

충청 지역에서 분리된 대장균이 생성하는 Extended Spectrum β -Lactamase 유형의 검출 빈도

육근돌¹, 박진숙^{2*}

¹대전보건대학교 임상병리과, ²한남대학교 생명시스템학과

The prevalence of Extended Spectrum β -Lactamase type produced by Clinical Isolates of *Escherichia coli* from ChungCheong Area

Keun-Dol Yook¹ and Jin-Sook Park^{2*}

¹Dept. of Clinical Laboratory Science, Deajeon Health Science College

²Dept. of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University

요약 장내세균 가운데서 가장 빈번하게 나오는 대장균에서 Extended-Spectrum β -Lactamase(ESBL)를 생성하는 효소의 검출빈도와 이들 균주의 ESBL 효소의 유형을 구분하는 것이 이 연구의 목적이다. 균주는 충청지역 (대전, 충남, 충북) 병원에서 2013년 2월부터 7월까지 6개월간 282 대장균 균주 중 ESBL을 생성하는 74균주(26.2%)를 수집하였다. 충청지역에 ESBL 균주를 포함한 대장균의 항균제 내성률은 Aztreonam 30.8%, Cefotaxim 30.9%, 그리고 Ceftazidime 32.2%로 나타났으며 ESBL을 생성하는 균주는 β -lactam 항균제인 Aztreonam에 58.1%, Cefotaxim 100%, 그리고 Ceftazidime 63.5%의 내성률을 보였다. 동정된 ESBL 균의 CTX-M-2은 48 균주, CTX-M-8은 20 균주, PER-1 28 균주, 그리고 VEB-1 26 균주에서 나왔다. GES-1 형은 74균주 중 2균주가 충남에서만 유일하게 나타났다. ESBL 검출빈도와 유형의 정확한 파악은 병원감염관리와 항균제 처방에 도움이 될 것이다.

Abstract The study aims primarily to evaluate the resistance of antibiotics and the prevalence of these enzymes among *Escherichia coli* the most frequent isolate of Enterobacteriaceae producing Extended-Spectrum β -Lactamase(ESBLs), to differentiate the types of enzymes in these isolates. Total 74(26.2%) Strains of producing ESBLs among the 282 *E. coli* isolates were isolated from hospitals of Chungcheong area (Daejeon, Chungnam, and Chungbuk) during a 6 month-period from February to July, 2013. 282 *E. coli* isolates including ESBL shown resistance rates of aztreonam 30.8%, Cefotaxim 30.9%, and Ceftazidime 32.2%, 74 isolates producing ESBLs in *E. coli* were resistant rates to Aztreonam 58.1%, Cefotaxim 100%, and Ceftazidime 63.5% of β -lactam antibiotics. CTX-M-2 (48 isolates) was the most prevalent type of ESBLs identified. Followed the order of frequency by PER-1 (28 isolates), VEB-1 (26 isolates) and CTX-M-8 (20 isolates), of the 74 isolates, 2 isolates only showed GES-1 in Chungnam province. Accurate identification type of ESBLs would aid in hospital infection control. This would give aid to the physician to prescribe more appropriate antibiotics.

Key Words : *Escherichia coli*, Extended-spectrum β -lactamases, Polymerase chain reaction.

1. 서론

Extended spectrum-lactamases (ESBL) 생성균주는 penicillin, 좁은 범위 및 넓은 범위의 제3세대 cephalosporin

과 monobactam 등 carbapenem을 제외한 β -lactam계 항균제 대부분에 내성을 보이고 aminoglycoside, trimethoprim sulfamethoxazole 등 여러 항균제에 내성인 경우가 많아 치료 약제를 선택하기가 어려우며 ESBL

본 논문은 대전보건대학교 2013년도 교내 연구과제로 수행되었음.

*Corresponding Author : Jin-Sook Park(Hannam Univ.)

