

< Original Article >

낙동강과 금호강에서 분리된 광범위 베타 락탐 분해효소 생성 *Escherichia coli* 내 항균제 내성 및 integrons의 분포

조재근¹ · 김환득¹ · 권순효¹ · 김진현² · 장성일¹ · 박최규³ · 김기석^{3*}
대구광역시보건환경연구원¹, 경상북도가축위생시험소², 경북대학교 수의과대학³

Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* isolated from Nakdong and Gumho river

Jae-Keun Cho¹, Hwan-Deuk Kim¹, Soon-Hyo Kwon¹, Jin-Hyun Kim²,
Sung-Il Jang¹, Choi-Kyu Park³, Ki-Seuk Kim^{3*}

¹Metropolitan Health & Environmental Research Institute, Daegu 706-732, Korea

²Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-911, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 2 January 2014; revised 10 February 2014; accepted 4 March 2014)

Abstract

This study was conducted to investigate the antimicrobial resistance, presence of β -lactamase genes and integrons in 83 ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from Nakdong river and Geumho river in Daegu. Among the β -lactam antimicrobials, all isolates were resistant to ampicillin, cephalothin, cefamandole and cefotaxime, followed by piperacillin (98.8%), ampicillin/sulbactam (86.7%), aztreonam (60.2%) and cefepime (59.0%), whereas resistance to piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid and cefoxitin was less than 30%. Many of the ESBL-producing *Escherichia coli* were also resistant to non- β -lactams antimicrobials such as nalidixic acid (83.1%), sulfonamides (72.3%), ciprofloxacin (62.7%) and gentamicin (38.6%). All isolates showed resistance to seven or more antimicrobial agents. The most frequently detected gene was *bla*_{TEM+CTX-M} (49.4%), followed by *bla*_{CTX-M} (27.7%), *bla*_{TEM} (6.0%) and *bla*_{OXA} (1.2%). But *bla*_{SHV} was not found. Class 1 integrons were found in 61.4% (51 isolates) of isolates, however, class 2 and 3 integrons were not detected. The results showed water from Nakdong river and Geumho river is contaminated with ESBL-producing *E. coli* isolates. These results suggest the need for further investigation of antibiotic resistant bacteria to prevent public health impacts in the water environment.

Key words : River water, *E. coli*, Antimicrobial resistance, ESBL, Integron

서 론

항생제는 감염성 질병의 치료뿐만 아니라 질병의 예방과 성장을 촉진시키기 위하여 널리 사용되고 있으나, 항생제의 과다한 사용은 항생제 내성균의 출현

을 가속화 할 수 있다(Rosenberg, 2001).

항생제 내성균은 하수와 슬러지, 침전물 및 강물 같은 수중환경에서 발견되고 있고(Ash 등, 2002; Roe 등, 2003; Reinthaler 등, 2010), 수중 환경에서의 항생제 내성균의 출현은 주로 폐수처리장, 축산농가 및 병원 등의 방류수 및 처리되지 않은 폐수 등의 직접적인 방류로 강과 하천으로 유입됨으로써 야기된다

*Corresponding author: Ki-Seuk Kim, Tel. +82-53-950-5962,
Fax. +82-53-950-5955, E-mail. kimkiseuk@knu.ac.kr

(Peak 등, 2007; Ferreira da Silva 등, 2010; Reinthaler 등, 2010). 또한, 인간은 수계와의 직·간접적인 접촉을 통해 항생제 내성균에 감염될 수 있어 수중환경에서 이들 항생제 내성균의 존재는 공중보건학적 측면에서 문제가 될 수 있다.

Integron 내 gene cassettes에는 여러 가지 항생제 내성 유전자를 포함하고 있어, plasmid와 transposon을 통한 integron의 수평전파는 항생제 내성 유전자의 전파에 중요한 역할을 한다(Martinez, 2009). 각각의 integrase (*int I*) gene에 따라 4종류의 integron이 확인되고 있으며, 이중 class 1 integron은 그람음성균에서 가장 흔히 발견되고 있고, 다제내성과도 밀접한 관련이 있다(Yu 등, 2003; Cambray 등, 2010).

