

Detection of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in Clinical Isolates of Chromosomal AmpC β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Korea and Their Molecular Characteristics

Chang-Ki Kim¹, Jong Hwa Yum², Dongeun Yong^{3,4},
Seok Hoon Jeong^{3,4}, Kyungwon Lee^{3,4}, Yunsop Chong^{3,4}

¹Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, Seoul;

²Department of Biomedical Laboratory Science, Dong-Eui University College of Natural Science, Busan;

³Department of Laboratory Medicine and ⁴Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Clinical isolates of AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* were evaluated to determine the prevalence of CTX-M extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and their genetic environments.

Methods: A total of 250 non-duplicate isolates of *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* and *Morganella morganii* were collected at a Korean hospital. ESBL production was determined by double disk synergy test. For ESBL producers, *bla* genes were sequenced and *bla*_{CTX-M} environment was characterized by PCR mapping and sequencing.

Results: Among the 250 isolates 29 (11.6%) produced ESBL, and 14 of the 29 isolates produced CTX-M ESBLs, including CTX-M-9 by 8 isolates, CTX-M-3 by 4 isolates, CTX-M-12 by 1 isolate, and CTX-M-14 by 1 isolate. *ISEcp1* was present upstream of *bla*_{CTX-M-3}, 12, and 14. Three of the four CTX-

M-3 producers had the same genetic environment (*pemK-ISEcp1-bla*_{CTX-M-3}-orf477-*mucA*). An IS903-like element was found downstream of *bla*_{CTX-M-14}. *ISCR1* was identified upstream of *bla*_{CTX-M-9} and *ISCR1* and *bla*_{CTX-M-9} were located on *sul1*-type class 1 integron. The variable region between the 5'-CS and the first 3'-CS contained *dfrA16* and *aadA2*. Its structure was similar to that of In60, but our isolates did not have IS3000 or second 3'-CS.

Conclusion: CXT-M type ESBL was prevalent in AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, particularly *E. cloacae*. *bla*_{CTX-M} genes were associated with *ISEcp1* or *ISCR1*. This is the first report on the genetic environment of *bla*_{CTX-M} in Korean isolates. (Korean J Clin Microbiol 2008;11:90-97)

Key Words: Extended-spectrum β -lactamase, CTX-M, Genetic characteristics

서 론

1983년 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*가 발견된 이래로, 전세계적으로 여러 균종에서 ESBL 생성 균주가 증가하고 있다[1]. 과거에는 대부분의 ESBL이 TEM 혹은 SHV형이었으나 최근 새로운 종류의 ESBL인 CTX-M, VEB, GES 등이 출현하였다[2-4]. CTX-M형 ESBL은 ceftazidime에 비해 cefotaxime을 가수분해 활성이 더 강한 특성이 있다[5]. 이 효소는 1980년대 후반 일본, 유럽 그리

고 아르헨티나에서 발견되기 시작하였고[6], 1990년대 중반부터 변이형이 급속하게 증가하여[7], 현재까지 60개 이상의 CTX-M 효소가 보고되었다(<http://www.lahey.org/Studies>). CTX-M형 ESBL은 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* 등의 *Enterobacteriaceae*에 혼한 것으로 알려져 있다[5].

*bla*_{CTX-M} 유전자의 전이와 발현에는 여러 유전요소가 관여한다[7]. 즉, *ISEcp1*-like insertion sequence (IS)는 두 개의 불완전 역방향반복서열과 transposase 유전자로 추정되는 ORF로 구성되어 있는데, CTX-M-1, -3, -14, -15 등의 *bla*_{CTX-M} 유전자 상류에 있음이 보고되었다[7]. 반면 CTX-M-2와 -9에서는 *ISCR1*이 *bla*_{CTX-M} 유전자 상류에 있으며 *sul1* type의 complex integron에 존재하는 것으로 알려져 있다[5,7-10].

Received 4 February, 2008, Accepted 20 August, 2008

Correspondence: Kyungwon Lee, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, 250, Seongsan-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 82-2-2228-2446, (Fax) 82-2-313-0908, (E-mail) leekcp@yuhs.ac

국내에서는 2001년 CTX-M-14을 생성하는 *Shigella sonnei*, *E. coli* 및 *K. pneumoniae*가 처음으로 보고되었고[11], 그 후 CTX-M-3, -9, -12, -15 등이 여러 그람음성 간균에서 보고되었다[12-15]. 그러나 종특이적 염색체성 AmpC β -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae*에서의 CTX-M 효소 생성에 관한 국내 연구가 적고, 국내 균주의 *bla*_{CTX-M} 유전자 주변 구조에 대해 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 종특이적 염색체성 AmpC β -lactamase를 생성하는 *Enterobacteriaceae* 균종을 대상으로 *bla*_{CTX-M} 유전자를 검출하고, 이 유전자의 주변 구조를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주수집

서울의 한 대학병원에서 2006년 2월부터 9월에 분리된 *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens* 및 *M. morgani* 일련균주를 50주씩 수집하였다. 균종 동정은 전통적인 생화학적 방법과 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek, Marcy l'Étoile,

France)를 이용하였다.

