

Diversity of Genetic Environment of *bla*_{CTX-M} Genes and Antimicrobial Susceptibility in Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* Isolated in Korea

Yun-Yi Yang and Min-Ho Suh*

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, 1035 Dalgubeol-daero, Dalseo-Gu, Daegu, 42601, Korea

Corresponding

Min-Ho Suh
 Department of Microbiology,
 Keimyung University School of Medicine, 1035
 Dalgubeol-daero, Dalseo-Gu, Daegu, 42601,
 Korea.

Phone : +82-53-258-7371

Fax : +82-53-258-7363

E-mail : minho@dsmc.or.kr

Received : July 30, 2019

Revised : August 27, 2019

Accepted : August 28, 2019

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Increasing resistance due to the production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in *Escherichia coli* is a major problem to public health and CTX-M enzymes have become the most prevalent ESBL worldwide. In this study, resistance profiles of *E. coli* isolated in Korea and the genetic environments of *bla*_{CTX-M} genes were analyzed by PCR and direct sequencing to clarify the mechanisms of spread of CTX-M. Resistance rates of CTX-M-producing *E. coli*, including β -lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides, were significantly higher than that of CTX-M-non-producers ($p < 0.01$). Of 41 tested, 39 (95.1%) isolates of CTX-M-producing *E. coli* showed resistance transfer by conjugation. All the transconjugants harboured large plasmids of 118~172 megadalton. Insertion sequence *ISEcp1B* was detected in the upstream of the *bla*_{CTX-M} in 38 (92.7%) isolates with *bla*_{CTX-M}. *ISEcp1B* was disrupted by *IS26* in 16 (39.0%) isolates with *bla*_{CTX-M}. *ISEcp1B* carried -35 and -10 promoter components between right inverted repeat (IRR) and the start codon of *bla*_{CTX-M}. *orf477* or *IS903D* was observed in the downstream of the *bla*_{CTX-M} in all the isolates with *bla*_{CTX-M-3/15/55 or with *bla*_{CTX-M-14/27, respectively. Sequence similar to IRR of *ISEcp1B* was located downstream of *orf477*. Target duplication sequences were detected both upstream of IRR and downstream of IRR. These results showed the involvement of *ISEcp1B* in the mobilization of the resistance genes. In conclusion, the surrounding DNAs of *bla*_{CTX-M} genes were very diverse, and the spread and the expression of CTX-M may be deeply related with *ISEcp1B*. These informations will provide important knowledge to control the increase in CTX-M-ESBLs.}}

Key Words: ESBL, CTX-M, *ISEcp1B*, *IS26*, *Escherichia coli*

INTRODUCTION

감염병의 주요 치료법으로서 항균제가 사용되고 있으나 항균제 내성균으로 인한 감염병이 꾸준히 증가추세에 있으며, 특히 cefotaxime이나 ceftazidime 등의 확장형 cephalosporin과 aztreonam 등의 monobactam에도 내성을 나타내는 extended spectrum β -lactamase (ESBL) 생산균이 전세계적으로 확산되어 임상적으로나 역학적으로 큰 관심의 대상이 되고 있다 (1, 2). ESBL 중에서 그 빈도가 가장 높게 발생하고 있는 것이 CTX-M형이며 주로 대장균과 *Klebsiella pneumoniae*에서 검출된다 (1, 3).

대장균은 요로감염, 패혈증, 뇌막염 등을 일으키는데 (4), CTX-M을 생산하는 대장균들은 3세대 cephalosporin과 aminoglycoside계 및 quinolone계 등 세 가지 계열 이상의 항균제에 동시에 내성을 가지는 다제내성 대장균인 경우가 흔하다 (5, 6).

Copyright © 2019 Journal of Bacteriology and Virology

©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/>).

CTX-M형 다제내성 대장균들이 전 세계적으로 집단 발생 혹은 산발적 감염을 일으키고 있으며 (3, 5) 치료제 선택에 큰 어려움을 주고 있다 (6~9). 다제내성 대장균의 최선의 치료제 선별에 필요한 정보를 얻기 위해서는 임상가검물을 대상으로 항균제 감수성 검사를 통한 정기적인 내성양상조사가 필수적으로 요구된다 (3, 7, 9).

