

Spread of CTX-M Extended-spectrum β -lactamase Producing *Escherichia coli* in the Community in Chungcheong Area, Korea

Ji Youn Sung, Ji-Eun Oh, Eun Sun Kim, Ja Min Son, Hye Yeon Kim, and Da Young Lim

Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong 369-700, Korea

This study was designed to evaluate the prevalence of ESBL genes and monitor antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli*, isolated from a hospital and a community. We tested 200 *E. coli* strains isolated in the hospitals and community in Chungcheong area from January to March 2012. Antimicrobial susceptibilities were tested by using the disk diffusion method. A search for ESBL genes was conducted by PCR amplification, and the genotypes were determined by direct nucleotide sequence analysis of the amplified products. An Epidemiologic study was performed by repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR). The percentage of ESBL-producing isolates was 17% for hospital associated *E. coli* and 11% for community associated *E. coli*. The ESBL gene sequencing results showed that the most common ESBL in *E. coli* was CTX-M-14 (19/28), followed by CTX-M-15 (9/28). The REP-PCR study also showed the genetic diversity, but there was no difference between the hospital and community associated *E. coli*. In this study, the most common types of class A ESBLs identified were CTX-M in the hospital and the community in Chungcheong area. ESBL-producing *E. coli* isolates showed diverse clonality.

Keywords: ESBL, *Escherichia coli*, CTX-M, community, REP-PCR

Corresponding author: Ji Youn Sung
Department of Biomedical Laboratory Science,
Far East University, Wangjang-ri,
Ganggok-myeon, Eumseong-gun, Chungbuk
369-700, Korea.
Tel: 82-43-879-3668
E-mail: azaza72@naver.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 The Korean Society of Clinical Laboratory Sciences. All rights reserved.

Received: January 29, 2013
Revised: February 7, 2013
Accepted: June 19, 2013

서론

대장균은 정상적인 인체의 대장에 존재하는 정상균 무리 중 하나지만, 일부 대장균은 기회감염을 유발하며 요로감염, 폐렴, 균혈증 등 중증감염을 일으키기도 한다(Nataro와 Kaper, 1998). 대장균에 의한 감염을 치료하기 위해 가장 많이 사용되는 항균제는 β -lactam 계열의 항균제이나 최근 extended-spectrum β -lactamases (ESBL) 생성 대장균의 증가로 감염환자를 치료하는 데 있어서 항균제의 선택이 어려운 경우가 많아졌다. 왜냐하면 ESBL을 생성하는 대장균은 penicillin, 헤파범위 및 광범위 cephalosporin과 monobactam 등의 carbapenem을 제외한 β -lactam계 항균제 대부분에 내성이고 aminoglycoside 및 trimethoprim-sulfamethoxazole 등 다른 계열의 항균제에도 다제내성인 경우가 많기 때문이다(Hong 등, 2001; Lee 등, 2001; Yang, 2007).

대장균에서 분리되는 주된 ESBL은 TEM, SHV 및 CTX-M형 등

이나, 최근 특징적으로 CTX-M형 ESBL을 생성하는 대장균이 지역사회에서 매우 증가되고 있다. Rodríguez-Baño 등(2010)은 ESBL 생성 대장균에 의한 혈류감염의 19%가 지역사회에서 획득하여 발생한 것으로 보고하였으며, 지역사회 발생 ESBL생성 대장균은 fluoroquinolone 및 amnoglycoside등을 포함한 여러 항균제에 내성을 보인다고 하였다. 국내에서도 급성요로감염으로 외래를 방문하는 환자에서 동정된 대장균 중 ESBL을 생성하는 균이 11.8%를 차지한 것으로 보고된 바 있는데 이는 ESBL 생성 대장균이 국내 지역사회에서도 증가하고 있음을 시사한다(Kang 등, 2008).