2. 항균제 감수성 시험

항균제 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 디스크 확산법으로 시험하였으며[16], 정도관리를 위해 *E. coli* ATCC 25923과 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853를 함께 시험하였다.

3. ESBL 생성시험

Ceftazidime 및 cefotaxime에 내성 혹은 중등도 감수성인 균주를 선택하여, double disk synergy (DDS) 시험으로 ESBL 생성을 확인하였다. 즉, 세균을 생리식염수에 0.5 McFarland 농도로 부유시킨 후 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종하였고, 배지 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid 디스크(Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA)를 놓고 주위에 ceftazidime, cefotaxime 및 cefepime 디스크(Becton Dickinson)를 1.5 cm (디스크 가장자리에서 가장자리) 거리를 두고 놓았다. 접종한 배지는 35°C에서 하룻밤 배양한 후, 두 디스크 사이

Table 1. Sequences of the primers for *bla* genes and *bla*_{CTX-M} genetic environment

Target	Primer name	Primer sequence	Reference
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M 1F	5'-CCGTCACGCTGTTGTTAGG-3'	[27]
	CTX-M 1R	5'-GACGATTTTAGCCGCCGAC-3'	[27]
	CTX-M 2F	5'-CGGTGCTTAAACAGAGCGAG-3'	[27]
	CTX-M 2R	5'-CCATGAATAAGCAGCTGATTGCC-3'	[27]
	CTX-M 8F	5'-ACGCTCAACACCGCGATC-3'	[27]
	CTX-M 8R	5'-CGTGGGTTCTCGGGGATAA-3'	[27]
	CTX-M 9F	5'-GATTGACCGTATTGGGAGTTT-3'	[27]
	CTX-M 9R	5'-CGGCTGGGTAAAATAGGTCA-3'	[27]
	CTXM-3A	5'-CCCATGGTTAAAAATCACT-3'	This study
	CTXM-3B	5'-CCGTTTCCGCTATTACAAAC-3'	This study
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGT-3'	[27]
	TEM R	5'-TTACCAATGTCTAATCAGTGA-3'	[27]
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F	5'-CCGGGTATTCTTATTGTGCTGCT-3'	[27]
	SHV R	5'-TAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	[27]
<i>bla</i> _{GES}	GES/IBC F	5'-GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT-3'	[27]
	GES/IBC R	5'-TGTCCGTGCTCAGGATGAGT-3'	[27]
<i>bla</i> _{VEB}	VEB1-F	5'-ACGAAGAACAATGCACAAGG-3'	This study
	VEB1-R	5'-GAACAGAATCAGTTCCTCCG-3'	This study
orf477	orf477 reverse	5'-ACTTCAAAAATTATGCCACC-3'	[7]
<i>mucA</i>	<i>mucA</i> lower	5'-GGCATCAGGCAGGGTAAGG-3'	[7]
orf513	orf513	5'-TGGAAGAGGGCGAAGACGAT-3'	[7]
	orf513 rev	5'-GCGTTTTATCGGTAGTCGTC-3'	[7]
3'CS	qacED1	5'-TCGCAACATCCGCATTAATA-3'	[7]
	qacED1 reverse	5'-TTTTAATGCGGATGTTGCGA-3'	[7]
ISEcp1	sulI rev	5'-GCTCAAGAAAAATCCCATCCCC-3'	[7]
	tnpA1 ISEcp1	5'-AATACTACCTTGCTTTCTGA-3'	[7]
	ISEcp1 5	5'-TTCAAAAAGCATAATCAAAGCC-3'	[7]
IS903	ISEcp1 reverse	5'-CAACCACCTTTCAATCATTTTT-3'	[7]
	IS903 Rev	5'-CATCATCCAGCCAGAAAAGTT-3'	[7]
	tnpA1 IS903 Rev	5'-CGGTTGTAATCTGTTGTCCA-3'	[7]
<i>pemK</i>	<i>pemK</i> F	5'-AGGGGAAATCTGGCTTGCT-3'	[27]
	<i>pemK</i> R	5'-TCTGTGCAACAATGGGTCA-3'	[27]

에 억제대가 커지면 DDS 양성으로 해석하였다.