다제내성의 주요 원인은 여러 가지 내성유전자를 가지고 있는 R 플라스미드가 세균 사이에 전파됨으로써 초래된다고 알려져 있다 (10, 11). R 플라스미드가 내성유전자들을 획득하는 기전으로는 transposon이나 insertion sequence (IS) 등의 이동성 DNA에 의한 유전자 가동(genetic mobilization)이 깊이 관련되어 있으며, 이와 함께 다양한 내성유전자를 채집하는 기능을 가진 인테그론-유전자 카세트가 주목받고 있다 (9, 12~15). CTX-M형 β -lactamase들이 성공적으로 전 세계적으로 확산되게 된 유전적 기반은 아직 잘 규명되어 있지 않으며, CTX-M을 생산하는 다제내성 대장균들의 확산 기전과 내성유전자의 발현 기전을 파악하기 위해서는 *bla*_{CTX-M} 유전자 주변의 유전적 기반 분석이 이루어져야 한다 (16~19).

이 연구에서는 *bla*_{CTX-M} 보유 대장균과 *bla*_{CTX-M} 비 보유 대장균 사이의 항균제 내성 양상을 비교 분석함으로써 *bla*_{CTX-M} 보유와 다제내성 빈도와의 관련성을 조사하며, 중합효소연쇄반응(PCR)과 유전자 염기서열 분석법을 이용해서 CTX-M 유전자 주변의 이동성 DNA 존재유무와 promoter서열의 존재여부 등의 분자유전적 기반을 분석함으로써 CTX-M형 ESBL 생산 대장균의 확산과 발현의 원인을 규명하고, CTX-M 증가 최소화를 위한 대책수립에서 활용될 분자유전학적 정보를 제공하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

균주 분리 및 동정

2016년 10월에서 2017년 2월 사이에 대구지역 1개 3차 병원에서 분리 배양된 후 균주센터에 보관된 대장균 121 주를 분양 받아 재확인 동정을 거친 후 실험에 사용하였다. 균 동정은 API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 및 MacConkey 배지 (Becton-Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)에서의 집락, Krigler Iron Agar (Becton-Dickinson and Co.), 운동성 검사, 요소 분해 검사 등의 전통적 동정 법에 의하여 동정하였다 (20).

균주 보관

수집된 균주를 Luria-Bertani broth (LB) 배지(USB Co., Cleveland, OH, USA)에 37 °C에서 15 시간 배양 후 배양 상태를 확인하고 배양액에 글리세롤을 15% 넣은 후 2 mL 미량원심분리관(Axygen Scientific, Union City, CA, USA)에 넣어 -70 °C에 냉동 보관하였다.

항균제

Ampicillin, cefotaxime, cefotaxime-clavulanate, ceftazidime, ceftazidime-clavulanate, aztreonam, imipenem, nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, amikacin, tobramycin, kanamycin, gentamicin, sulfamethoxazole-trimethoprim 등 17종의 항균제(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 실험하였다. 각 항균제는 규경된 용매에 용해시켜 고농도의 용액을 만들어 소분하여 -70 °C에 냉동보관하면서 필요시 1개씩 취하여 사용하였다.

항균제 감수성 검사

항균제 감수성검사는 평판희석법에 준하여 검사하였다 (21). 평판희석법에서는 순차적으로 희석된 소정 농도의 항균제가 함유된 Mueller-Hinton agar (MHA, Becton-Dickinson and Co.)를 사용하였고, 균주를 Tryptic soy broth (Becton-Dickinson and Co.)에 하루 배양한 후 생리식염수로 100배 희석하여 Steers 다중 점종기로 점종하여 37 °C에서 하루 배양시킨 다음 균의 발육 유무를 보아 최소억제농도를 결정하였다. 매 실험 마다 정도 관리를 위하여 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853을 함께 검사하였다 (21). 내성균 판정기준은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 기준 (22)을 사용하였다. 다제내성균의 판정기준은 Magiorakos 등 (23)의 기준을 적용하여, β -lactam계, aminoglycoside계, quinolone계 및 기타 항균제 계열들 중에서 적어도 3계열 이상의 항균제에 내성 혹은 비 감수성인 균을 다약제 내성균으로 판정

하였다.

