

## Comparison of Molecular Characteristics of Extended Spectrum $\beta$ -lactamase Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections between 2 Time Periods of 1989 and 2010 at Gangwon Province in Korea

Min Park<sup>1</sup>, Soon Deok Park<sup>1,2</sup>, Sa-Hyun Kim<sup>4</sup>, Gysang Lee<sup>1</sup>, Hyun Jun Woo<sup>1</sup>,  
Hyun Woo Kim<sup>1</sup>, Byungrak An<sup>1,3</sup>, In Ho Jang<sup>1,2</sup>, Young Uh<sup>2</sup> and Jong-Bae Kim<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Yongin Severance Hospital, Yonsei University, Yongin 449-930, Korea

<sup>4</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jaechon 390-711, Korea

Etiological agents of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) have become a major problem in urinary tract infections. The purpose of this study was to compare the molecular characteristics of ESBL producing UPEC strains isolated from 1989 and 2010. A total of 301 strains of UPEC clinical isolates was collected from Korean healthcare facility in 1989 (126 strains) and in 2010 (175 strains). UPEC clinical isolates were analyzed by multiplex polymerase chain reaction method (ESBL related *bla* genes and phylogenetic groups) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Among 301 isolates, ESBL producing UPEC were 8 strains (6.3%) in 1989 isolates and 35 strains (20%) in 2010 isolates. The rate of *bla* genes in ESBL producing UPEC from 1989 isolates and 2010 isolates were *bla*<sub>TEM</sub> (75% and 85.7%), *bla*<sub>CTX-M</sub> (0% and 91.4%), *bla*<sub>OXA</sub> (25% and 20%), *bla*<sub>PER</sub> (0% and 2.9%). The distribution of phylogenetic groups in 1989 isolates and 2010 isolates were A (37.5% and 11.4%), B2 (12.5% and 51.4%), and D (50% and 37.1%). The most prevalent ESBL related *bla* gene and phylogenetic group were *bla*<sub>CTX-M</sub> (91.4%) and B2 (51.4%) in 2010 isolates, while *bla*<sub>CTX-M</sub> was not detected in 1989 isolates. Among 43 ESBL producing UPEC were grouped into 12 clusters up to 76% of genetic similarities by AFLP analysis. During past twenty one years, the rate of the ESBL producing UPEC strains in 2010 isolates was increased than that of in 1989 isolates. Also, the most prevalent ESBL related *bla* gene has been changed from *bla*<sub>TEM</sub> to *bla*<sub>CTX-M</sub>.

**Key Words:** Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

세균성 요로감염은 가장 흔한 세균성 감염질환 중 하나이며, 대장균에 의한 요로감염이 약 70~90%에 이르고 특히 남성보다 여성에서 흔히 발생한다 (Li et al., 2010). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생성하는 세균

은 1세대 penicillin 뿐만 아니라 3세대 cephalosporins 및 monobactam에 내성을 보인다 (Paterson and Bonomo, 2005). ESBL 관련 내성 유전자는 plasmid에 존재하며 이를 매개로 다른 세균으로 내성 유전자를 전달할 수 있어 임상적으로 중요하다 (Lee et al., 2007). 다양한 유형의 ESBL 생성 세균이 전세계적으로 증가하는 추세이고 (Lee et al., 2004.) 특히 ESBL 생성 세균의 내성 유전자의 분포는 나라별, 지역별로 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (Ryoo et al., 2004).

본 연구에서는 강원도 소재의 원주 세브란스 기독교병

\*Received: August 23, 2013 / Revised: September 17, 2013

Accepted: September 17, 2013

†Corresponding author: Jong Bae Kim. Department of Biomedical Laboratory Science College of Health Science, Yonsei University, Wonju-si, Gangwon-do 220-710, Korea.