Tel: +82-42-629-8771 email: jspark@hnu.kr

Received March 19, 2014

Revised March 27, 2014

Accepted April 10, 2014

유전자가 plasmid에 의해 다른 균종으로 전파될 수 있기 때문에 이들에 대한 신속, 정확한 검사가 중요하다[1-3]. β -lactam 제는 감염증 치료에 많이 사용되는 항생제이다. 근래 이들 약제가 임상에서 많이 사용되면서 이들의 오, 남용 및 자연내성에 대한 약제에 대한 내성균의 증가가 문제로 대두되었다. β -lactam 제제에 대한 내성기전은 여러 가지가 있는데, 그 중 가장 중요한 것은 β -lactamase에 의한 약제에 불활성화이다[4]. β -lactamase의 초기 분류체계가 없었으나 이러한 분류 체계의 혼란을 막기 위하여 Ambler와 Bush 등은 새로운 분류법을 제안하게 되었는데[5,6], Ambler는 분자구조에 근거한 효소유전자의 염기서열 상동성에 근거로 β -lactamase를 serine형인 class A, C, D와 zinc형인 class B로 분류하고, Bush 등은 기능에 초점을 맞추어 기질과 억제제의 특이성에 따라 β -lactamase가 어떤 광범위 항균제를 더 분해하는지와 clavulanic acid에 의해서 효소 활성이 억제되는지의 따라 여러 그룹으로 분류하였다. 이들에 따르면, ESBL의 경우에 광범위 β -lactamase 계열 항균에 내성을 나타내고, cefoxitin과 같은 cephamycin과 clavulanic acid와 같은 β -lactamase 억제제에는 감수성을 나타내므로 Ambler는 class A serine β -lactamase로 분류하였고, Bush 등은 group2be로 분류하였다.

지금까지 ESBL로 밝혀진 유전형은 150여종 이상으로 TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB 등 이외에도 여러 가지 유전형이 밝혀져 왔다[7].

ESBL은 나라마다 종류가 다양하게 보고되고 있으며 또한 그 나라의 지역 내에서도 효소의 종류, 작용과 염기서열에 따른 점 변이의 분포가 다르기 때문에 많은 연구가 되어 지고[8-10] 있으나 충청지역에는 최근 연구된 자료가 없어 이에 본 연구에서는 대전, 충남, 충북 지역의 종합병원에서 분리된 대장균 ESBL로 추정되는 균의 빈도, 항균제 감수성 그리고 유전자형의 종류 확인을 위해 종합효소연쇄반응 검사를 실시하였다. 이는 ESBL 생성 세균에 의한 예방 및 감시활동, 감염증의 치료에 도움이 될 것으로 사료 된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험기간 및 재료

2.1.1 실험기간

2013년 2월1일부터 2013년 7월 30일까지 대전, 충남,

충북지역의 종합병원 진단검사의학과 미생물 검사실에서 검체를 수집하였다.

2.1.2 실험균주

검사실에서 분리된 282균주의 *E. coli* 중에서 MicroScan WalkAway 96 SI(Dade Behring Sacramento, Calif.) 장비가 ESBL 양성으로 추정하는 74 균주를 분리하였으며 검체가 다르더라도 같은 환자인 경우에는 먼저 검출된 한 개만 수집하였다. 정도관리를 위해서 참조 균주는 *E. coli* ATCC 25922를 이용하였다.

2.2 세균 동정 및 항균제 감수성 시험

검체를 MacConkey 배지에 배양하여 그람음성, 유당 분해하는 대장균으로 추정되는 균을 MacConkey 배지에 계대 배양하여 35°C 항온기에서 하룻밤 배양한 후, MicroScan Neg Breakpoint Combo Panel Type 44 (NBC44) 카드를 이용하여 동정 검사와 항균제 감수성 검사를 실시하였다. 액체 배지 미량 희석법으로 상기 장비에 의한 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다[11]. 시험한 항균제는 Amikacin, Ampicillin, Aztreonam, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefazolin, Cefepime, Cefoxitin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Gentamicin, Imipenem, 및 Trimthoprim/sulfamethoxazole (SXT) 등을 이용하였다.