Extended-spectrum β -lactamases (ESBL)는 가수분해 활성범위가 매우 넓은 효소로 penicillin 뿐만 아니라 cefotaxime과 ceftazidime 같은 3세대 cephalosporins 및 aztreonam 등의 광범위 항생제도 가수분해하지만, 한편으로 clavulanic acid와 sulbactam 등 β -lactamases inhibitor에 의해서는 활성이 억제되는 특징이 있다(Oliver 등, 1999). 1980년대 이후 여러 나라에서 다양한 유형의 ESBL 생성균주가 분리되고 있으며, 그 출현빈도 또한 증가하고 있다. ESBL은 주로 *Escherichia (E. coli)*와 *Klebsiella (K) pneumoniae*에서 흔히 발견되고 있으며, 이들 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 쉽게 전파될 수 있다(Baquero 등, 2008). 국내에서는 1990년대 초 ESBL의 존재가 처음 보고된 이후, ESBL을 생산하는 균주가 증가하고 있어 임상에서 매우 심각한 문제로 대두되고 있다. 더욱이 최근 들어 ESBL은 국내 한강 등 주요 하천에서 검출되고 있고, 이들의 유형도 TEM, SHV, OXA 및 CTM형 등 매우 다양하여 항생제 내성관리 대책에서도 중요하게 다루어져야 할 것으로 사료된다(Kim, 2008; Kim 등, 2012; Jang 등, 2013).

낙동강은 대구 분지를 지나 부산 서쪽에서 분류되어 남해로 들어가며, 금호강은 대구시를 돌아 흐르는 낙동강의 지류로 이들 강물은 대구시의 식수와 산업용수를 공급되고 있다. 이번 연구에서는 낙동강과 금호강으로부터 ESBL 생성 *E. coli*를 분리하고, 이들 균주를 대상으로 항생제 내성양상, ESBL 유전자 및 integrons의 분포를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

Cefotaxime 내성 *E. coli*의 분리

2011년 1월부터 12월까지 낙동강 유역 10개 하천 및 금호강 유역 12개 하천 지점으로부터 매월 1회씩 12회에 걸쳐 총 264개의 하천수를 채취하였다. 채취한 하천수(500 mL)는 ice box에 넣고 실험실로 운반 후 즉시 실험에 공하였다. 채취한 물은 확산 집락이 없고 평판 당 30~300개의 집락을 얻을 수 있도록 단계 희석 후(10^0 , 10^1 및 10^2), cefotaxime (2 $\mu\text{g/mL}$, Sigma, USA)이 첨가된 MacConkey agar (Oxoid, England) 평판배지에 고르게 도말한 다음 37°C에서 18시간 배양하였다. *E. coli*로 의심되는 집락을 평판 당 4~5개를 선택하여 EMB agar (Oxoid, England)에 37°C에서 18시간 배양한 후, 금속성 광택을 나타낸 집락을 선택하여 생화학 검사와 Vitek 2 compact (BioMerieux, S.A., France)를 이용하여 동정하였다.

ESBL 생성 균주의 검출

ESBL 생성 균주의 확인은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)의 기준에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다. 공시균을 Mueller-Hinton broth (Oxoid, UK)에 접종하고 37°C에서 2~4시간 배양하여 균 농도를 McFarland No. 0.5로 조정한 후 멸균면봉을 이용하여 Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) 평판배지에 고르게 도포한 다음, ceftazidime (30 μg)과 ceftazidime/clavulanic acid (30/10 μg), cefotaxime (30 μg)과 cefotaxime/clavulanic acid (30/10 μg)이 함유된 디스크를 놓고 37°C에서 16~18시간 배양 후 균 억제대의 크기를 측정하였다. 두 디스크사이에서 상승효과에 의한 억제대의 크기가 5 mm 이상으로 관찰되면 ESBL 생성균주로 판정하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Bauer 등(1996)의 디스크 확산법을 이용하여 실시하였고, 내성 여부는 CLSI (2012)의 기준에 따라 판독하였다. 사용한 항생제 디스크 (Oxoid, UK)는 ampicillin (10 μg), piperacillin (100 μg), ampicillin/sulbactam (10/10 μg), piperacillin/tazobactam (100/10 μg), ticarcillin/clavulanic acid (75/10 μg), cephalothin (30 μg), cefepime (30 μg), cefotaxime (30 μg),

cefoxitin (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefamandole (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), nalidixic acid (30 µg) 및 sulfonamides (300 µg) 등 16종이었다. 항생제 감수성 시험을 위한 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