Tel: +82-33-760-2423, Fax: +82-33-760-2561

e-mail: kimjb70@yonsei.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

**Table 1.** Antimicrobial resistance of ESBL producing *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in 1989 and 2010

Antibiotics	1989 (n=8)			2010 (n=35)		
	S	I	R	S	I	R
Ampicillin	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)
Cefalotin	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)
Cefamandole	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)
Cefoxitin	5 (62.5%)	1 (12.5%)	2 (25%)	28 (80%)	4 (11.4%)	3 (8.6%)
Ceftazidime	3 (37.5%)	0 (0%)	5 (62.5%)	19 (54.3%)	6 (17.1%)	10 (28.6%)
Cefotaxime	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	1 (2.9%)	34 (97.1%)
Cefepime	7 (87.5%)	1 (12.5%)	0 (0%)	13 (37.1%)	10 (28.6%)	12 (34.3%)
Cefoperazone/sulbactam	6 (75%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)	12 (34.3%)	10 (28.6%)	3 (8.6%)
Aztreonam	3 (37.5%)	4 (50%)	1 (12.5%)	11 (31.4%)	5 (14.3%)	19 (54.3%)
Piperacillin/tazobactam	4 (50%)	3 (37.5%)	1 (12.5%)	27 (77.1%)	8 (22.9%)	0 (0%)
Imipenem	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Amikacin	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	34 (97.1%)	0 (0%)	1 (2.9%)
Tobramycin	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	17 (48.6%)	7 (20%)	11 (31.4%)
Gentamicin	1 (12.5%)	1 (12.5%)	6 (75%)	19 (54.3%)	0 (0%)	16 (45.7%)
Sulfamethoxazole/trimethoprim	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)	11 (31.4%)	0 (0%)	24 (68.6%)
Ciprofloxacin	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (20%)	0 (0%)	28 (80%)

원에서 1989년에 분리한 126주의 요로병원성 대장균 (uropathogenic *Escherichia coli*)과 2010년에 분리한 175주의 요로병원성 대장균의 phylogenetic group과 ESBL 생성 빈도 및 관련 내성 유전자 분포의 변화, 균주간의 유사도를 비교 검토해보고자 하였다. 1989년 3월부터 12월까지 126명의 요로감염 환자의 소변검체에서 분리한 대장균 126주와 2010년 7월부터 2010년 12월까지 요로감염 환자 175명의 소변검체에서 분리한 대장균 175주를 대상으로 항균제 감수성 검사를 실시하여 ESBL 생성 요로병원성 대장균을 선별, 본 실험에 사용하였다. 선별된 ESBL 생성 요로병원성 대장균의 항균제 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012)의 기준에 따라 시행하였다 (Cockerill et al., 2012). 항균제 감수성 패턴을 확인하기 위해 disk diffusion method를 실시하였고, ESBL 생성 여부를 확인하기 위해 double disk synergy (DDS) test를 실시하였다 (Lee et al., 2004). Disk diffusion method를 이용한 항균제 감수성 검사 결과는 Table 1과 같다. 1989년도와 2010년도에 분리된 ESBL 생성 요로병원성 대장균은 ampicillin, cefalotin 및 cefamandole에 모두 내성이었다. Cefotaxime에 대한 항균제 감수성 결과는 1989년도 분리주에서 모두 내성 결과를 보였고, 2010년도 분리주의 경우 전체 35주 중 중간 결과를 보인 1주를 제외한 나머

지 34주 (97.1%)에서 내성 결과를 보였으며 특히 세균성 요로감염에 경험적 1차 치료제로 많이 사용되고 있는 fluoroquinolone계 항생제인 (Lee et al., 2003) ciprofloxacin에 대한 항균제 감수성 결과는 1989년 분리주의 경우 내성 균주가 없었던 반면 2010년 분리주의 경우 28주 (80%)가 내성으로 확인이 되었다. DDS 검사 결과 1989년도에 분리된 요로병원성 대장균 중 ESBL 양성인 균주는 126주 중 8주 (6.3%)였다. 2009년 국내 요로병원성 대장균의 항생제 내성에 관한 연구에서는 요로병원성 대장균이 ESBL 양성률이 10.2%라고 보고 (Song et al., 2009)된 바 있으나, 본 연구에서는 2010년도에 분리한 요로병원성 대장균 중 ESBL 양성인 균주가 175주 중 disk diffusion test에서 cefotaxime에 중간 결과 (intermediate)를 보이는 1개의 균주를 포함한 35주 (20%)가 ESBL 생성 균주였다.