따라서 본 연구자들은 지역사회에서 ESBL생성 대장균의 검출 빈도를 조사하고 ESBL의 유전자형 분석을 포함한 분자역학적 연구를 시행하여 국내의 지역사회 발생 대장균의 유전적 특징을 살펴보았다. 또한 동 기간에 같은 지역에 위치한 일 개의 대학병원에 내원한 환자에서 분리된 ESBL 생성 대장균의 ESBL 유전자형을 동시에 분석하여 지역사회에서 분리된 ESBL 유전자형과 유전적 특징을 비

교 분석하였다. 이러한 ESBL 유전자형의 분포 및 변화추이를 추적한 결과는 ESBL의 전파양상이나 돌발 감염 가능성 등을 숙고하기 위한 기초자료가 될 것이며 ESBL 생성균의 전파를 막기 위한 대응 전략 수립에 유용할 것이다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집

2012년 1월 1일부터 3월 20일까지 충청지역에 위치한 일개의 대학병원 진단검사의학과 미생물 검사실에서 분리된 대장균 102주와, 같은 지역에 위치한 일개의 대학에 재학 중인 건강한 학생들로부터 분리된 대장균 98주를 대상으로 하였다. 동일인에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 동정은 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo, USA) 및 전통적인 생화학적 동정방법을 이용하여 시행하였다.

2. 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성확인시험

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 확인시험을 시행하였다(CLSI, 2010). Mueller-Hinton 한천배지 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에 McFarland 0.5 탁도의 균액을 바른 후 cefotaxime (BBL, 30 µg)과 cefotaxime/clavulanic acid (CTC) (BBL, 30/10 µg), ceftazidime (BBL, 30 µg)과 ceftazidime/clavulanic acid (CZC) (BBL, 30/10 µg) 디스크를 놓고 35°C에서 16~18시간 배양 후 억제대를 측정하여 CTC 또는 CZC에 의한 억제대가 cefotaxime과 ceftazidime에 의한 억제대보다 5 mm 이상 클 경우 ESBL 생성 양성균주로 판정하였다.

3. 항균제 감수성 시험

대상 균주를 MacConkey 배지에 계대배양하여 35°C 항온기에서 하룻밤 배양한 후 CLSI 기준에 따라 디스크 확산법으로 항균제 감수성 시험을 하였다(CLSI, 2010). 시험한 항균제는 ampicillin, aztreonam, cefepime, cefotaxime 및 ceftazidime 이다. 정도관리를 위해서 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

4. ESBL 유전자의 검출 및 유전형 확인

ESBL 유전자를 검출하기 위해 기존의 시발체(Table 1)를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액으로부터 DNA purification kit (SolGent, Daejeon, Korea)을 사용하여 염색체 DNA를 추출하였다. DNA 추출액 (5 µL), 10× Taq buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (SolGent) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 40 분간 전기영동하여 band를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 분리 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for the detection of ESBL genes

Target gene	Primer pairs	Sequence (5'~3')	Reference
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F SHV-R	GGGTTATTCTTATTTGTCGCT TAGCGTTGCCAGTGCTCG	Li et al., 2010
<i>bla_{CTX-M-1} cluster</i>	CTX-1-un-F CTX-1-un-R	SCSATGTGCAGYACCGATAA CCGCRATATCRTTGGTGGTG	Li et al., 2010
<i>bla_{CTX-M-1} cluster</i>	CTX-1-gr-F CTX-1-gr-R	CCCATGGTTAAAAAATCACTG CCGTTTCCGCTATTACAAAC	Li et al., 2010
<i>bla_{CTX-M-9} cluster</i>	CTX-M-9-F CTX-M-9-R	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	Li et al., 2010
<i>bla_{GES/IBC}</i>	GES/IBC-F GES/IBC-R	GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT TGTCGGTGCTCAGGATGAGT	Li et al., 2010
<i>bla_{VEB}</i>	VEB-F VEB-R	ACCAGATAGGAGTACAGACATATGA TTCATCACCCGCGATAAAGCAC	Li et al., 2010

F, forward; R, reverse.

5. Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR)을 이용한 ESBL 생성균주의 역학적 연관성 조사

ESBL을 생성하는 균주를 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액으로부터 DNA purification kit (SolGent)를 사용하여 대상 균주의 염색체 DNA를 추출하였다. 추출된 염색체 DNA를 주형 DNA로 사용하였고 시발체로는 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')와 REP2-Dt (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3')로 명명된 장내세균의 반복 서열을 이용하였다(Shannon 과 French, 2004). 증폭반응은 DNA 추출액 (5.0 µL), 10× Taq buffer (5.0 µL), 10 mM dNTP mix (1.0 µL), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (SolGent) 및 증류수를 혼합하여 50 µL의 혼합액으로 시행하였다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 68°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물 (10 µL)은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gels에 전기영동한 후 BioDoc-14 Imagingsystem (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. Band의 강도와 상관없이 band의 분자량과 개수로 각 균주를 비교하며, 두 개 이상의 밴드 차이가 있으면 역학적 상관관계가 없는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

병원발생 균주(N=102) 및 지역사회발생 균주(N=98)를 대상으로 항균제 감수성 시험을 한 결과 두 그룹 모두 cefepime 및 ceftazidime에 대해 높은 감수성률을 보였다(Table 2). 또한 지역사회발생 균주가 병원발생 균주에 비해 대부분의 항균제에 높은 감수성률을 나타냈다.

한편 ESBL 생성 균주의 경우 포함하고 있는 ESBL 유전자의 유전형에 따라 항균제 감수성 양상이 다르게 나타났는데, CTX-M-15형 유전자를 포함하는 균주는 CTX-M-14형 유전자를 포함하는 균주에 비해 aztreonam, cefepime, cefotaxime 및 ceftazidime등에 대해 높은 가수분해능을 보였다(Table 3).

2. 분자생물학적인 방법에 의한 ESBL 유전자 검출

Ambler class A에 속하는 ESBL (*bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*)유전자 검출을 위해 총 200균주의 대장균을 대상으로 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 *bla_{CTX-M}*에 대해 28균주(14%)가 양성 반응을 보였다. 이 중 한 균주는 *bla_{SHV}*에도 동시에 양성반응을 보였다. 그 외 class A에 속하는 *bla_{VEB}* 및 *bla_{GES}*에 대해서는 대상균주 모두 음성반응을 보였다. 유전자의 유전형을 결정하기 위해 염기서열분석을 실시한 결과 28개의 CTX-M형 유전자 증폭산물은 각각 CTX-M-14형과(19균주) CTX-M-15형으로(9균주) 확인되었다. 또한 *bla_{SHV}* 유전자 증폭산물의 염기서열은 *bla_{SHV-12}* 유전자의 염기

Table 2. Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* involved in this study

Antimicrobial agents	Numbers of hospital-associated strains			Numbers of community-associated strains		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin	37	2	62	42	2	56
Aztreonam	90	4	6	93	2	5
Cefepime	94	1	5	96	1	3
Cefotaxime	82	6	12	87	5	8
Ceftazidime	93	6	1	96	2	2

Table 3. Antimicrobial susceptibility patterns of ESBL producing *Escherichia coli* strains

Antimicrobial agents	Rate of ESBL producing <i>E. coli</i> (%)					
	CTX-M-14 producing <i>E. coli</i>			CTX-M-15 producing <i>E. coli</i>		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin	0	0	100	0	0	100
Aztreonam	82	18	0	0	20	80
Cefepime	100	0	0	20	0	80
Cefotaxime	18	46	36	0	0	100
Ceftazidime	100	0	0	0	80	20

서열과 일치하였다(Table 4).

한편 ESBL을 생성하는 28균주 중 17균주는 병원발생 균주였고 11균주는 지역사회발생 균주였다. ESBL 유전자의 유전형은 병원 발생 균주와 지역사회발생 균주 모두 유사하였으며 대부분의 균주가 CTX-M-15 또는 CTX-M-14형을 가지고 있음이 확인되었다.