2.3 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 확인시험

CLSI 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 확인시험을 시행하였다. Mueller-Hinton 한천 배지(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에 McFarland 0.5 탁도의 균액을 바른 후 Cefotaxime (BBL, 30 g)과 Cefotaxime/Clavulanic acid(CTC) (BBL, 30/10 g), Ceftazidime (BBL, 30 g)과 Ceftazidime/Clavulanic acid (CZC) (BBL, 30/10 g) 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 양성 균주로 판정하였다.

2.4 일반 분자생물학적 검사 및 유전형 확인

2.4.1 plasmid DNA 분리

Plasmid DNA는 Sambrook 등의 방법에 따라 추출하였다. 균주의 배양액을 microtube에 1.5 ml씩 2회 원심 분리하여 투명한 상등액은 버리고 균체 덩어리만 얻었다. 50 mM glucose, 25 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA의 solution I을 150 μ l 넣고 vortexing하여 균체를 완전히 재현탁 하였다. 현탁된 균체에 0.2 N NaOH, 1.0% SDS의 Solution II를 300 μ l 가한 다음 균체가 과쇄 되어 점성이 있는 투명한 액체가 될 때까지 조심스럽게 섞었다. 투명한 균용액에 5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, DW 28.5 ml의 Solution III를 225 μ l 넣고 조심스럽게 섞어 준다. 균액의 점성이 사라지고 덩어리들이 뭉쳐지게 되면 얼음 속에 약 5분 내지 10분 정도 방치하여 보다 많은, 원치 않는 형태 (숙주의 염색체 등)의 DNA들을 침전 시켜 제거할 준비를 하였다. 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 덩어리를 완전히 가라앉히고 상층액만을 취하였다. 상층액과 동일한 양만큼 페놀:클로로포름:이소아밀알콜 (25:24:1)포화용액을 넣고 잘 섞어서 (약 1분 동안) 완전히 혼탁하게 하였다. 12,000rpm, 4°C 에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 상층액을 취하고 2.5~1.5배의 냉 에탄올을 가하여 잘 혼합하여 주었다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10-15분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 냉 70% 에탄올을 이용해 pellet을 잘 씻어 주었다. 원심 분리 후 70% 에탄올을 완전히 제거하였다. pellet은 진공상태에서 건조하였다.

2.4.2 PCR위한 Primer 합성 및 유전자의 증폭

β -lactamase의 특성을 분석하기 위하여 다음과 같이 제작하였다[Table 1].

PCR 용 250 μ l짜리 tube에 다음의 조성을 넣었다. Up stream primer : 0.5 μ l 100 pmol primer, Down stream primer : 0.5 μ l 100pmol primer, Template DNA : 5 μ l (100 ng), dNTP : 5 μ l (2 mM dNTP), MgCl₂ : 2~3 μ l (25 mM MgCl₂), 10 X reaction buffer : 5 μ l, Taq DNA polymerase : 0.5 μ l (2.5unit), DW : 30.5~31.5 μ l, Total 50 μ l 되게 하였다. 1 cycle : denaturation 94°C, 180초 annealing 50°C, 60초 polymerization 72°C, 60초 2~30 : denaturation 94°C, 60초 annealing 50°C, 60초 polymerization 72°C, 60초 31: denaturation 94°C, 60초 annealing 50°C, 060초 polymerization 72°C, 180초 조

건으로 시행하였다. PCR 반응이 완료되면 반응액 5 μ l를 취하여 전기영동하고 반응산물을 확인하였다.