Genomic DNA 추출

공시균에 대한 genomic DNA 추출은 boiling법으로 실시하였다(Mazel 등, 2000). 간단히 설명하면, tryptic soy broth (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 진탕 배양하여 얻은 균 부유액 1.0 mL를 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 다음 멸균 증류수 0.5 mL로 재 부유하였다. 균 부유액은 끓는 물에 10분간 가열한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 template DNA로 사용하였다.

β-lactamase 유전자 및 integron 검출

TEM, OXA, SHV, CTX-M, class 1, 2 및 3 integron의 검출을 위한 PCR primer는 Table 1과 같다. PCR 반응은 2X TOPsimple DyeMix (aliquot)-HOT (Enzymomics, Korea)에 각각의 10 pmol primer 1 µL와 template DNA 1 µL를 넣은 후 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 반응량이 20 µL가 되게 하여 Tprofessional Thermal Cycler (Biometra, Germany)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 이전 연구자들(Table 1)의 방법에 준하여

초기 denaturation 후, denaturation, annealing, extension 과정을 반복하고 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 실시한 후 UV transilluminator (Biometra, Germany)를 이용하여 확인하였다.

결 과

ESBL 산생 *E. coli*

cefotaxime (2 µg/mL)이 첨가된 MA 평판배지에서 총 209주의 *E. coli*가 분리되었으며, ESBL 생성 균주의 확인시험 결과 이들 균주 중 83주가 ESBL 생성 *E. coli*로 확인되었다.

항생제 감수성 시험

ESBL 생성 *E. coli*에 대한 항생제 감수성 시험을 실시한 결과는 Table 2와 같았다. β-lactam계 항생제의 경우 penicillin계에는 ampicillin에 100%, piperacillin에 98.8%의 내성률을 나타내었다. β-lactamase 억제제의 경우 sulbactam/ampicillin에 86.7%, piperacillin/tazobactam에 18.1% 그리고 ticarcillin/clavulanic acid에 16.9%의 내성률을 나타내었다. cephem계의 경우 cephalothin, cefotaxime 및 cefamandole에 대하여는 공시균 모두가 내성을 나타내었고, cefepime, ceftazidime 및 cefoxitin에는 각각 59.0%, 28.9% 및 6.0%의 내성률을 나타내었다. Monobactam계인 aztreonam에는 60.2%의

Table 1. Primer Sequence for PCR analysis

Primer name	Sequence (5' to 3')	Annealing temp. (°C)	PCR product size (bp)	Reference
TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	60	1,150	Belaouaj 등(1994)
TEM-R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC			
SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	50	885	Pitout 등(1998)
SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
CTX-M-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	62	857	Coque 등(2002)
CTX-M-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
OXA-F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	61	813	Steward 등(2001)
OXA-R	TCCGAGTTGACTGCCGGTTG			
int I 1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	62	483	Mazel 등(2000)
int I 1-R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG			
int I 2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	62	788	Mazel 등(2000)
int I 2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
int I 3-F	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	62	1,042	Mazel 등(2000)
int I 3-R	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			

Table 2. Antimicrobial resistance patterns of 83 ESBL-producing *E. coli*

Classification	Antimicrobial agents	No. (%) of resistant strains
Penicillins	Ampicillin	83 (100)
	Piperacillin	82 (98.8)
β-lactamase inhibitors	Ampicillin/sulbactam	72 (86.7)
	Piperacillin/tazobactam	15 (18.1)
	Ticarcillin/clavulanic acid	14 (16.9)
Cephems	Cephalothin	83 (100)
	Cefepime	49 (59.0)
	Ceotaxime	83 (100)
	Cefoxitin	5 (6.0)
	Ceftazidime	23 (28.9)
	Cefamandole	83 (100)
Carbapenems	Imipenem	0 (0)
Monobactams	Aztreonam	50 (60.2)
Aminoglycosides	Gentamicin	32 (38.6)
Quinolones	Nalidixic acid	69 (83.1)
	Ciprofloxacin	52 (62.7)
Other	Sulfonamides	60 (72.3)

내성률을 나타내었으나, carbapenems계인 imipenem에 대하여 내성인 균주는 한 주도 없었다.