3. ESBL 생성 대장균의 유전형 분석

ESBL생성 대장균 28균주를 대상으로 REP-PCR을 수행한 결과 매우 다양한 REP-PCR 패턴이 나타났다. 이는 ESBL을 생성하는 대 장균들이 서로 유전적으로 연관성이 적음을 의미한다(Fig. 1).

고 찰

ESBL 생성 세균의 비율은 지역과 균종에 따라 차이가 큰데 국내 에서 시행된 전국규모의 연구에서 ESBL생성 대장균 비율은 9.2-14.2%인 것으로 나타났다(Ko 등, 2008; Song 등, 2009). 본 연구에서도 연구에 포함된 균주의 14%가 ESBL을 생성하는 것으로 나타나 한국의 평균빈도와 유사하였다. 또한 병원발생 균주에서의 ESBL 생성빈도(17%)가 지역사회발생 균주의 ESBL 생성빈도(11%) 보다 약간 높은 것으로 나타났다. 그러나 지역사회발생 균주 중 11 균주가 ESBL 유전자를 가지고 있는 것으로 보아 이미 병원뿐 만 아니라 지역사회에도 ESBL 유전자가 널리 퍼져있는 것으로 사료된 다.

Table 4. Prevalence of ESBL gene types detected in *E. coli* isolates

ESBL gene type	Numbers of ESBL producer	
	Hospital-associated	Community-associated
CTX-M type		
CTX-M-14	11	8
CTX-M-15	5	3
Mixed ESBLs		
CTM-M-15+SHV-12	1	-
Total	17	11

한편 국내에서 분리되는 대장균에서 가장 유행하는 ESBL형은 SHV-12와 CTX-M형이었다(Kim 등, 2005; Jeong 등, 2004). 그러나 최근에는 CTX-M형 특히 CTX-M-14형과 CTX-M-15형의 빈도가 높아지고 있다(Park 등, 2009). 대전지역에 위치한 일개의 대학병원에서 분리된 대장균을 병원발생 균주와 지역사회발생 균 주로 분류하여 연구한 결과에서도 CTX-M형이 주로 검출되었으며 CTX-M-14형이 49.6%, CTX-M-15형이 38.1%이었고 이 두 가지 형을 동시에 가지고 있는 균주가 12.2% 이었다고 하였다(Park 등, 2012). 본 연구에서도 ESBL 유전자를 포함하고 있는 28균주를 대 상으로 ESBL의 유전형을 분석한 결과 모든 균주가 CTX-M형을 가 지고 있는 것이 확인되었다. 이 중 한 균주는 CTX-M형뿐만 아니라 SHV-12형을 동시에 가지고 있는 것으로 나타났다. 그리고 CTX-M형 중에서도 CTX-M-14형이 19균주, CTX-M-15형이 9 균주로 CTX-M-14형이 더 흔히 분리되어 이전의 보고들과 유사한 결과를 보였다(Ko 등, 2008; Song 등, 2009; Park 등, 2012).

본 연구에서 검출된 CTX-M형 유전자를 포함하는 균주들의 항 균제 감수성 검사 결과를 비교한 결과 CTX-M-15형 유전자를 포 함하는 균주는 CTX-M-14형 유전자를 포함하는 균주보다 az-treonom, cefepime, cefotaxime 및 ceftazidime에 대해 더 높은 내성률을 보였다. 또한 CTX-M-14형 유전자를 포함하는 균주는 ceftazidime보다 cefotaxime에 대해 훨씬 더 높은 내성률을 나타 냈는데 이는 이전의 보고와 유사하였다(Song 등, 2009; Park 등, 2012).

ESBL을 생성하는 총 28균주를 대상으로 REP-PCR을 시행한 결 과 ESBL을 생성하는 대장균은 매우 다양한 clonality를 보였다 (Fig. 1). 이 중 병원발생 균주에서 보여진 REP-PCR 패턴과 지역사 회발생 균주에서 보여진 REP-PCR 패턴이 동일한 경우가 있었다. 이는 지역사회 또는 병원에만 국한된 clone이 있기보다는 이미 지 역사회와 병원의 경계가 없어지고 ESBL 생성 대장균이 지역사회에 빠르게 전파되고 있으며 또한 지역사회에서 병원으로 유입되고 있 음을 시사한다.