ESBL 관련 유전자를 확인하기 위해 *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> 및 *bla*<sub>CTX-M-1, 2, 9 group</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>, *bla*<sub>PER</sub> 그리고 *bla*<sub>GES</sub>를 동시에 검출할 수 있는 다중중합연쇄효소반응 (Dallenne et al., 2010)을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 1989년에 분리한 ESBL 생성 요로병원성 대장균의 ESBL 유전자형은 *bla*<sub>TEM</sub>이 75%, *bla*<sub>OXA</sub>가 25%였고 *bla*<sub>SHV</sub> 및 *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER</sub>는 검출되지 않은 반면, 2010년에 분리한 ESBL 생성 요로병원성 대장균의 ESBL 유전자형은 *bla*<sub>CTX-M</sub>이 전체의

**Table 2.** Distribution of ESBL genotypes

ESBL genotype	year	
	1989	2010
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	6 (75%)	3 (8.6%)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	2 (25%)	0 (0%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1 group</sub>	0 (0%)	6 (17.1%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1 group</sub>	0 (0%)	3 (8.6%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1, 2 and 9 group</sub>	0 (0%)	18 (51.4%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2 and 9 group</sub>	0 (0%)	1 (2.9%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-2 and 9 group</sub>	0 (0%)	1 (2.9%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1 group</sub>	0 (0%)	2 (5.7%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1 group</sub> + <i>bla</i> <sub>PER</sub>	0 (0%)	1 (2.9%)
Total	8	35

91.4%였고, 1989년도 분리주와 다르게 35주 중 3주 (8.6%)만이 *bla*<sub>TEM</sub>을 단독으로 보유하고 있었다. 또한 *bla*<sub>TEM</sub>과 함께 *bla*<sub>CTX-M</sub>을 동시에 지니고 있는 경우가 31주 (88.6%)였으며, *bla*<sub>PER</sub> 1주, *bla*<sub>CTX-M</sub>을 단독으로 가지는 1개의 균주가 확인이 되었고, 2009년 Song 등의 한국 부산지역에서 분리된 ESBL 생성 요로병원성 대장균에 대한 연구와 (Song et al., 2009), 2010년 Li 등의 한국 광주지역에서 분리된 ESBL 생성 대장균에 대한 연구 (Li et al., 2010)의 결과와 다르게, 본 연구에서는 *bla*<sub>SHV</sub>를 가지는 균주는 없었다. 1998년도와 1999년도에 이루어진 국내 관련 연구에 따르면 국내 ESBL 생성 대장균은 TEM 형이 주를 이룬다고 하였다 (Pai, 1998; Pai et al., 1999). 본 연구에서는 강원도 원주지역에서, 지속적으로 분리된 균주를 대상으로 하지 않았지만, 과거 (1989년)에는 TEM 형의 유전자를 가지는 요로병원성 대장균이 주를 이루었으나 현재 (2010년)에는 TEM 형 유전자와 CTX-M 형 유전자를 함께 가지는 요로병원성 대장균이 주를 이루어, 만연하고 있는 ESBL 생성 요로병원성 대장균의 내성 유전자의 분포가 단독 TEM 형에서 TEM과 CTX-M을 함께 가지는 유형으로 바뀐 것을 확인 할 수 있었다. 한편 항생제 감수성 검사 결과 ceftazidime의 내성률이 2010년에 28.6%로 줄고, cefotaxime의 내성률이 97.1%로 증가하였는데, 이는 *bla*<sub>CTX-M</sub>을 보유한 균주의 증가에 의한 것으로 사료된다.