ESBL검사

Cefotaxime에 내성인 균들을 MHA에 면봉으로 균액을 고르게 바른 후 cefotaxime 디스크와 cefotaxime-clavulanic acid 디스크, 그리고 ceftazidime 디스크와 ceftazidime-clavulanic acid 디스크를 얹어 배양하는 이중 디스크 확산 검사를 실시한 후 cefotaxime이나 ceftazidime의 억제 대 직경보다 각각의 clavulanic acid 혼합제의 억제대의 직경이 5 mm 이상 큰 경우에 ESBL로 확인하였다 (22). 항균제 디스크는 Becton-Dickinson and Co. 제품을 사용하였다.

접합에 의한 R plasmid의 내성전달검사

내성공여균과 피 전달 균 *E. coli* J53을 TSB에 각각 접종하여 4 시간 진탕 배양 후, 내성공여균과 피 전달 균을 1:4로 혼합하여 2 시간 동안 36.5 °C 수조에서 160 rpm으로 진탕배양하는 액체 접합 실험을 실시하였다. Transconjugant는 cefotaxime 2 mg/L 및 Na₃N 150 mg/L를 함유하는 MacConkey 선택 배지에 접종 후 배양하여 확인하였다. 피 전달 균 *E. coli* J53과 내성공여균들을 cefotaxime 2 mg/L 혹은 Na₃N 150 mg/L를 함유하는 MacConkey 선택 배지에 배양하여 피 전달 균은 항균제에 감수성이나 Na₃N에는 내성이고, 내성공여균은 항균제에 내성이나 Na₃N에는 감수성임을 확인 후 실험하였다.

plasmid DNA 분리 및 전기영동

Kado 및 Liu의 방법 (24)에 따라 실험하였다. 부모 균주와, 접합으로 내성이 전달된 transconjugant, 분자량 표준 균주 및 피 전달 균 *E. coli* J53을 LB 배지로 37 °C에서 17시간 회전 배양 후 1.5 mL 미량원심분리관에 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 상층 액을 제거하고 침전물에 1X Tris-EDTA액을 넣어 혼합 후 알칼리성 용균액(1 M Tris, 10% sodium dodecyl sulfate, pH12.5)을 넣어 56 °C 수조에서 45분간 용균을 시켰다. 용균된 균액을 5 분간 얼음 가루에 세워두고 phenol/chloroform 혼합액을 첨가하고 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 단백질을 제거하였다. 상층 액인 plasmid액을 뽑아 6X gel loading buffer 염색액에 혼합하여 0.7% agarose gel에 넣어 1X Tris-Borate-EDTA 완충액에서 40 V로 20시간 수평형 잠수식 전기영동을 하였다. 영동이 끝난 gel을 0.5 µg/mL ethidium bromide 염색 액에 1시간 염색하고 증류수에 씻은 후 Gel Doc-it TS 장치(UVP, Upland, CA, USA)로 촬영하여 관찰하였다.

DNA 추출

균주를 LB 배지에 배양 후 2 mL 미량원심분리관(Axygen Scientific)에 담아 4 °C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층 액을 제거하고 침전물만 남긴 후 멸균된 3차 증류수를 넣고 15분간 끓는 물에 담가두었다가 4°C에서 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상층액만 분리하였다. 분리된 상층액은 1.5 mL 미량원심분리관(SPL Lifesciences Co., Pocheon, Korea)에 옮겨 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

PCR에 의한 내성 유전자 *bla*_{CTX-M}의 유전적 기반 검사

먼저 0.2 mL PCR용 시험관(NEPTUNE Scientific, San Diego, CA, USA)에 멸균된 3차 증류수, GoTaq Flexi DNA 중합효소 (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 10 mM dNTP 혼합액(Solgent, Seoul, Korea) 및 primer를 혼합하여 18 µL의 PCR 혼합액을 만든 후 DNA시료 2 µL를 혼합하여 총량은 20 µL을 만들고 Thermal cycler (C1000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 PCR을 실시하였다. PCR된 DNA는 GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) DNA염색액을 혼합한 1.2% agarose gel에 10 µL씩 넣어 15 분간 100 V로 전기 영동 한 후 Gel Doc-it TS 장치(UVP)를 이용하여 증폭된 유전자들을 관찰하였다. PCR에 사용한 primer들은 Bionics (Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 사용한 primer들의 염기서열 정보와 GenBank 번호는 Table 1과 같다. PCR 조건은 94 °C에서 5분간 예열 후, 94 °C에서 1분, 57 °C에서 30초, 72 °C에서 1분간 35회 반응시킨 다음, 72 °C에서 5분간 처리 후 4 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Primer sequences used for PCR and DNA sequencing