Non-β-lactam계 항생제의 경우에 있어서는 nalidixic acid에 83.1%, sulfonamides에 72.3%, ciprofloxacin에 62.7% 그리고 gentamicin에 38.6%의 내성률을 나타내었다. ESBL 산생 *E. coli*는 공시균 모두에서 사용된 7종 이상의 약제에 내성을 나타내었다(Table 3).

ESBL 유전자와 integron의 검출을 위한 PCR

총 83주의 ESBL 생성 *E. coli*를 대상으로 ESBL 유전자(*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M} 및 *bla*_{OXA}) 및 integron (class 1, class 2 및 3 integron)의 검출을 실시한 결과는 Table 4와 같았다. ESBL 생성 균주의 84.3%(70주)가 한 종류 이상의 ESBL 유전자를 보유하고 있었으며, *bla*_{TEM+CTX-M} 유전자가 49.4% (41주)로 가장 많이 검출되었고, 다음 *bla*_{CTX-M}, 27.7% (23주), *bla*_{TEM} 6.0% (5주) 및 *bla*_{OXA}, 1.2% (1주)의 순이었다. 반면 *bla*_{SHV} 유전자는 공시균 모두에서 검출되지 않았다. Class 1 integron은 ESBL 생성 균주의 61.4% (51주)에서 검출되었으나, class 2와 class 3 integron은 공시균 모두에서 검출되지 않았다.

고 찰

ESBL 생성 균은 병원이나 임상 가검물에 국한되지 않고 생활하수나, 축산분뇨 등 여러 경로를 통하여 수중환경으로 유입된다(Baquero 등, 2008). 특히 ESBL 생성 유전인자는 plasmid를 통하여 다른 균으로 쉽게 전파될 수 있어 자연계에서 이 능력을 획득한 세균이 인체로의 재유입 위험성 또한 배제할 수 없다(Bradford, 2001).

최근 들어 ESBL 생성 균주는 국내를 비롯하여 여러 나라의 강과 하천 등으로부터 분리보고 되고 있다(Kim 등, 2008; Chen 등, 2010; Dhanji 등, 2011; Jang 등, 2013). 이번 연구에서도 총 83주의 ESBL 생성 *E. coli*가 대구지역을 위요하여 흐르고 있는 낙동강과 금호강으로부터 분리되어, 이들 ESBL 생성 균들은 수계에까지 확산되어 있음을 확인할 수 있었다. ESBL 생성 *E. coli*는 penicillin계(ampicillin 및 piperacillin), cephalosporin계(cephalothin, cefamandole, cefepime 및 cefotaxime), β-lactamase 억제제(sulbactam/ampicillin), monobactam계(aztreonam) 뿐만 아니라 non-β-lactam 항생제인 nalidixic acid, ciprofloxacin 및 sulfonamides에도 높은 내성률을 나타내었다. 이러한 결과는 공시한 항생제의 종류에서는 다소 차이가 있었지만 ESBL 생성 *E. coli*는 β-lactam 뿐만 아니라 non-β-lactam 항생제에 높은 내성을 보였다라는 이전 연구자들의 결과와 유사하였다(Kim 등, 2008; Chen 등, 2010; Kim 등, 2012). 한편 이번 연구에서 ESBL 생성 *E. coli*는 모두 7종 이상의 약제에 내성을 보여, ESBL 생성균은 다제내성과 관련이 있음을 확인할 수 있었다(Kim 등, 2012).