[Table 1] Oligonucleotides used as primers for amplification and sequencing in this study

Primers	Nucleotide sequence(5' to 3')	size (bp)
TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCGT	861
TEM R	TTACCATGCTT AATCAGTGA	
SHV F	CCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT	831
SHV R	TAGCGTTGCCAGTGCTCG	
CTX-M 1F	GGACGTACAGCAAAAACCTGTC	624
CTX-M 1R	CGGTTGCGCTTTCACCTTTTCTT	
CTX-M 2F	CGGTGCTTAAACAGAGCGAG	891
CTX-M 2R	CCATGAATAAGCAGCTGATTGCC	
CTX-M 8F	ACGCTCAACACCCGCGATC	490
CTX-M 8R	CGTGGTTCTCGGGGATAA	
CTX-M 9F	GATTGACCGTATTGGGAGTTT	947
CTX-M 9R	CGGCTGGGTAATAATAGGTCA	
PER-1 F	GTTAATTGGGCTTAGGGCAG	855
PER-1 R	CAGCGCAATCCCCACTGT	
VEB F	ACCAGATAGGAGTACAGACATATGA	727
VEB R	TTCATCACCCGATAAAAGCAC	
GES/IBC F	GTTAGACGGCGGTACAAAAGATAAT	903
GES/IBC R	TGTCCGTGCTCAGGATGAGT	
TLA F	CGCGAAAATTCTGAAATGAC	992
TLA R	AGGAAATGTACCGAGACCT	

2.4.3 전기영동

분리 정제된 플라스미드, PCR 증폭 산물, 제한효소로 절단한 DNA 등을 6X sample buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% sucrose)와 혼합하여 경우에 따라 1에서 2% 사이의 아가 로즈 젤에 전기 영동하여 1X TAE electrophoresis buffer 에서 100V에서 30~40분간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 젤은 0.002% ethidium bromide에 10분간 담가두었다가 증류수로 씻어준 후 UV transilluminator에 옮겨 플라스미드 DNA와 PCR 증폭산물의 유무와 크기를 관찰 하고 polaroid 카메라로 (Type 667, Polaroid Co.) 사진 촬영하였다.

2.4.4 Sequencing

DNA 염기서열은 자동염기서열 분석기 (Perkin Elmer: ABI 373, LI-COR4200)를 이용하여 분석을 하였다. 클로닝한 DNA에 대한 sequence primer는 pGEM-T 유전자 운반체에 있는 T7 primer (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA-3')와 Sp6 primer (5'-TAT AGT GTC ACC TAA AT-3')를 한 쌍으로 그리고 M13

forward (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') 와 M13 reverse primer (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3')를 한 쌍으로 각각 primer에 형광을 표지 하여 사용하였다. 증폭된 target gene이 삽입된 plasmid를 정제한 후, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v. 2.0 (PE Biosystems Co.)를 이용하여 cyclic sequencing 하였다 (94°C 5s, 50°C 10s, 60°C 4min; 25 cycles). Cyclic sequencing이 끝난 반응산물은 alcohol precipitation 방법 혹은 Centri-Sep Column (Princeton Separations Co.)을 이용하여 정제시킨 다음 speed vacuum에서 완전히 건조시켜 ABI 3100 automated sequencer를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

2.4.5 Data analysis

DNASTAR computer program을 사용하여 염기서열을 정렬하였다. 먼저 염기서열이 밝혀져 있는 같은 유전자 코드와 비교하고 또 GenBank의 유전자 등록처에 등록되어 있는 염기 서열과 비교분석 하였다. GenBank에 등록된 염기서열들과의 유사성 비교를 위해서 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 웹 상에 제공하는 Blast-search BLAST 2.0 (www3.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)을 이용하여 유사성이 높은 유전자의 위치를 확인하고, 결정된 염기서열들은 Clustal X multiple alignment 프로그램을 사용하여 염기서열을 정렬하고 Bioedit, Genejockey II 등의 프로그램을 사용하여 유전자의 배열 순서, 유전자 좌위별 G+C 및 A+T content, 염기서열의 치환 정도, codon usage pattern 등을 종합적으로 분석하였다.

2.4.6 PCR을 이용한 ESBL유전자의 증폭

Multiplex PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각기 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 µl, primer 10 pmol 각각 1 µl씩 넣었고, genomic DNA(25 µg) 1 µl, Taq DNA polymerase(2 unit) 1 µl, 최종 반응액은 증류수로 20 µl 되게끔 실시하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer, Wellesley, USA)에서 94°C에서 1분간 변성, 50°C에서 1분간 접합, 72°C에서 1분간 확장의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 10분간 최종확장 하였다.