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	GenBank accession no.	Position of primer
CTX-M3-S	CGT CAC GCT GTT GTT AGG AA	AM003906	1520-1539
CTX-M3-AS	ACG GCT TTC TGC CTT AGG TT	AM003906	2300-2281
CTX-M3-F	CTT CCA GAA TAA GGA ATC CCA T	AM003906	1453-1474
CTX-M3-R1	CCC ATT CCG TTT CCG CTA	AM003906	2366-2349
CTXM914F	GCT GGA GAA AAG CAG CGGAG	AJ972955	1751-1770
CTXM914R	GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	AJ972955	2224-2205
CTX-M9-S	TAT TGG GAG TTT GAG ATG GT	AJ972955	1620-1639
CTX-M9-AS	TCC TTC AAC TCA GCA AAA GT	AJ972955	2552-2533
CTX-M19-Rf	CCG TTG CAC TCT CTT TGT CA	AJ972955	1658-1639
TEM-S	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	AB103506	166-186
TEM-AS	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	AB103506	1245-1225
SHV/F	CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC	X04515	215-238
SHV/R	TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA	X04515	1223-1204
ISEcp1-F	ATC TAA CAT CAA ATG CAG G	AF458080	4958-4976
ISEcp1-R	AGA CTG CTT CTC ACA CAT	AF458080	6338-6321
ISEcp1-M	TGT CGT ATC TCG CGT ACT GAA	AF458080	5754-5774
ISEcp1-R-P2	TTT CCG CAG CAC CGT TTG C	AF458080	5497-5479
PROM-P4	TGC TCT GTG GAT AAC TTG C	AF458080	6218-6236
ISEcp1-TNPF	TTG GGC GAA TGA AGC CGT GT	AF550415	2680-2699
IS903-F	CAC ATG AAA TCA TCT GCG C	AF458080	7863-7881
IS903-R	CCG TAG CGG GTT GTG TTT TC	AF458080	8335-8316
IS903-R2	G CGC AGA TGA TTT CAT GTG	AF458080	7881-7863
IS903-5'-F	CTA CGG CAC CAC CAA TGA TA	AJ972954	2360-2379
IS903-5'-R	CAT CAT CCA GCC AGA AAG TT	AJ972954	2680-2661
IS26tnpA-3'F	AGC GGT AAA TCG TGG AGT GA	AM003906	540-559
IS26-2F	CCG GCC TTT GAA TGG GTT CAT	AM003906	667-687
IS26-2R	ATG AAC CCA TTC AAA GGC CGG	AM003906	687-667
Orf477-F	ACT TCA AAA ATT ATG CCA CC	AM003906	2531-2550
Orf477-R	GG TGG CAT AAT TTT TGA AGT	AM003906	2550-2531
mucA lower-R	GGC ATC AGG CAG GGG TAA GG	AM003906	3312-3293
PemK-up	AAC GAG AAT GGC TGG ATG C	AF550415	968-986

DNA 염기서열 조사 및 정렬

PCR된 DNA를 ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing법(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, DNA 유사성은 Blast 프로그램(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)을 이용하여 분석하였다. DNA 염기서열들의 정렬은 Clustal Omega 프로그램(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)을 이용하여 정렬한 후 유전자들을 분석하였다. CTX-M군의 분류는 Naseer 등 (6)의 기준을 적용하여 분류하였다.

