크를 사용하여 double disk synergy 시험을 시행하였다. 위의 3세대 cepham 디스크 중 한 가지 디스크에서라도 synergy 현상이 나타난 균주를 양성으로 판정하였다. 실험한 결과 Vitek system에서 ESBL로 분리된 54주 모두 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험에서 양성 이 나타났다. 하지만 cefotaxime, ceftriaxone 디스크의 double disk synergy 시험에서는 54균주 중 50주 (92.5%)가 양성으로 나타나서, Vitek system에서의 ESBL 생성균주 검출과 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험과의 일치율이 100%였다.

ESBL 생성균주들은 주로 plasmid 매개성으로 plasmid를 통하여 내성을 다른 균주로 이동시키는 것으로 알려졌다 (Livermore, 1995). 본 연구에서는 접합 (transconjugation)으로 내성 전달 시험을 시행하였다. 그 결과 54균주 중 11균주만이 내성이 전달된 것이 확인 되었다. 나머지 균주는 내성 전달이 확인 되지 않았는데 이는 세균의 세포외막 변성에 의한 것으로 추측되거나 염색체성 β -lactamase 활성에 기인하는 것으로 사료되었다 (Sawai et al., 1987).

현재까지 알려진 장내세균 생성 ESBL의 유형은 40가지 이상으로 매우 다양하다 (Sirota, 1995). 이들 효소는 광범위 항균제에 대한 가수분해 활성을 지닌다. 이와 같은 TEM 혹은 SHV형 ESBL은 cephamycin 및 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성이 있다 (Phillipon et al., 1994).

TEM-1, SHV-1의 아미노산 중 1~4개가 유전자의 점 변이 (point mutation)에 의하여 다른 아미노산으로 치환됨으로써 TEM-1, TEM-2, TEM-3, SHV-1, SHV-2, SHV-3 등으로 새로운 형들이 보고된다. CTX-M- β -lactamases는 TEM, SHV형 ESBL과는 다소 연관이 적은 것으로 보고 되고 있으며, TEM, SHV형 ESBL gene과는 40% 이하의 homology를 갖고 있는 것으로 보고 되었다 (David et al., 2003). CTX-M- β -lactamases는 *Kluyvera georgiana*, *Kluyvera cryorescens*, *Kluyvera ascorbata* 등과 같은 균주에서 보이는 chromosomal β -lactamases의 아미

노산과 매우 밀접한 것으로 보고 되었다 (Johann et al., 2004). 이러한 CTX-M- β -lactamases는 유럽, 아프리카, 아시아, 남아메리카, 그리고 최근에는 북아메리카까지 전 세계에 걸쳐서 널리 퍼져 있는 것이 보고된 바 있다 (Moland et al., 2003). ESBL 유전형은 국가에 따라 다른데, 프랑스에는 TEM-3, 미국에는 TEM-10, TEM-12 및 TEM-26, 그리스에는 SHV-5가 많은 것으로 알려졌으며 (Livermore, 1995), 우리나라에서는 SHV-5 및 TEM-52가 흔한 것으로 보고된 바 있다 (Bae et al., 1997).

국내에서 분리되는 ESBL 생성 장내세균 중에는 SHV형을 생성하는 세균이 많았다는 손 등 (Son et al., 1997)의 보고가 있는 데 본 연구에서는 TEM, SHV, CTX-M형의 한 가지 gene을 생성하는 균주는 적게 나타났고, 두 가지 또는 세 가지의 gene을 동시에 보유하는 균주가 많이 확인되었다. 특히, TEM과 SHV를 동시에 가지는 균주가 54균주 중에서 22주 (40.7%)로 가장 많았고 그 다음으로 TEM, SHV, CTX-M 세 가지를 동시에 가지고 있는 균주가 12주 (22.2%)로 확인되었다 (Table 2). 이상과 같은 결과는 최근에는 한 가지의 내성유전자를 가지고 있는 균주보다 여러 가지 내성유전자를 복합적으로 가진 균주가 많이 출현한다는 것을 알 수 있었다. 항생제 감수성 시험과 ESBL 유전자 보유균주간의 상관관계는 amikacin, cefepime, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole의 4종류의 항생제에서 한 가지 ESBL 유전자를 보유하고 있는 균주보다 두 가지 이상을 보유하고 있는 균주의 MIC 평균값이 높게 나타남으로써 이들 항생제와의 유의점이 나타났다 (Table 3). 이러한 현상은 한 가지의 내성유전자를 가지는 균주보다 두 가지 이상의 내성유전자를 가지는 균주가 항생제에 대한 내성률이 높게 나타난다는 것을 증명해주는 것 같다.