2.4.7 PCR산물의 확인

PCR 증폭산물을 2% agarose gel에 1× TAE buffer에

서 70 volt, 100 mA로 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 Ethidium Bromide(0.5 µg/ml) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진 촬영 하였다.

3. 결과

3.1 검체 종류에 따른 분리 빈도

대장균이 검출된 검체로는 소변 45 주(60.8%), 혈액 11 균주(14.9%) 객담 7균주(9.5%), 뇌척수액을 포함한 체액 5균주(6.8%), 농 3균주(4.1%), 기타 3균주(4.1%) 이다.

3.2 항균제 감수성 결과

항균제 감수성 검사에 Amikacin, Ampicillin, Aztreonam, Cefazolin, Cefepime, Cefoxitin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Gentamicin, Imipenem, Piperacillin/Tazobactam, Tobramycin, Trimthoprim/Sulfamethoxazole (SXT)의 항균제를 이용하였는데 검사 결과를 살펴보면, ESBL을 생성하는 균주는 β-lactam 항균제인 Aztreonam에 58.1%, Cefepime에 55.4%의 내성을 보였으며, 심지어 aminoglycoside 계통인 Gentamicin에도 52.7%의 내성을 보였다.

[Table 2] Antimicrobial resistance of ESBL producing E.coli using MicroScan system

Antimicrobial agents (resistance breakpoint, µg/ml)	Antimicrobial resistance rates					
	S		I		R	
	No.	%	No.	%	No.	%
Amikacin(≥64)	74	100.0				
Ampicillin(≥32)					74	100.0
Aztreonam(≥32)	22	29.7	9	12.2	43	58.1
Cefazolin(≥32)	1	1.4			73	98.6
Cefepime(≥32)	15	20.3	18	24.3	41	55.4
Cefoxitin(≥32)	64	86.5	5	6.8	5	6.8
Ceftriaxone(≥64)					74	100.0
Gentamicin(≥16)	35	47.3			39	52.7
Imipenem(≥16)	74	100.0				
Cefotaxime(≥4)					74	100.0
Ceftazidime(≥16)	20	27.0	777	9.5	47	63.5

Abbreviation. R: Resistant, I: Intermediate, S: Susceptible

Ampicillin, Ceftriaxone에 내성을 보였으며, 반면 Amikacin, Imipenem은 100% 감수성을 보였으며 결과는 [Table 2]와 같다.

3.3 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 타입 및 확인시험 결과

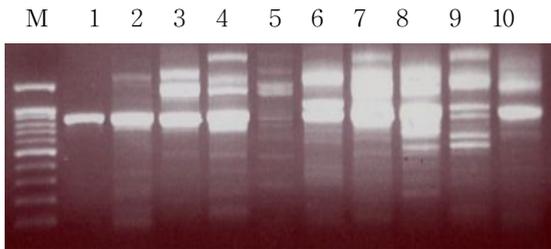
MicroScan Walkaway 장비에서 ESBL 균주로 가능성을 추정된 대장균 74 균주 중에서 Cefotaxime와 Cefotaxime/Clavulanic에서는 71균주 (95.9%)가 양성을 보였고 Ceftazidime과 Ceftazidime/Clavulanic을 이용한 이중 디스크 검사에서는 42 균주 (57.6%)가 양성으로 나왔다. 74균주 중에서 3균주는 이 시험에서 음성을 보여 주었다[Table 3].

[Table 3] Phenotypes of ESBLs producing *E. coli* isolates from Daejeon, Chungnam and Chungbuk hospitals

Phenotype of ESBL	Number of ESBL			
	Negative	CTX+ type	CAZ+ type	CTX+and CAZ+ type
Daejeon(n=26)	0	26	17	17
Chungnam(n=37)	1	36	20	20
Chungbuk(n=11)	2	9	5	5
Total	3	71	42	42

3.4 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형

ESBL을 검출하기 위해 PCR을 실시하였고 이 산물을 염기서열 분석하여 유전형을 확인한 결과 CTX-M-2(64.9%)가 가장 높은 빈도로 검출되었다.