RESULTS

*bla*_{CTX-M} 보유와 항균제감수성과의 관계

*bla*_{CTX-M} 보유에 따른 항균제감수성 양상의 차이를 조사하기 위해 *bla*_{CTX-M} 보유균과 비 보유균의 17종 항균제에 대한 MIC 범위와 MIC₅₀ 및 MIC₉₀, 그리고 감수성율과 내성율을 각 항균제 별로 비교하였다(Table 2). Imipenem에는 실험한 모든 균이 감수성이었으며, *bla*_{CTX-M} 보유균이 비 보유균에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 내성율과 낮은 감수성율을 나타내었다. MIC범위에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았으나 MIC₉₀과 MIC₅₀에서는 현저하게 큰 차이를 보였다. β -lactam계 항균제 내성을 조사한 결과 *bla*_{CTX-M} 보유균이 비 보유균에 비해 cefotaxime 내성율이 10배 높았고($p < 0.001$), MIC₉₀이 170배 높았으며, ceftazidime 내성율은 6배 높았고($p < 0.001$), MIC₉₀은 8배 높았으며, aztreonam 내성율은 18.5배 높았고($p < 0.001$), MIC₉₀은 128배 높았다. quinolone계 항균제 내성을 조사한 결과 *bla*_{CTX-M} 보유균이 비 보유균에 비해 ciprofloxacin 내성율이 2.7배 높았고($p < 0.001$), nalidixic acid 내성율은 1.9배 높았다($p < 0.001$). aminoglycoside계 항균제 내성을 조사한 결과 *bla*_{CTX-M} 보유균이 비 보유균에 비해 tobramycin 내성율이 7배 높았고($p < 0.001$), MIC₉₀은 16배 높았으며, kanamycin 내성율은 6.3배 높았고($p < 0.001$), MIC₉₀은 16배 높았으며, gentamicin 내성율은 2.7배 높았고($p < 0.001$), MIC₅₀은 2배 높았다. Amikacin에 내성이거나 중등도 감수성이인 *bla*_{CTX-M} 보유균은 19.5%였고 MIC₉₀은 *bla*_{CTX-M} 비 보유균에 비해 8배 높았으며($p = 0.001$), *bla*_{CTX-M} 비 보유균은 모두가 amikacin에 감수성을 나타냈다($p < 0.001$).

*bla*_{CTX-M-14} 보유균과 *bla*_{CTX-M-27} 보유균의 항균제감수성 차이

Table 3은 CTX-M 9군에 속하는 *bla*_{CTX-M-14} 보유균과 *bla*_{CTX-M-27} 보유균의 항균제감수성을 비교한 표로서 ceftazidime, streptomycin 및 gentamicin에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. *bla*_{CTX-M-27} 보유균이 *bla*_{CTX-M-14} 보유균에 비해 ceftazidime 내성율이 5.4배 높았고($p = 0.048$), MIC₉₀이 4배 높았으며, streptomycin 내성율이 2.3배 높았고($p = 0.046$), MIC₅₀이 16배 높았다. Gentamicin에는 *bla*_{CTX-M-14} 보유균의 감수성율이 *bla*_{CTX-M-27} 보유균에 비해 2.3배 낮았고($p = 0.046$), 내성율은 50%, MIC₉₀은 512배로 매우 높았다. *bla*_{CTX-M-27} 보유균은 gentamicin에 내성이인 균이 없었다.

CTX-M 1군과 CTX-M 9군의 항균제감수성 차이

CTX-M 1군과 CTX-M 9군의 항균제감수성을 비교한 결과 ceftazidime, aztreonam, amikacin 및 kanamycin에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(Table 4). CTX-M 1군이 CTX-M 9군에 비해 ceftazidime 내성율이 2.6배 높았고($p = 0.049$), MIC₉₀이 4배 높았으며, aztreonam 내성율이 2.2배 높았고($p = 0.030$), MIC₉₀이 4배 높았으며, amikacin 내성율이 6.5배 높았고($p = 0.070$) 감수성율이 1.6배 낮았고($p = 0.013$), MIC₉₀이 64배 높았으며, kanamycin 내성율이 8.9배 높았고($p < 0.001$), 감수성율이 3.6배 낮았고($p = 0.004$), MIC₉₀이 16배 높았다.

Table 2. Antibiotic susceptibility of CTX-M-producing and CTX-M-non-producing *Escherichia coli* isolated in Korea