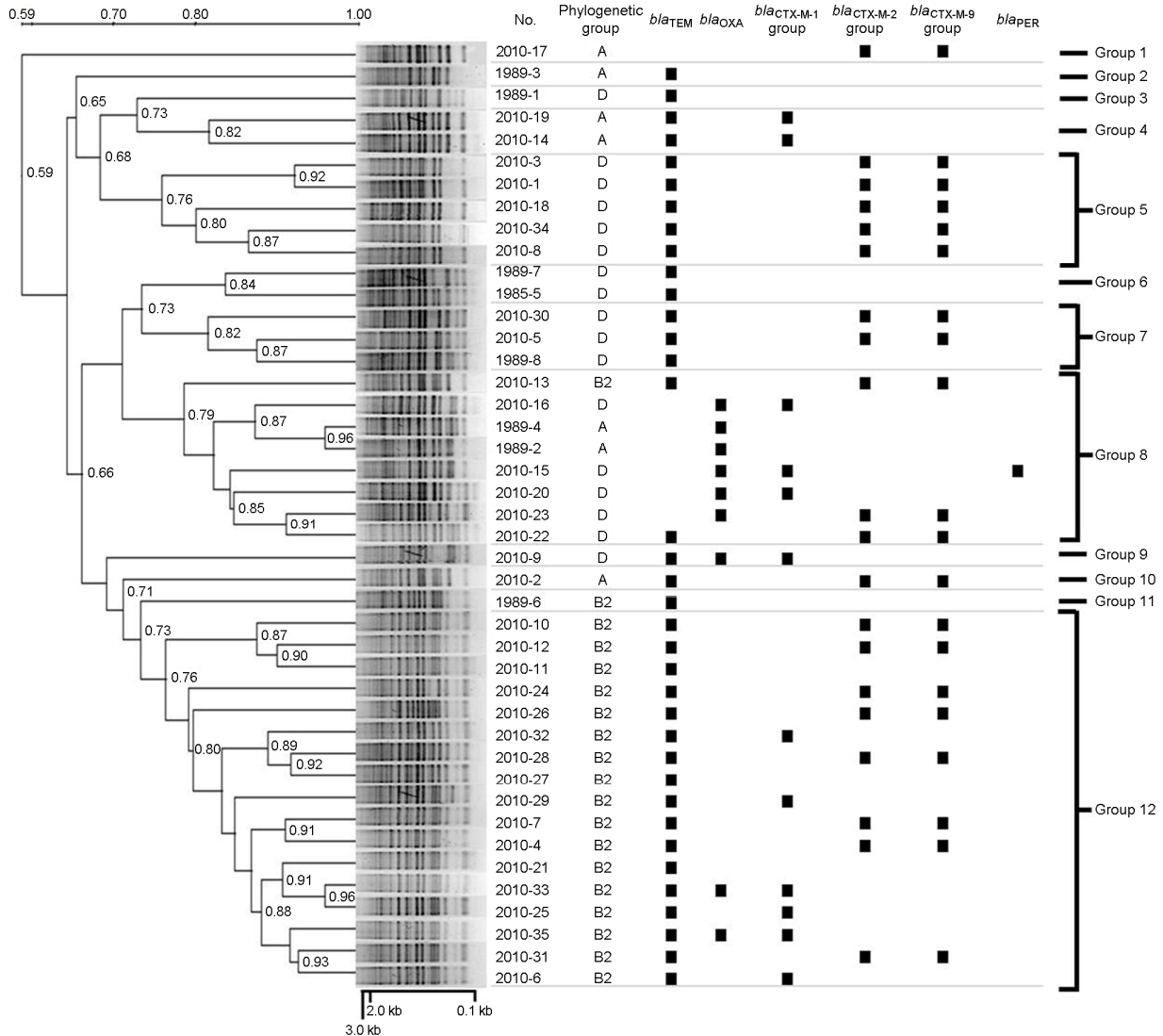
요로병원성 대장균의 phylogenetic group를 확인하기 위해 다중중합효소연쇄반응을 이용하였다 (Clermont et al., 2000). 1989년 분리주의 경우 D군이 50%로 가장 많