[Fig. 1] Multiplex PCR performed with the specific primer sets using plasmid DNAs of *Escherichia coli*

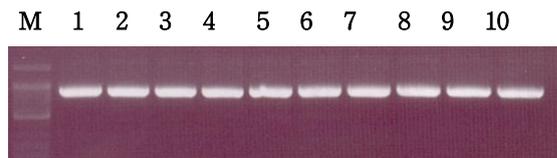
1: CHB3 (TEM:861bp), 2: SCH15 (TEM:861bp, SHV:831bp), 3: SCH6 (TEM:861bp, CTX-M-2:891bp), 4: SCH20 (TEM:861bp, SHV:831bp, CTX-M-2:891bp), 5: DJS2 (TEM:861bp, CTX-M-2:891bp, PER-1:855bp), 6: DJS23 (TEM:861bp, SHV:831bp, CTX-M-9:947bp, PER-1:855bp), 7: CHB14 (TEM:861bp, SHV:831bp, CTX-M-2:891bp, PER-1:855bp, VEB-1:727), 8: DJS36 (TEM:861bp, CTX-M-1:624bp, CTX-M-2:891bp, CTX-M-8:490bp, PER-1:855bp, VEB-1:727bp)9 : DK7 (TEM:861bp, SHV:831bp, CTX-M-2:891bp, CTX-M-8:490bp, PER-1:855bp, VEB-1:727bp, GES-1:903bp)10 : DK5 (TEM:861bp, SHV:831bp, CTX-M-2:891bp, CTX-M-8:490bp, PER-1:855bp, VEB-1:727bp, TLA:903bp)M : 100bp molecular marker

CTX-M-8은 총 37균주에서 검출 되었으며 이중 16균주 (43.2%)가 충남지역에서 분리되어 대전 7.7% 및 충북 18.2% 보다 높은 경향을 보였다. TLA는 충남지역에서 분리된 5균주(13.5%)에서 검출된 반면 대전지역에서 분리된 균주에서는 검출되지 않았고 GES-1 은 충남에서 분리된 2균주(5.4%)에서만 검출되었다. 본 연구에서는 TEM형 및 SHV형 ESBL은 검출되지 않았다.

[Table 4] Area distributions of resistance genes determinants according to ESBL among clinical isolates of *E. coli*

Gene type of ESBL	Number of ESBL(n=74)						Total number of isolates	
	Daejeon (n=26)		Chungnam (n=37)		Chungbuk (n=10)			
	No	%	No	%	No	%		
CTX-M-1	2	7.7	4	10.8	1	9.1	7	9.5
CTX-M-2	17	65.4	26	70.3	5	45.5	48	64.9
CTX-M-8	2	7.7	16	43.2	2	18.2	20	27.0
CTX-M-9	10	38.5	3	8.1	4	36.4	17	23.0
PER-1	11	42.3	14	37.8	3	27.3	28	37.8
VEB-1	12	46.2	13	35.1	1	9.1	26	35.1
TLA	0	0.0	5	13.5	1	9.1	6	8.1
GES-1	0	0.0	2	5.4	0	0.0	2	2.7

대전과 충남지역에서 수집한 *E. coli* CTX-M-9 검출 10 균주에서 재확인을 위한 단독 프라이머를 사용하여 PCR 검사를 시행한 결과 947 bp크기의 CTX-M-9 가 10 개 모두에서 검출되었다[Fig. 2].