REFERENCES

- Arlet GM, Rouveau I, Casin PJ, Bouvet PH, Lagrange A, Philippon. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol.* 1994. 32: 2553-2558.
- Bae HJ, Kim JM, Kwon YM, Lee KW, Chong YS, Kim EC, Hong SG, Kim SJ, Jeong SH, Chang CH, Cho SR, Ahn JY, Shin JH, Lee HS, Song WK, Uh Y, Yum JH, Wong DE. Characterization and type of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Korea. *Infection.* 1997. 29: 93-103.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 1-14.
- Branger C, Lesimple AL, Bruneu B, Berry P, Lambert Z. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. *J Med Microbiol.* 1998. 47: 201-209.
- Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989. 33: 259.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995. 39: 1211-1233.
- Cho EH, Lee NY. Antibiogram of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* detected by Vitek ESBL test. *Korea J Clin Microbiol.* 2003. 6: 47-51.
- David L, Paterson L, Kristine M, Hujer M, Bethany Y, Michael D, Bonomo D. Extended-Spectrum-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-Type-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 34: 3554-3560.
- Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM-and SHV-derived extended spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure, and function. *J Antimicrob Chemother.* 1995. 35: 7-22.
- Heritage JP, Hawkey M, Todd NI, Lewis J. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992. 36: 1981-1986.
- Hong SG, Kim SJ, Jeong SH, Chang CH, Cho SR, Ahn JY, Shin JH, Lee HS, Song WK, Uh Y, Yum JH, Wong DE, Lee KW, Chong YS. Prevalence and diversity of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. *Korea J Clin Microbiol.* 2003. 6: 149-155.
- Itokazu GS, Quinn JP, Bell-Dixon C, Kahan FM, Weinstein RA. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national post marketing surveillance program. *Clin Infect Dis.* 1996. 23: 779-784.
- Jacoby GA. Extended spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- β -lactams. *Infect Dis Clin NA.* 1997. 11: 875-887.
- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991. 35: 1697-1704.
- Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, Erwin ME, Hollis RJ. Anti-

- microbial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum β -lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States, Cefepime Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998. 30: 215-228.
- Kim BL, Jeong SH, Koo JY, Lee KW, Chong YS, Jeong TJ, Hwang HY, Kim MH. Prevalence of Extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* and evaluation of methods for detection. *Korea J Clin Microbiol*. 1999. 2: 28-39.
- Lee HK, Kim YT. Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) Typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimen in pusan. *Korea J Microbiol*. 2000. 36: 221-227.
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995. 8: 557-584.
- Moland ES, Black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarthy S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003. 47: 2382-2383.
- NCCLS. 1994. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 5th informational supplement. NCCLS document M100-S5. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085.
- Phillipon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994. 13 (Suppl. 1): 17-29.
- Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski M. Detection of extended spectrum β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol*. 1996. 34: 2997-3001.
- Sawai T, Hirano S, Yamaguchi A. Repression of porin synthesis by salicylate in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett*. 1987. 40: 233-246.
- Sirof D. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 1995. 36 (Suppl. A): 19-34.
- Son SH, Lee DJ, Kim CG, Kim JM, Bae HJ. Distribution TEM, SHV type β -lactamase gene of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection*. 1997. 29: 271-276.
- Song WG, Lee KW, Kim SJ, Jeong SH, Chang CH, Shin HJ. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from 12 hospital in Korea. *Korea J Chemother*. 2000. 18: 401-410.
- Stobberingh EE, Arends J, Hoogkamp-Korstanje JA, Goessens WH, Visser MR, Buiting AG. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in Dutch hospitals. *Infect*. 1999. 27: 348-354.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacificregion. *Clin Infect Dis*. 2001. 32 (Suppl. 2): S94-S103.
- Yagi T, Kruokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 2000. 184: 53-56.