4. ESBL 유전자 검출 및 CTX-M 유전자 주변구조 분석

TEM, SHV, CTX-M, GES 및 VEB형의 ESBL 유전자를 PCR로 검출하기 위해 사용된 시발체는 Table 1과 같다. 시험세균을 증류수 100 μ L에 부유시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 DNA를 추출하였고, 원심분리 후 상청액 1 μ L를 template로 사용하였다. PCR 반응은 시발체의 melting temperature와 증폭산물의 크기에 따라 시행하였고, PCR 반응을 위해서는 PCR Premix (Bioneer, Chongwon, Korea) 20 μ L tube를 사용하였다. PCR 산물은 1% agarose (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)에 전기영동하여 관찰하였고, 유전자 증폭이 확인된 경우 DNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 전기영동 gel에서 DNA를 추출하여 염기서열 분석이 사용하였다. 염기서열은 양 방향 모두 분석하였다.

CTX-M 유전자의 주변구조는 PCR mapping과 염기서열분석을 통해 분석하였다. *ISEc1*, *IS903* 및 *ISCRI* 등의 *bla*_{CTX-M} 주

변 구조를 분석하는데 사용한 시발체는 Table 1과 같다.

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 분석

시험세균을 제한효소 *XbaI* (Takara Biotechnology, Shiga, Japan)으로 처리하여, contour-clamped homogeneous field machine (CHEF-DR II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 전기영동하였으며, 결과의 해석은 Tenover 등[17]의 방법에 따랐다.

결 과

1. ESBL 생성현황

시험균주 250주 중 ceftazidime 및 cefotaxime에 내성이거나 중등도 감수성인 균주는 90주(36%)이었고, 이중에서 29주(12%)가 DDS 양성이었다. 균종별로는 *E. cloacae* 50주 중 10주(20%)가 ESBL을 생성하여 가장 높은 비율을 보였다(Table 2). 한편 *M. morganii* 50주 중에서는 단 한 주만이 ESBL을 생

Table 2. Types of ESBL produced by species

Species (No. tested)	No. (%) of DDS positive	ESBL (No. of isolates)			
		CTX-M type	SHV type	TEM type	Mixed ESBLs
<i>E. aerogenes</i> (50)	6 (12)	-	SHV-12 (3)	TEM-52 (2)	CTX-M-9+SHV-12 (1)
<i>E. cloacae</i> (50)	10 (20)	CTX-M-3 (1), -9 (1)	SHV-12 (3)	-	CTX-M-9+SHV-12 (5)
<i>S. marcescens</i> (50)	8 (16)	CTX-M-3 (2)	SHV-12 (3)	TEM-52 (3)	-
<i>C. freundii</i> (50)	4 (8)	CTX-M-3 (1), -9 (1), -12 (1)	SHV-2a (1)	-	-
<i>M. morganii</i> (50)	1 (2)	CTX-M-14 (1)	-	-	-
Total (250)	29 (12)	8	10	5	6

Abbreviation: DDS, double disk synergy.

Table 3. Characteristics of CTX-M type ESBLs in clinical isolates

Isolate	Specimen	Ward	CTX-M type	Other β -lactamases	Upstream of <i>bla</i> _{CTX-M}		Associated resistances
					<i>ISEc1</i>	<i>ISCRI</i>	
<i>C. freundii</i> 06-5-U664	Urine	Hematology	CTX-M-12	TEM-1	+	-	GEN TOB
<i>C. freundii</i> 06-5-U1734	Urine	Medical ICU	CTX-M-9	-	-	+	AMK GEN NET TOB COT
<i>C. freundii</i> 06-5-P448	Wound	Oncology	CTX-M-3	TEM-1	+	-	AMK GEN NET TOB COT
<i>E. aerogenes</i> 06-6-R756	Sputum	Neurology	CTX-M-9	TEM-1, SHV-12	-	+	GEN NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-2-R1363	Sputum	Cardiosurgery	CTX-M-9	SHV-12	-	+	AMK NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1137	Sputum	Neurology ICU	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R468	Sputum	GI	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1186	Sputum	GI	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1124	Sputum	GI	CTX-M-9	-	-	+	AMK GEN NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-C242	Pleural fluid	CCU	CTX-M-9	SHV-12	-	+	AMK GEN TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-4-P445	Wound	Neurosurgery	CTX-M-3	-	+	-	AMK NET TOB LEV COT TET
<i>M. morganii</i> 06-8-P334	Bile	Oncology	CTX-M-14	TEM-1	+	-	
<i>S. marcescens</i> 06-6-R1088	Sputum	Pediatrics	CTX-M-3	-	+	-	AMK GEN NET TOB LEV COT TET
<i>S. marcescens</i> 06-7-B4288	Discharge	ENT	CTX-M-3	-	+	-	AMK GEN NET TOB LEV COT TET

Abbreviations: GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; NET, netilmicin; COT, cotrimoxazole; LEV, levofloxacin; TET, tetracycline.