[Fig. 2] PCR amplifications of CTX-M-9 gene using the plasmid DNAs of *E. coli* isolates from Daejeon and Chungnam Province. CTX-M-9 gene (Lanes 1-10; 947 bp); M, 100 bp molecular marker; 1, CHB3; 2, SCH15; 3, SCH6; 4, SCH20; 5, DJS2; 6, DJS23; 7, CHB14; 8, DJS36; 9, DK7; 10, DK5

4. 고찰 및 결론

임상 분리 균주 에서 ESBL의 생성율과 유형은 나라 및 조사 기관에 따라 다르다. 미국에서는 기관에 따라 0

에서 25%로 다양하나 전체적으로 3%의 장내세균이 ESBL을 생성하였다[12]고 보고하였다. 2003년에 보고한 전국의 주요 병원을 대상으로 하는 조사가 몇 차례 이루어졌는데, 박 등[13]은 *E. coli*의 9%가, 그해 Lee 등[14]은 *E. coli*의 10.4%가 ESBL 생성 균이라고 보고하였다. 고 등[15]은 2007년 보고한 연구에서 *E. coli*의 10%에서 ESBL 생성 균이 검출되어 전국적인 보고와 비슷한 결과를 보였다. 본 연구자가 2013년 조사한 바에 의하면 대전 지역에 대장균은 26.2%이며 지역적인 차이는 있을 수 있지만 상당히 증가했음을 알 수 있었다. 한편, 항균제 국내 연구자의 2005년 연구 결과 보고를 살펴보면 Aztreonam, Cefotaxime, 그리고 Ceftazidime에 대한 내성이 *E. coli*는 각각 7.3%, 11.1%와 8.5%라고 하였다[16]. 2007년 보고한 고 등[15]은 연구에서는 Aztreonam, Cefotaxime, Ceftazidime에 대한 내성률이 각각 8.0%, 10.6%, 9.2%라고 보고 하였다. 본 연구에서는 ESBL를 포함한 대장균으로 동정된 항균제의 내성률은 Aztreonam 30.8%, Cefotaxim 30.9%, 그리고 Ceftazidime 32.2%으로 나타났으며 ESBL을 생성하는 균주는 β -lactam 항균제인 Aztreonam에 58.1%, Cefotaxim 100%, 그리고 Ceftazidime 63.5%로 나타나 내성을 주도하는 것이 ESBL 균임을 알 수 있었다. 2004년 그리스에서 *bla*_{GES-5} 유전자는 *Escherichia coli* 365-02의 플라스미드로 전파되는 것을 알았다. 그런 후에 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, 그리고 *Pseudomonas aeruginosa*에 의해 전파되어지는 *bla*_{GES-5} 유전자가 세계 많은 지역에서 보고되어 지고 있다고[17] 하였으며 Xavier DE 등[18]이 2010년 보고한 자료에는 녹농균에 *bla*_{CTX-M-2}에 1.7%가 보여 *bla*_{GES-1}은 5.1% 검출되었다고 보고했다. 본 연구에서는 대장균에서는 74균주 중 *bla*_{CTX-M-2}가 48건이 나와 64.9%가 검출되고 *bla*_{GES-1} 2건이 나와 2.7% 이었고 충남에서만 유일하게 발견되었다. Ranellou K 등[19]에 따르면 그리스에서 녹농균에도 PER-1을 생성하는 균주가 있음을 확인했으며 염색체 위치는 절단 된 트랜스포손의 일부로 오히려 수평 유전자 전달보다 클론으로의 확장을 주장 했다. *bla*_{PER-1}은 대전, 충남, 충북에서 모두 검출되었으며 ESBL 양성 74균주 중 28균주가 나와 37.8%를 보였다. 김 등[20]에 따르면 *A. baumannii*가 Cefepime에 중간 혹은 내성인 균주 51주 중 10주 모두는 *bla*_{PER-1} 유전자 양성이었고, 중환자실에서 이 세균에 의한 감염의 집단발생은 적절한 대비책이 마련되지 않는

한 부산에도 PER-1 생성 *A. baumannii*가 만연될 가능성을 보고했다. Laurent Poirer 등[21]은 *E. coli* JMI09에서 VEB-1 (Vietnamese extended-spectrum β -lactamase) 유전자가 발현되고 Cephalosporins과 Aztreonam 에 높은 수준에 내성을 보인다고 하였으며 본 연구에서는 26 균주에서 검출되어 35.1%를 보였고 충남북, 대전에서 크게 나오고 있음을 보여 주고 있다. 아울러, 항균제 감수성 검사에서 내성률의 증가함을 알 수 있어 더욱 현실적이고 체계적인 병원감염관리와 지속적인 내성 유전자의 이동 경로에 대한 추적검사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