이번 연구의 결과 ESBL 생성 *E. coli*에서 TEM, OXA 및 CTX-M형 β-lactamase가 확인되었으며, 이들 중 CTX-M형(77.1%)과 TEM형(55.4%)이 가장 많이 검출되었다. 이는 세계 각국의 강과 하천 및 수중환경에서 분리된 ESBL 생성 균주에서 가장 유행하는 ESBL 유전형이 CTX형과 TEM형이라고 보고한 이전 연구자들의 결과와 일치하였다(Lu 등, 2010; Chen 등, 2010; Dhanji 등, 2011; Jang 등, 2013). 또한 ESBL 생성 *E. coli*의 84.1%는 한 종류 이상의 β-lactamase 유전자를 보유하고 있어 감염증에 대해 항생제 치료의 어려움 때문에 공중보건학적으로 위해를 가할 수 있다(Bradford, 2001). CTX-M형 ESBL은 plasmid에 의해 매개되며, 가수분해 기질특이성 및 억제특이성이 TEM형이나 혹은 SHV형 ESBL과 유사하지만, cefo-

Table 3. Phenotypes of antimicrobial resistance in 83 ESBL-producing *E. coli*

Multiplicity of resistance	Resistance patterns	No. of isolates (%)	
7	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,NA	2 (2.4)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,S3	1 (1.2)	
8	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,ATM	5 (6.0)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,CIP,NA	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,NA,S3	2 (2.4)	
9	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,CTX,MA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,ATM,S3)	2 (2.4)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,GM,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,NA,S3	3 (3.6)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,CIP,NA,S3	4 (4.8)	
	AM,PRL,SAM,KF,MA,CTX,GM,NA,S3	4 (4.8)	
	AM,PRL,TZP,KF,CTX,MA,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,KF,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,CAZ,MA,CIP,NA	1 (1.2)	
	10	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,CTX,FOX,MA,S3	1 (1.2)
		AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,CTX,MA,CIP,NA	1 (1.2)
AM,PRL,SAM,TIM,KF,CTX,CAZ,MA,ATM,S3		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,NA		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,GM,NA,S3		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,CIP,NA,S3		2 (2.4)	
AM,PRL,SAM,KF,CTX,CAZ,FOX,MA,ATM,S3		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,CTX,CAZ,MA,ATM,CIP,NA		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,ATM,CIP,NA,S3		1 (1.2)	
AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,GM,CIP,NA,S3		2 (2.4)	
11		AM,PRL,SAM,TZP,KF,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA	1 (1.2)
		AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,ATM,GM,NA,S3	1 (1.2)
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,GM,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,TIM,KF,CTX,MA,GM,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3	2 (2.4)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,ATM,CIP,NA,S3	5 (6.0)	
	AM,PRL,SAM,KF,MA,CTX,FEP,ATM,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,TZP,KF,FEP,CTX,MA,ATM,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,CTX,CAZ,MA,ATM,GM,CIP,NA	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,CIP,NA	2 (2.4)	
	AM,PRL,SAM,TIM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,S3	1 (1.2)	
	12	AM,PRL,SAM,TZP,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,CIP,NA	1 (1.2)
		AM,PRL,SAM,TZP,KF,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3	1 (1.2)
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,GM,CIP,NA		3 (3.6)	
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,CIP,NA,S3		2 (2.4)	
AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3		3 (3.6)	
AM,PRL,SAM,KF,MA,CTX,CAZ,ATM,GM,CIP,NA,S3		1 (1.2)	
13	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,FEP,CTX,MA,ATM,CIP,NA,S3	3 (3.6)	
	AM,PRL,SAM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3	3 (3.6)	
14	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,FEP,CTX,FOX,MA,ATM,GM,NA,S3	1 (1.2)	
	AM,PRL,SAM,TIM,KF,FEP,CTX,FOX,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3	1 (1.2)	
15	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,FEP,CTX,CAZ,MA,ATM,GM,CIP,NA,S3	2 (2.4)	
	AM,PRL,SAM,TZP,TIM,KF,MA,FEP,CTX,CAZ,FOX,ATM,GM,NA,S3	1 (1.2)	
Total		83 (100)	

*AM, ampicillin; PRL, piperacillin; SAM, sulbactam/ampicillin; TZP, piperacillin/tazobacram; TIM, ticarcillin/clavulanic acid; CF, cephalothin; MA, cefamandole; FEP, cefepime; FOX, ceftoxitin; IPM, imipenem; ATM, aztreonam; GM, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; NA, nalidixic acid; S3, sulfonamides.