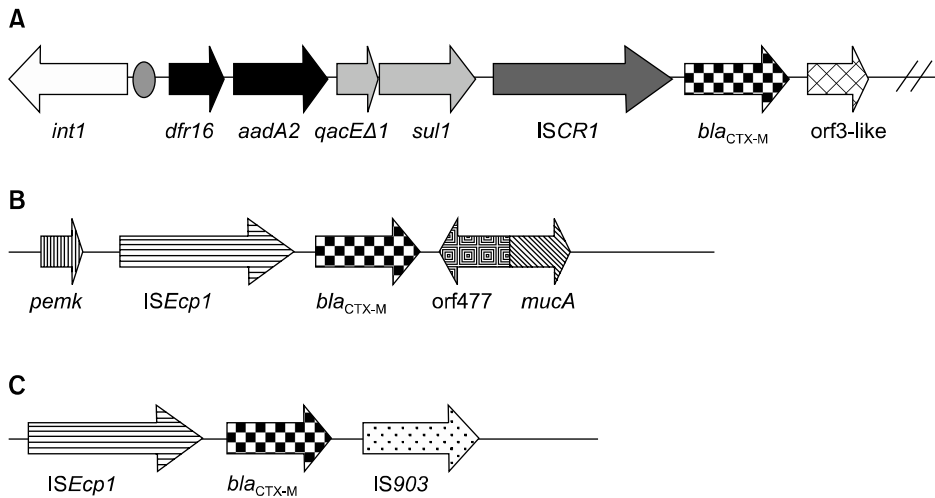


Fig. 1. Schematic representation of the genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. (A) *C. freundii* 06-5-U1734 and *E. cloacae* 06-2-R1363 (CTX-M-9), (B) *C. freundii* 06-5-P448, *S. marcescens* 06-6-R1088 and 06-7-B4288 (CTX-M-3), (C) *M. organii* 06-8-P334 (CTX-M-14).

성하였다.

2. ESBL 유전형 및 CTX-M 생성균주의 항균제 감수성

DDS 양성 균주 29주 중에서 유전자형별로 PCR 양성인 균주는 *bla*_{SHV} 16주, *bla*_{CTX-M}은 14주가, *bla*_{TEM}은 5주이었다. *bla*_{GES}와 *bla*_{VEB} 양성인 균주는 없었다. 염기서열 분석에서 *bla*_{SHV} 양성 균주 16주 중 15주는 *bla*_{SHV-12}와 염기서열이 일치하였고, 한 주는 *bla*_{SHV-2a}와 일치하였다. *bla*_{CTX-M} 생성 14주 중 8주가 *bla*_{CTX-M-9}와, 4주가 *bla*_{CTX-M-3}과 일치하였다(Table 2). *bla*_{CTX-M-12} 양성 *C. freundii*와 *bla*_{CTX-M-14} 양성 *M. organii*도 각각 한 주씩 검출되었다. 5주에서 검출된 *bla*_{TEM} 모두는 *bla*_{TEM-52}와 일치하였다. *bla*_{CTX-M-9} 유전자를 지닌 균주 중 6주는 *bla*_{SHV-12}를 동시에 지니고 있었다.

*bla*_{CTX-M} 유전자를 지닌 14주 중 7주는 levofloxacin, 12주는 cotrimoxazole, 10주는 tetracycline에 내성이었다. 또한 *bla*_{CTX-M-14} 유전자를 지닌 *M. organii*를 제외한 모든 균주가 다양한 aminoglycoside 항균제에 내성이었다(Table 3).