**Table 3.** Distribution of phylogenetic groups

Phylogenetic group	Year	
	1989	2010
A	3 (37.5%)	4 (11.4%)
B1	0 (0%)	0 (0%)
B2	1 (12.5%)	18 (51.4%)
D	4 (50%)	13 (37.1%)
Total	8	35

았던 반면, 2010년 분리주의 경우 B2군이 51.4%로 가장 많았다. 특히 B2와 D군의 경우 장외감염을 유발하는 대장균에 가장 많은 그룹으로 병원성이 높다고 알려져 있으며 (Bingen et al., 1998), 2009년 Song 등에 따르면 한국 부산지역에서 분리된 ESBL 생성 요로병원성 대장균의 phylogenetic group이 B2군의 분포가 51.9%로 보고하였는데 (Song et al., 2009), 본 연구의 결과 또한 2010년 분리주의 경우 35주 중 18주 (51.4%)가 B2군으로 비슷하였고, 1989년 분리주 8주 중 1주 (12.5%)가 B2군 이었던 것에 비해 2010년 분리주의 B2군의 분포가 높아졌음을 확인하였다 (Table 3).

1989년도와 2010년도에 분리한 ESBL 생성 요로병원성 대장균간에 유전자수준에서의 근연관계를 확인하기 위해 amplified fragment length polymorphism (AFLP)을 Janssen 등의 방법을 약간 변형하여 수행하였다 (Janssen et al., 1996; Gibson et al., 1998; Lim et al., 2010). AFLP를 수행한 결과 100 bp와 3 kb 사이에서 30개 이내의 DNA band를 확인할 수 있었다. 확인된 DNA band들은 Quantity One version 5.4.0 program (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 유전자형을 분석하였으며 UPGMA 법을 이용하여 dendrogram을 작성하였다. ESBL을 생성하는 요로병원성 대장균의 유전자형 유사성을 비교해 본 결과 몇몇의 균주를 제외하고 각기 다른 유전자 지문형을 나타내었고 유사도 65% 수준에서 크게 3개의 group를 형성하였고 세부적으로 유사도 76% 이상의 수준에서 유사성을 가지는 12개의 group을 형성하였다 (Fig. 1). Group 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12의 AFLP pattern을 살펴보면 분리된 시기에 따라 80%에서 96%수준까지 유사도가 높은 group을 형성하였고, group 4, 5, 6, 7, 12의 경우 phylogenetic group에 따라 같은 group으로 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, group 4, 5, 6의 경우 phylogenetic group과 ESBL genotype이 완벽히 일치했고, group 1을 제외한 다른 group의 경우



**Fig. 1.** Dendrogram of the similarity index among ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection in 1989 and 2010 by AFLP analysis. Dendrogram consist of phylogenetic groups (A, B1, B2 and D), ESBL genotypes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> group, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group and *bla*<sub>PER</sub>) and AFLP groups (1 to 12).

phylogenetic group과 ESBL genotype이 완벽히 일치하지는 않지만, 유사도 65% 이상에서 phylogenetic group 및 ESBL genotype이 비슷하였다. Group 1의 경우 유일하게 CTX-M 형의 ESBL 관련 유전자만을 가지고 있었으며 단독 group이 형성되었다. 주목할 점은 전체 세균 중 41.9%를 차지하는 11과 12 group은 phylogenetic group B2군에 속하면서 73%의 높은 유사도를 형성하였는데, 같은 지역에서 분리시기만이 다른 균주를 대상으로 조사한 점으로 미루어 보았을 때 ESBL 생성 요로병원성 대장균들 중 B2군의 확산은 클론 확산 (clonal spread)에 의한 것으로 보인다.