Table 4. Detection frequencies of ESBL genes and integrons detected in 83 ESBL-producing *E. coli*

ESBL genes (%)					Integrons (%)				
TEM	CTX-M	TEM+CTX-M	OXA	SHV	Not detected	<i>int 1 1</i>	<i>int 1 2</i>	<i>int 1 3</i>	Not detected
5 (6.0)	23 (27.7)	41 (49.4)	1 (1.2)	0 (0)	13 (15.7)	51 (61.4)	0 (0)	0 (0)	32 (38.6)

taxime에 대한 활성이 ceftazidime에 비해서 상대적으로 강한 특성이 있다(Paterson과 Bonomo, 2005). 이번 연구에서도 CTX-M형 유전자가 검출된 64주는 cefotaxime에 대해서는 100% 내성을 나타내었지만, ceftazidime에 대해서는 20.5%만이 내성을 나타내었다.

OXA형 β -lactamase는 oxacillin에 대한 가수분해 능력을 가지는 효소로 *Pseudomonas aeruginosa*에서 흔히 발견되는 것으로 알려져 있다(Weldhagen 등, 2003; Lee 등, 2005). 국내 하천에서 OXA형 ESBL은 한강과 영산강으로부터 분리된 *E. coli*에서 보고가 되고 있고(Kim 등, 2008; Jang 등 2013), 이번 연구에서도 OXA형이 한 주에서 검출되었다. 반면 SHV형 β -lactamase는 이번 연구에서 검출되지 않았다. 그러나 SHV형 β -lactamase는 Lee 등(2007)이 부산지역 하천에서 분리된 *K. pneumoniae*에서 보고한 바 있다.

한편 이번 연구에서 검출된 TEM, CTX-M 및 OXA형에 대한 ESBL 유전형의 분석은 실시하지 않았지만, 최근까지 국내 강과 하천으로부터 분리된 ESBL 생성 균주에서 CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-27, TEM-1, TEM-52, TEM-116, TEM-171, OXA-1 및 OXA-4 등의 다양한 종류의 유전형이 보고되고 있으며(Kim 등, 2008; Kim 등, 2012; Jang 등, 2013), 이들 유전형은 이전 연구자들에 의해 사람과 동물에서 분리된 유전형과 유사한 경향을 나타내었다(Jeong, 2004; Kang 등, 2005; Lee 등, 2005; Lee 등, 2009; Lim 등, 2009; Cho 등, 2011). 이러한 결과로 볼 때 ESBL 생성 균주들이 어떻게 수중 환경으로 유입되었는지는 정확히 알 수 없지만 ESBL 유전자가 수중 환경으로 전파 될 수 있음을 의미한다. 특히 이번 연구에서 검출된 TEM, CTX-M 및 OXA형에 대해서는 추가적인 조사를 통한 유전형의 규명이 필요할 것으로 생각된다. 한편 이번 연구에서 ESBL 생성 균주로 나타났지만, ESBL 관련 내성 유전자가 검출되지 않은 13주(15.7%)에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Integron은 균주 간 여러 가지 내성 유전자를 전달함으로써 다제내성균의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Martinez, 2009; Su 등, 2012). 이번

연구에서도 ESBL 생성 *E. coli* 모두가 8종 이상의 약제에 내성을 보인 다제내성균이었으며, integron은 ESBL 생성 *E. coli*의 61.4%에서 확인되었다. 이는 중국의 양쯔강에서 분리된 ESBL 생성 대장균군의 65.2%가 integron을 보유하고 있었다는 Chen 등(2010)의 결과와 유사하였다. 그러나 Su 등(2012)이 중국의 동지양강으로부터 분리된 ESBL 생성 *E. coli*에서의 85.7%의 성적보다는 낮았고, 프랑스와 영국의 지표수에서 각각 11% 및 3.6%의 성적보다는 높았다(Rosser와 Young, 1999; Laroche 등, 2009). 이는 실시간 지표수의 오염 상태에 기인하는 것으로 생각된다(Takasu 등, 2011). 또한 이번 연구의 결과는 임상 가검물 및 건강한 사람과 동물에서 검출된 성적보다 높았다(Goldstein 등, 2001; Yu 등, 2003; Kang 등, 2005; Cocchi 등, 2007). 이는 수중환경에서 세균에 대한 선택적 압력이 강하다는 것을 의미한다(Cocchi 등, 2007; Su 등, 2012).