3. CTX-M 유전자의 주변구조 및 PFGE 분석 결과

*bla*_{CTX-M} 유전자 상류에서 IS를 검출하기 위하여 PCR mapping과 염기서열 분석을 시행하였다. 총 8주에서 검출된 *bla*_{CTX-M-9} 유전자 모두의 상류에서는 ISCR1, *bla*_{CTX-M-3} (4주), *bla*_{CTX-M-12} (1주) 및 *bla*_{CTX-M-14} (1주)의 상류에는 ISEcp1이 검출되었다(Fig. 1). *bla*_{CTX-M-9} 유전자와 연관된 ISCR1 모두의 상류에는 *dfrA16*과 *aadA2* 유전자 cassette를 가진 class 1 integron이 확인되었다. 이들 중 2주를 임의로 선택하여 *bla*_{CTX-M-9} 하류 구조를 분석한 결과 orf3-like sequence가 확인되었다. 한편 *bla*_{CTX-M-3} 유전자가 검출된 4주 중 3주의 ISEcp1 상류에서 *pemK* 유전자, *bla*_{CTX-M-3}의 하류에서 *mucA* 유전자가 확인되었다. *M. organii* 균주의 *bla*_{CTX-M-14} 하류에서는 IS903-like element가 검출되었다. 반면 *bla*_{CTX-M-12} 유전자의 상류에는 ISEcp1

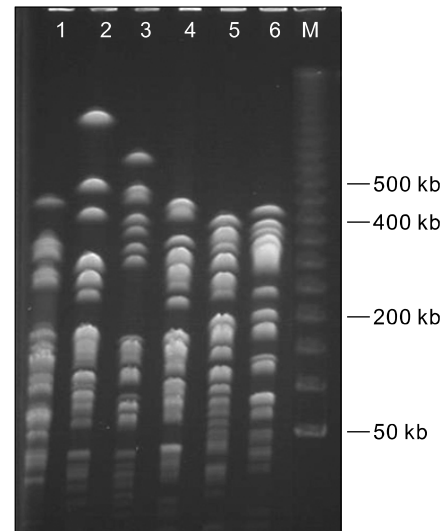


Fig. 2. PFGE analysis of CTX-M-9 producing *E. cloacae* isolates. Lane 1, 06-2-R1363; Lane 2, 06-5-R1137; Lane 3, 06-5-R468; Lane 4, 06-5-C242; Lane 5, 06-5-R1186; Lane 6, 06-5-R1124. Lane, M, DNA molecular marker.

이 있었으나 integron이나 다른 IS 등의 주변구조는 검출되지 않았다.

*bla*_{CTX-M-9} 유전자 함유하는 *E. cloacae* 6주의 염색체 DNA를 *Xba*I로 처리하여 PFGE를 시행한 바, banding pattern이 서로 상이하여 이들 균주간에 역학적인 연관성이 없는 것으로 판단되었다(Fig. 2).

고 찰

ESBL 생성 세균의 비율은 지역과 군종에 따라 차이가 큰데, 1997년에서 1999년까지 수집된 SENTRY 프로그램 균주 중에서 *K. pneumoniae*의 4.9~45.4%와 *E. coli*의 4.2~8.5%가

ESBL 생성이 의심되었고, 남미와 서태평양 지역에서 북미지역보다 ESBL 생성이 더 흔한 것으로 보고되었다[18]. 국내에서 시행된 전국규모의 연구에 의하면 ESBL 생성 *E. coli*의 비율은 9~10.4%, *K. pneumoniae*는 25~30%로 나타났다[19,20]. *E. coli*와 *K. pneumoniae* 이외의 균종에서도 ESBL 생성 비율이 증가하고 있음이 보고되었으나[21-24], 종특이적 염색체성 AmpC β -lactamase를 생성하는 *Enterobacteriaceae*의 ESBL 빈도에 대해서는 알려진 바가 적다. 그 이유는 CLSI에서 *E. coli*, *Klebsiella* spp. 및 *P. mirabilis*에 대해서만 ESBL 검출 기준을 제시하고 있으며, AmpC β -lactamase가 다량 생산될 경우 이들 균종에서 ESBL 생성을 검출하기 힘들기 때문이다[24]. 그러나 AmpC β -lactamase가 cefepime을 분해하지 못하므로 cefepime 디스크로 DDS 시행할 경우 이들 균종에서 ESBL 검출율이 향상됨이 여러 연구자들에 의해 보고되었다[21,25,26]. 본 연구에서도 ESBL 검출을 위해 cefepime 디스크를 포함하여 DDS를 시행하였는데, 250주 중에서 29주(12%)가 ESBL을 생성하였고, 이 중 2주는 cefepime 디스크만 양성이었다. 한편 본 연구에서는 *E. cloacae* 중 20% (10/50)가 DDS 양성으로 가장 흔히 ESBL 생성을 생성하였는데, 이는 박 등[22]의 보고와 유사한 결과였다.