References

- [1] Shin KS and Son BR. Comparison of Vitek ESBL test and other methods for detecting extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species. Korean J Clin Pathol; 22:21-6, 2002.
- [2] 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; 21:495-504, 2001.
- [3] 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; 21:350-4, 2001.
- [4] Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, and Stratchounski L :Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. Antimicrob Agents Chemother, 47: 3724-3732, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003>
- [5] Bush K (2001): New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial Gaussard S and Courvalin P (1999) : Updated sequence information TEM β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 367-370. herapy. Clin Infect Dis, 32: 1085-1089.
- [6] Gaussard S and Courvalin P : Updated sequence information TEM β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 367-370,1999.
- [7] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the

- 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev ;14:933-51, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- [8] Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988; 10: 867-78.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- [9] Pai HJ. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases in Korean isolates of *Enterobacteriaceae*. Yonsei Med J 1998; 39: 514-9.
- [10] 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 ; 39: 2864-72, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.8.2864-2872.2001>
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006.
- [12] Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, Erwin ME, Hollis RJ. Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum beta-lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States. Cefepime Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis ;30:215-28, 1998.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(97\)00234-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(97)00234-4)
- [13] Park JH, Lee SH, Jeong SH, Kim BN, Kim KB, Yoon JD, et al. Characterization and prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing an extended-spectrum β -lactamase from Korean hospitals. Korean J Lab Med; 23:18-24, 2003.
- [14] Lee JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Woo GJ, Lee JW, et al. Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea, 2003. Korean J Clin Microbiol; 7:111-8, 2004.
- [15] Chi Seon Ko, Ji Yun Sung, Sun Hoe Koo, et al., Prevalence of Extended-Spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Daejeon: Korean J Lab Med 2007;27:344-50.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2007.27.5.344>
- [16] Kang JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Lee JW, Lee WG, et al. Prevalence of Ambler Class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol ;8:17-25, 2005.
- [17] Walther-Rasmussen, J., and N. Høiby. Class A carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 60:470 - 482, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- [18] Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gale s AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiol. 2010 Aug 12;10:217.
- [19] Ranellou K, Kadlec K, Poulou A, et al., Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the bla_{PER-1} extended-spectrum β -lactamase gene in Greece, J Antimicrob Chemother 2012; 67:357-361
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- [20] Kim JM, Kang HK, Jeong SH et al. Prevalence of PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital, Busan, Korea: Korean J Clin Microbiol; 7(1): 20-26, 2004.
- [21] Laurent Poirel, Thierry Naas, Michele Guibert, et al., Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. Antimicrob. Agents Chemother. March 1999 vol. 43 no. 3 573-581

육근돌(Keun-Dol Yook)

[정회원]



- 1999년 2월 : 충남대학교 보건대학원 (보건학 석사)
- 2011년 2월 : 한남대학교 대학원 미생물학과 (박사수료)
- 1990년 7월 ~ 2006년 2월 : 가톨릭의대대전성모병원 진단검사의학과 근무
- 2006년 3월 ~ 현재 : 대전보건대학교 조교수

<관심분야>
임상병리학 및 미생물학

박 진 속(Jin-Sook Park)

[정회원]



- 1989년 3월 : The University of Tokyo (미생물계통분류학 박사)
- 1989년 3월 ~ 1990년 2월 : 미쓰비시생명과학연구소 연구원(post doc.)
- 1990년 3월 ~ 현재 : 한남대학교 생명시스템학과 교수
- 1994년 1월 ~ 현재 : 한국미생물학회, 평의원, 기획실무위원, 편집위원
- 2004년 1월 ~ 현재 : 한국생태학회 이사
- 2007년 6월 ~ 2008년 5월 : 국가과학기술위원회 전문위원

<관심분야>

미생물계통분류학, 환경미생물학