본 연구에서 지역사회발생 균주와 병원발생 균주 간의 항균제

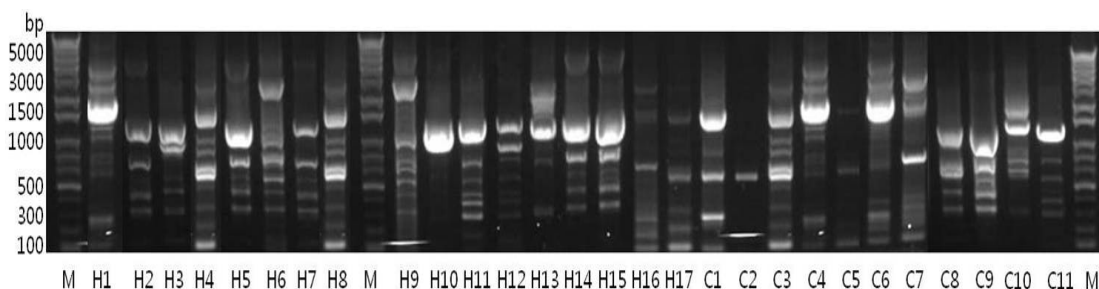


Fig. 1. Repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR patterns of genomic DNA from extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates. Lane M, 1-kb DNA size marker; H, Hospital associated *Escherichia coli*; C, community associated *E. coli*.

내성률이 크게 차이가 나지 않았으며 ESBL 유전자를 포함하고 있는 대장균이 지역사회에서 높은 빈도로 검출되었다. 또한 병원발생 균주 및 지역사회발생 균주 간의 뚜렷한 유전적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 이미 지역사회와 병원간의 경계가 허물어지고 있음을 의미한다. 따라서 ESBL 생성 대장균의 병원내 전파 및 지역사회로부터의 유입 차단을 위해 지속적으로 ESBL 생성 대장균의 검출 빈도와 분포, 유전형의 변화 양상을 감시해야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. 2010, p52-53. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Hong SG, Kang MS, Choi JR, Lee KW, Chong YS, Kwon OH. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Korean J Clin Pathol*. 2001, 21: 495-504.
- Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol*. 2004, 42: 2902-2906.
- Kang CI, Cheong HS, Chung DR, Peck KR, Song JH, Oh MD, et al. Clinical features and outcome of community-onset bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008, 27:85-88.
- Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y, Lee JC, Seol SY, et al. CTX-M and SHV-12 beta-lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. *FEMS Microbiol Lett*. 2005, 245:93-98.
- Ko KS, Lee MY, Song JH, Lee H, Jung DS, Jung SI, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008, 61:453-459.
- Lee BY, Jeong SH, Jeong TS, Nam HJ, Ji JH, Hong YR. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with the Vitek GNS 121 card. *Korean J Clin Pathol*. 2001, 21:350-354.
- Li XM, Jan SJ, Bae IK, Park G, Kim YS, Shin JH, et al. Frequency of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -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.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998, 11:142-201.
- Park SH, Byun JH, Choi SM, Lee DG, Kim SH, Kwon JC, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15. *BMC Infect Dis*. 2012, 12:149-160.
- Park Y, Kang HK, Bae IK, Kim J, Kim JS, Uh Y, et al. Prevalence of the extended-spectrum β -lactamase and *qnr* genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Korean J Lab Med*. 2009, 29:218-223.
- Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*. 2010, 50:40-48.
- Shannon KP, French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother*. 2004, 53:818-825.
- Song W, Lee H, Lee K, Jeong SH, Bae IK, Kim JS, et al. CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *J Med Microbiol*. 2009, 58:261-266.
- Yang BS. Multiplex PCR for detection of quinolone resistance *qnr* genes in extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Clin Lab Sci*. 2007, 39:161-166.