국내에서 검출되는 ESBL은 과거 TEM 및 SHV형이 대부분이었으나 최근 CTX-M형의 분리가 증가함이 보고되고 있다[12,13,27-31]. 오 등[15]의 연구에 따르면 국내 주요 병원 분리 *E. coli*에서 가장 흔한 ESBL은 CTX-M형 ESBL이었으며, CTX-M-15, -14, -3, -9, 및 -12 등 여러 CTX-M형 ESBL이 검출되었다. 배 등[12]은 국내 분리 *K. pneumoniae*에서 가장 흔한 ESBL은 SHV-12이었으며 CTX-M-3, -9, -12, -14, -15 등이 검출되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 SHV형 ESBL이 가장 흔하였으며, CTX-M형 ESBL이 그 다음이었다. 단일 유전자로는 SHV-12가 15주에서 검출되어 가장 흔하였고, CTX-M-9 생성하는 균주는 8주로 두 번째로 흔하였다. 특징적으로 SHV-12와 CTX-M-9를 동시에 생성하는 균주가 6주 있었는데 PFGE 분석결과 유전적 연관성은 낮았다. 국내 여러 보고에서도 SHV-12와 CTX-M을 동시에 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 보고되었는데 cefotaxime과 ceftazidime에 모두 고도 내성이므로 이들 세균의 전파가 우려된다고 하였다[12,15]. 또한 CTX-M-3 생성 균주가 4주 있었고, CTX-M-12 생성 *C. freundii*와 CTX-M-14 생성 *M. organii*가 각각 한 주씩 분리되었다. CTX-M-12는 2001년 케냐에서 처음 발견된 ESBL로 2006년 국내에서도 CTX-M-12 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 보고되었으나[12,15,32], *C. freundii*에서 검출된 것은 세계 최초로 생각된다.

본 연구에서는 CTX-M을 생성하는 14균주 모두에서 bla_{CTX-M} 유전자의 주변 구조를 분석하였다. CTX-M-3, -12, -14 생성 6주에서는 bla_{CTX-M} 상류에 *ISEcp1*이 있었고, *ISEcp1*에 다른 IS

가 삽입된 경우는 없었다. *C. freundii* 06-5-P44816, *S. marcescens* 06-6-R1088, 06-7-B4288 균주에서 발견된 $bla_{CTX-M-3}$ 의 주변 구조는 모두 동일하였는데, *ISEcp1* 상류에는 *pemK* 유전자, $bla_{CTX-M-3}$ 하류에는 *mucA* 유전자가 있었다. *pemK* 유전자는 postsegregational killing system을 coding하며 plasmid를 안정화하는데 관여한다[33,34]. *mucA*는 LexA repressor에 결합하는 protein 유전자이다[33,34]. 이 두 유전자는 1993년 *M. organii*에서 발견된 plasmid R446b에 일렬로 존재하고 있는데, $bla_{CTX-M-3}$ 를 포함하는 약 3 kb의 transposon이 이들 유전자 사이에 삽입된 것으로 추정되고 있다[33]. 이와 같은 $bla_{CTX-M-3}$ 의 주변 구조는 프랑스, 폴란드에서 분리된 균주의 $bla_{CTX-M-3}$ 주변 구조와 동일하였다[7,33,34]. $bla_{CTX-M-12}$ 유전자의 경우 *ISEcp1*이 상류에 있는 것을 확인하였으며, 주변 구조의 확인을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. $bla_{CTX-M-14}$ 상류에는 *ISEcp1*, 하류에는 IS903이 있었는데 프랑스, 중국 및 베트남에서 검출된 $bla_{CTX-M-14}$ 유전자와 동일한 구조였다[7,33]. IS903은 $bla_{CTX-M-14}$ 하류에서 통상적으로 관찰되지만, Poirel 등[35]은 이 IS가 bla_{CTX-M} 유전자의 이동에는 관여하지 않는다고 보고하였다.