이번 연구에서 integron이 검출된 51주는 모두 class 1 integron으로 integron 중 class 1 integron이 가장 많이 검출된다는 이전 연구자들의 보고와 일치하였다(Chen 등, 2010; Su 등, 2012). 한편 Rosser와 Young (1999)은 Rio Grand 강으로부터 분리된 그람음성균의 3.6%, Mukherjee와 Chakraborty (2006)는 인도의 Torsa 강으로부터 분리된 그람음성균의 40%, 그리고 Chen 등(2011)은 중국의 Minjiang 강으로부터 분리된 *E. coli*의 41%에서 class 1 integron이 검출되었다고 보고하여 이번 연구에서 나타난 61.4%의 성적보다는 낮았다. 이런 결과는 class 1 integron은 ESBL 산생주에 있어서 그람음성세균에서 보다 높게 나타남을 의미한다(Machado, 2007). 수중 환경에서 class 2 integron의 검출에 관해서는 이전 연구자들에 의해 보고가 되고 있지만(Roe 등, 2003; Laroche 등, 2009; Chen 등, 2010; Su 등, 2012), 이번 연구에서는 class 2 integron은 검출이 되지 않았다. 한편 class 3 integron의 경우는 사람과 동물 및 수중 환경에서 최근까지 거의 보고가 없는 실정이다(Cambray, 2010).

이번 연구의 결과 낙동강과 금호강물은 ESBL 생성 *E. coli*로 오염이 되어있어, 이들 균은 병원이나

임상가검물에서만 국한되지 않고 수중환경에까지 확산되어 존재하고 있음을 확인하였다. 수중 환경은 내성균과 내성 유전자의 저장고 역할뿐만 아니라 환경으로 내성균의 전파에 중요한 역할을 한다. 따라서 낙동강 및 금호강물이 식수로 사용되어지는 것을 고려할 때 수중환경에서 항생제 내성균에 의한 오염방지 및 대책 마련을 위한 지속적인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

결론

2011년 1월부터 12월까지 대구지역을 흐르는 낙동강과 금호강물로부터 ESBL 생성 *E. coli* 를 분리하고, 이들 균주를 대상으로 항생제 내성양상, ESBL 유전자 및 integron의 분포를 조사한 결과는 다음과 같았다. 낙동강과 금호강으로부터 총 83주의 ESBL 생성 *E. coli* 가 분리되었다. 항생제 내성시험 결과 β -lactam 계열의 항생제에 대하여는 ampicillin, cephalothin, cefotaxime 및 cefamandole (각각 100%), piperacillin (98.8%), sulbactam/ampicillin (86.7%), aztreonam (60.2%) 및 cefepime (59.0%)에 높은 내성을 나타내었고, non- β -lactam 계열의 항생제에 대하여는 nalidixic acid 83.1%), sulfonamides (72.3%) 및 ciprofloxacin (62.7%)에 높은 내성을 보였다. 한편 공시균 모두는 사용된 7종 이상의 항생제에 내성을 보인 다제내성균이었다. ESBL 유전자의 검출결과 TEM+CTX-M형이 48.4%로 가장 많이 검출되었고 다음은 CTX-M형이 27.7%, TEM형이 6.0% 그리고 OXA형이 1.2%가 검출되었다. 반면 SHV형은 검출되지 않았다. Class 1 integron은 공시균의 61.4%(51주)에서 검출되었으나, class 2와 class 3 integron은 한 주도 검출되지 않았다.

참고 문헌

Ash RJ, Mauck B, Morgan M. 2002. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg Infect Dis* 8: 713-716.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.

Baquero F, Martínez JL, Cantón R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19: 260-265.

Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniça MM, Vedel G, Nénot P,

Krishnamoorthy R, Paul G. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett* 120: 75-80.

Bradford PA. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951.

Cambray G, Guerout A, Mazel D. 2010. Integrons. *Annu Rev Gen* 44: 141-166.

Chen H, Shu W, Chang X, Chen JA, Guo Y, Tan Y. 2010. The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ Pollut* 158: 2459-2464.

Chen B, Zheng W, Yu Y, Huang W, Zheng S, Zhang Y, Guan X, Zhuang Y, Chen N, Topp E. 2011. Class 1 integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang River, Fujian Province, China. *Appl Environ Microbiol* 77: 148-155.

Cho JK, Sung MS, Kim JH, Kim KS. 2011. Detection of CTX-M and TEM type extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from livestock in Korea. *Kor J Vet Serv* 34: 37-43.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. M100-S22. Wayne, Pa, USA.

Cocchi S, Grasselli E, Gutacker M, Benagli C, Convert M, Piffaretti JC. 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 126-132.

Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 46: 500-510.

Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, Woodford N. 2011. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother* 66: 512-516.

Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. 2007. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 166-176.

Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrons in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 723-726.

Jang J, Suh YS, Di DY, Unno T, Sadowsky MJ, Hur HG. 2013. Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-

- spectrum β -lactamases in the Yeongsan river basin of South Korea. *Environ Sci Technol* 47: 1128-1136.
- Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. 2004. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol* 42: 2902-2906.
- Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 55: 639-644.
- Kim J, Kang HY, Lee Y. 2008. The identification of CTX-M-14, TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea. *J Microbiol* 46: 478-481.
- Kim JH, Zheng XH, Cho JK, Sung MS, Kim KS. 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase among *Escherichia coli* isolated from Geumho river in Korea. *J Pure and Appl Microb* 6: 989-1000.
- Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F. 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 68: 118-130.
- Lee HG, Kim HJ, Kim GD. 2007. Typing of β -Lactamase of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from rivers in Busan, Korea. *Kor J Microbiol* 43: 116-123.
- Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. 2005. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 56: 122-127.
- Lee SG, Jeong SH, Lee H, Kim CK, Lee Y, Koh E, Chong Y, Lee K. 2009. Spread of CTX-M- type extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63: 76-80.
- Lim SK, Lee HS, Nam HM, Jung SC, Bae YC. 2009. CTX-M-type beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from sick animals in Korea. *Microb Drug Resist* 15: 139-142.
- Lu SY, Zhang YL, Geng SN, Li TY, Ye ZM, Zhang DS, Zou F, Zhou HW. 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol* 76: 5972-5976.
- Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F, Coque TM. 2007. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2201-2204.
- Martinez JL. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1568-1574.
- Mukherjee S, Chakraborty R. 2006. Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. *Res Microbiol* 157: 220-226.
- Oliver A, Pérez-Vázquez M, Martínez-Ferrer M, Baquero F, De Rafael L, Cantón R. 1999. Ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanate susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates with different beta-lactam resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 862-867.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18: 657-686.
- Peak N, Knapp CW, Yang RK, Hanfelt MM, Smith MS, Aga DS, Graham DW. 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environ Microbiol* 9: 143-151.
- Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. 1998. beta-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1350-1354.
- Reinthal FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, Melkes A, Posch J, Winter I, Zarfel G, Marth E. 2010. ESBL-producing *Escherichia coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* 44: 1981-1985.
- Roe MT, Vega E, Pillai SD. 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 9: 822-826.
- Rosenberg SM. 2001. Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Genet* 2: 504-515.
- Rosser SJ, Young HK. 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 44: 11-18.
- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE Jr, Tenover FC. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 39: 2864-2872.
- Su HC, Ying GG, Tao R, Zhang RQ, Zhao JL, Liu YS. 2012. Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ Pollut* 169: 42-49.
- Takasu H, Suzuki S, Reungsang A, Pham HV. 2011. Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments

- of Vietnam and Thailand. *Microbes Environ* 26: 135-143.
- Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT. 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 41: 5429-5433.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2385-2392.