2011년 국내 연구에 따르면 2002년과 2006년 사이에 분리된 요로병원성 세균들의 fluoroquinolone계와 sulfamethoxazole/trimethoprim과 같은 항생제의 내성률이 높아 3세대 cephalosporin계 항생제가 가장 이상적인 세균성 방광염의 치료제라고 하였다 (Lee et al., 2011). 하지만 ESBL 생성 요로병원성 대장균은 시간이 지남에 따라 지속적으로 증가하였다. 따라서 1차적인 경험적 치료제의 선택이 3세대 cephalosporin계 항생제로 국한되지 않고 다른 항생제로의 대체도 고려할 필요성이 있으리라 생각이 되며, 앞으로도 ESBL 생성 요로병원성 대장균에 대한 지속적인 모니터링이 실시된다면 요로병원성 대장균에 의한 요

로감염의 치료 방향을 결정 하는데 있어 도움이 되리라 사료된다.

#### Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (PJ907017042013)의 지원을 받아 수행하였습니다.

#### REFERENCES

- Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, Denamur E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J infect Dis.* 1998. 177: 642-650.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000. 66: 4555-4558.
- Cockerill F, Wikler M, Alder J, Dudley M, Eliopoulos G, Ferraro M, Hardy D, Hecht D, Hindler J, Patel J, Powell M, Swenson J, Thomson R, Traczewski M, Turnidge J, Weinstein M, Zimmer B. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement. *Clinical Laboratory Standards Institute.* 2010. 32.
- Dallenne C, Costa AD, Decre'D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010. 65: 490-495.
- Gibson JR, Slater E, Xerry J, Tompkins DS, Owen RJ. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1998. 36: 2580.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol.* 1996. 142: 1881-1893.
- Lee GS and Kim JB. Patterns of antimicrobial resistance and genotyping of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing clinical isolates in Korea. *J Exp Biomed Sci.* 2007. 13: 293-304.
- Lee KN, Kim WJ, Lee YH. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital, Korea. *Korean J Microbiol.* 2004. 40: 295-301.
- Lee SJ, Cho YH, Kim BW, Lee JG, Jung SI, Lee SD, Lee SE, Kim ME, Choi YD, Rim JS, Sim BS, Cho IR, Ryu SB, Kim CS, Kim WJ, Lee TY. A multicenter study of antimicrobial susceptibility of uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in woman. *Korean J Urol.* 2003. 44: 697-701.
- Lee SJ, Lee DS, Choe HS, Shim BS, Kim CS, Kim ME, Cho YH. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infection: results from Korean antimicrobial resistance monitoring system. *J Infect Chemother.* 2011. 17: 440-446.
- Li D, Liu B, Guo X, Liu F, Feng L, Wang L. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods.* 2010. 82: 71-77.
- Li XM, Jang SJ, Bae IK, Park G, Kim YS, Shin JH, Moon DS, Park YJ. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamase Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* over a three-year period in a university hospital in Korea. *Korean J Lab Med.* 2010. 30: 616-623.
- Lim KH, Lee GS, Park M, Lee JH, Suh IB, Ryu SW, Eom YB, Kim JB. Genetic relationship between SCCmec types and virulence factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clinical isolates in Korea. *J Exp Biomed Sci.* 2010. 16: 75-82.
- Pai HJ. The characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Korean isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Med J.* 1998. 39: 514-519.
- Pai HJ, Lyu S, Lee JH, Kim JM, Kwon Y, Kim JW, Choe KW. Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol.* 1999. 37: 1758.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005. 18: 657.
- Ryoo NH, Jeon DS, Kim JR, Jeon CH, Suh HS. Moleculoeptideological characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in Daegu. *Korean J Lab Med.* 2004. 24: 96-106.
- Song SW, Lee EY, Koh EM, Ha HS, Jeong HJ, Bae IK, Jeong SH. Antibiotic resistance mechanisms of *Escherichia coli* isolates from urinary specimens. *Korean J Lab Med.* 2009. 29: 17-24.