한편 8주에서 검출된 $bla_{CTX-M-9}$ 유전자의 상류에서는 *ISCR1*이 관찰되었다. $bla_{CTX-M-2}$ 와 $bla_{CTX-M-9}$ 은 *ISCR1*을 가지고 있는 class 1 integron에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 complex class 1 integron에는 5' CS와 3' CS 사이에 다양한 gene cassette가 존재하며, 첫 번째 3' CS와 두 번째 3' CS 사이에 *ISCR1*과 bla_{CTX-M} 유전자가 위치하는 것이 특징이 있다. $bla_{CTX-M-2}$ 는 일반적으로 In35이나 InS21에 삽입되어 있으며, $bla_{CTX-M-9}$ 은 In60이나 그 variant에 존재하는 것으로 보고 되었다[7,9]. 본 연구의 $bla_{CTX-M-9}$ 보유 균주에는 *dfrA16*와 *aadA2* gene cassette를 가진 integron이 관찰되었으며 이는 In60에 있는 gene cassette와 같았다. 이중 2주에서 bla_{CTX-M} 주변 구조를 분석하였는데, $bla_{CTX-M-9}$ 하류에서 orf3-like sequence를 확인하였으나 In60의 구조인 IS3000 및 두 번째 3' CS는 관찰되지 않았다. Novais 등[36]은 CTX-M-9 생성 균주를 대상으로 한 연구에서 In60에 다양한 variant가 있음을 보고하였으며, 본 연구에서와 같이 orf3-like sequence 하류가 소실된 경우도 있었다.

CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15 및 CTX-M-32 생성 균주의 전파는 특정 plasmid와 연관되어 있음이 보고되었다[9]. $bla_{CTX-M-15}$ 의 국제적인 확산은 incompatibility group FII (IncFII) plasmid의 전파와 관련 있는 것으로 알려져 있다[37]. Canton 등은 1996년부터 2003년에 스페인 한 병원에서의 $bla_{CTX-M-9}$ 의 확산은 narrow host-range plasmid인 IncH12의 전파가 원인이라고 보고하였다[9]. 본 연구에서 CTX-M-9 생성 *E. cloacae*는 PFGE 양상이 서로 상이하여, $bla_{CTX-M-9}$ 을 보유하는 동일 plasmid가 전파되었을 것으로 생각된다.

CTX-M ESBL 생성 균주는 다른 계열 항균제에 내성인 경우

가 많다[9]. Golebiewski 등은 폴란드에서 확산된 plasmid pCTX-M-3에 *bla*_{CTX-M-3}와 16S rRNA methylase 유전자인 *armA*를 비롯한 여러 내성 유전자가 함께 있었다고 보고하였다[34]. 또한 CTX-M형 ESBLS 생성균주 중에는 fluoroquinolone에 대한 내성 비율이 높는데[38], plasmid로 전이되는 quinolone 내성 유전자인 *qnr*이나 *aac(6')-Ib-cr*와 밀접한 연관성이 있음이 알려져 있다[39-41]. 본 연구에서도 CTX-M 생성 균주들은 aminoglycoside와 fluoroquinolone, tetracycline 및 cotrimoxazole 등에 내성인 경우가 많았다. 따라서 *bla*_{CTX-M}을 전달하는 plasmid를 분석할 필요가 있으며, 16S rRNA methylase, *qnr* 및 *aac(6')-Ib-cr*에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

본 연구에서 종특이적 염색체성 AmpC- β -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae*에서 CTX-M 효소를 생성하는 균주가 흔하였고, CTX-M 유전자는 *ISEcp1*와 연관되었거나 complex class 1 integron에 존재함을 확인하였다. *Enterobacteriaceae*에서 급속하게 증가하고 있는 CTX-M ESBLS에 대한 지속적인 감시와 전파에 관련된 유전환경 및 plasmid에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 대한임상미생물학회 지원으로 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1249-55.
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLS. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:459-69.
- Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:698-702.
- Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1144-7.
- Walther-Rasmussen J and Høiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Can J Microbiol* 2004;50:137-65.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
- Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:14-23.
- Brizio A, Vasco S, Goncalves AR, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ, et al. Survey of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*_{CTX-M-9} gene. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:320-4.
- Canton R and Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466-75.
- Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, et al. PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:791-5.
- Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 2001;39:3747-9.
- Bae IK, Jeong SH, Lee K, Yong D, Lee J, Hong SG, et al. Emergence of CTX-M-12 and a novel CTX-M type extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Lab Med* 2006;26:21-6.
- Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1572-5.
- Kim YR, Kim SI, Lee JY, Park YJ, Lee KY, Kang MW. Nosocomial transmission of CTX-M-15 and OXA-30 β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a neurosurgical intensive care unit. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:297-301.
- Oh CE, Hong JS, Bae IK, Song EH, Jeong SH, Lee KW, et al. Dissemination of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases and emergence of CTX-M-12 in *Escherichia coli*. *Korean J Lab Med* 2005;25:252-8.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Ninth Edition: Approved Standard M2-A9. Wayne, PA; CLSI, 2006.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl 2):S94-103.
- Lee JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Woo GJ, Lee J, 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* 2004;7:111-8.
- 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* 2003;23:18-24.
- Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000;38:542-6.
- Park YJ, Park SY, Oh EJ, Park JJ, Lee KY, Woo GJ, et al. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:265-9.
- Hoffmann H, Sturenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:322-30.

24. Ho PL, Shek RH, Chow KH, Duan RS, Mak GC, Lai EL, et al. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp. in Hong Kong, 2000-2002. J Antimicrob Chemother 2005;55:326-32.
25. Yu WL, Cheng KC, Chi CJ, Chen HE, Chuang YC, Wu LT. Characterisation and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolated from a district teaching hospital in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2006;12:579-82.
26. Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. J Clin Microbiol 2003;41:3933-5.
27. Bae IK, Lee BH, Hwang HY, Jeong SH, Hong SG, Chang CL, et al. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. J Antimicrob Chemother 2006;58:315-9.
28. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, et al. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. J Appl Microbiol 2005;98:921-7.
29. 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;42:2902-6.
30. Pai H. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases in Korean isolates of *Enterobacteriaceae*. Yonsei Med J 1998;39: 514-9.
31. Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, et al. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999;37:1758-63.
32. Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2141-3.
33. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. FEMS Microbiol Lett 2004;234: 201-7.
34. Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3789-95.
35. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:447-50.
36. Novais A, Canton R, Valverde A, Machado E, Galan JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI groups. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2741-50.
37. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3758-64.
38. Morosini MI, Garcia-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, et al. Antibiotic coresistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2695-9.
39. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1178-82.
40. Nordmann P and Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2005;56:463-9.
41. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 2006;12:83-8.

=국문초록=

염색체성 AmpC β -Lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 균종에서의 CTX-M형 Extended-Spectrum β -Lactamase 검출과 분자유전학적 특성 규명

¹대한결핵협회 결핵연구원, ²동의대학교 자연과학대학 임상병리학과, ³연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, ⁴세균내성연구소
김창기¹, 염종화², 옹동은^{3,4}, 정석훈^{3,4}, 이경원^{3,4}, 정윤섭^{3,4}

배경: 세계 여러 지역에서 CTX-M형 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 그람 음성 간균이 증가하고 있다. 본 연구에서는 AmpC β -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 균종에서 CTX-M형 ESBL 유전자를 검출하고, *bla*_{CTX-M}의 주변 유전구조를 규명하고자 하였다.

방법: 2006년 4월부터 9월까지 국내 1개 대학병원에서 분리된 *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*의 일련 균주를 50주씩 수집하였다. ESBL 생성은 ceftazidime, cefotaxime, cefepime 및 amoxicillin-clavulanic acid 디스크를 이용한 double disk synergy로 시험하였다. ESBL 유전자형 규명을 위해 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES} 및 *bla*_{VEB} 유전자를 PCR로 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. CTX-M이 양성인 경우 IS element와 integron 등의 주변 구조를 분석하였고 염색체를 *Xba*I로 처리해 pulsed-field gel electrophoresis를 시행하였다.

결과: 시험된 250주 중 ESBL 생성주는 *E. cloacae* 10주, *S. marcescens* 8주, *E. aerogenes* 6주, *C. freundii* 4주, *M. morganii* 1주의 29주(12%)이었다. SHV-12와 CTX-M-9 유전자를 동시에 가진 균주가 6주, SHV-12가 9주, SHV-2a가 1주, TEM-52가 5주, CTX-M-3가 4주, CTX-M-9가 2, CTX-M-14와 CTX-M-12가 각각 1주이었다. 모든 *bla*_{CTX-M-9}는 ISCR1을 포함하는 class 1 *sul*1-type integron에 있었으며, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-12} 및 *bla*_{CTX-M-14} 유전자의 상류에는 *ISEcp1*이 있었다. CTX-M-3 양성주 중 3주는 *pemK-ISEcp1-bla*_{CTX-M-3-mucA}의 유전자 구조를 갖고 있었다.

결론: 염색체성 AmpC β -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 중에 ESBL 생성균주가 흔하였으며 가장 흔한 ESBL형은 SHV-12이었고, 그 다음은 CTX-M-9이었다. CTX-M 유전자는 *ISEcp1*과 연관되거나 complex integron에 존재하였다. [대한임상미생물학회지 2008;11:90-97]

교신저자 : 이경원, 120-752, 서울시 서대문구 성산로 250
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02-2228-2446, Fax: 02-313-0908
E-mail: leekcp@yuhs.ac