Antibiotic	CTX-M-producing isolates (n=41)						CTX-M-non-producing isolates (n=80)						p value		
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	S	I	R
cefotaxime	512	>512	32->512	0 (0)	0 (0)	41 (100)	0.064	3	0.023-32	60 (75.0)	12 (15.0)	8 (10.0)	<0.001	0.008 ^a	<0.001
cefotaxime-clavulanate	2	4	0.25->256	10 (24.4)	30 (73.2)	1 (2.4)	0.064	3	0.023-256	65 (81.3)	7 (8.7)	8 (10.0)	<0.001	<0.001	0.270 ^a
ceftazidime	2	64	0.064->512	23 (56.1)	3 (7.3)	15 (36.6)	1	8	0.016-64	71 (88.8)	4 (5.0)	5 (6.2)	<0.001	0.688 ^a	<0.001
ceftazidime-clavulanate	0.5	1	0.125->512	38 (92.7)	2 (4.9)	1 (2.4)	0.5	4	0.023-32	72 (90.0)	4 (5.0)	4 (5.0)	0.748 ^a	0.661 ^a	1.000 ^a
imipenem	0.5	0.5	0.125-2	39 (95.1)	2 (4.9)	0 (0)	0.5	1	0.023-2	74 (92.5)	6 (7.5)	0 (0)	0.715 ^a	0.715 ^a	<0.001
aztreonam	8	256	0.064->256	13 (31.7)	9 (22.0)	19 (46.3)	0.5	2	0.064-16	75 (93.8)	3 (3.7)	2 (2.5)	<0.001	0.003 ^a	<0.001
ampicillin	>512	>512	1->512	2 (4.9)	0 (0)	39 (95.1)	256	>512	0.125->512	36 (45.0)	2 (2.5)	42 (52.5)	<0.001	0.548 ^a	<0.001
nalidixic acid	>256	>256	4->256	4 (9.8)	0 (0)	37 (90.2)	16	>256	4->256	39 (48.8)	2 (2.5)	39 (48.8)	<0.001	0.548 ^a	<0.001
ciprofloxacin	>64	>64	0.008->64	9 (22.0)	0 (0)	32 (78.0)	0.004	>64	0.004->64	54 (67.5)	3 (3.7)	23 (28.8)	<0.001	0.550 ^a	<0.001
chloramphenicol	2	>512	0.25->512	34 (82.9)	2 (4.9)	5 (12.2)	2	4	0.5->512	76 (93.1)	1 (1.1)	3 (5.8)	0.043 ^a	0.265 ^a	0.119 ^a
tetracycline	8	>512	1->512	20 (48.8)	3 (7.3)	18 (43.9)	8	>512	0.5->512	37 (46.3)	26 (32.5)	17 (21.2)	0.792	0.002	0.009
streptomycin	32	>256	4->256	11 (26.8)	8 (19.5)	22 (53.7)	8	128	1->256	48 (60.0)	15 (18.8)	17 (21.2)	0.001	0.919	<0.001
amikacin	8	64	0.25->512	33 (80.5)	2 (4.9)	6 (14.6)	4	8	0.25-8	80 (100)	0 (0)	0 (0)	<0.001 ^a	0.113	0.001 ^a
tobramycin	1	128	0.064->512	22 (53.7)	1 (2.4)	18 (43.9)	0.5	8	0.125->512	67 (83.8)	8 (10.0)	5 (6.2)	<0.001	0.270 ^a	<0.001
kanamycin	32	>512	2->512	17 (41.5)	8 (19.5)	16 (39.0)	16	32	4->512	61 (76.3)	14 (17.5)	5 (6.2)	<0.001	0.786	<0.001
gentamicin	1	>512	0.125->512	21 (51.2)	2 (4.9)	18 (43.9)	0.5	>512	0.064->512	66 (82.6)	1 (1.1)	13 (16.3)	<0.001	0.265 ^a	0.001
sulfamethoxazol-trimethoprim	>320	>320	20->320	18 (43.9)	1 (2.4)	22 (53.7)	20	>320	10->320	56 (70.0)	1 (1.1)	23 (28.8)	0.005	1.000 ^a	0.007

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. The p value was computed using the chi-square test; ^a, Fisher's exact test.

Table 3. Antibiotic susceptibility of CTX-M-14-producing and CTX-M-27-producing *Escherichia coli* isolated in Korea

Antibiotic	CTX-M-14-producing isolates (n=18)						CTX-M-27-producing isolates (n=5)						p value ^a
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	
cefotaxime	256	>512	63- >512	0 (0)	0 (0)	18 (100)	>512	>512	>512	0 (0)	0 (0)	5 (100)	
cefotaxime-clavulanate	2	4	05- >256	5 (27.8)	13 (72.2)	0 (0)	2	4	2-4	1 (20)	4 (80.0)	0 (0)	
ceftazidime	2	16	0.25- 128	14 (77.8)	2 (11.1)	2 (11.1)	32	64	0.5- 64	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
ceftazidime-clavulanate	1	8	0.125- 64	16 (88.9)	1 (5.6)	1 (5.6)	0.5	1	0.25-1	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
imipenem	0.5	2	0.125-2	16 (88.9)	2 (11.1)	0 (0)	0.25	0.5	0.125- 0.5	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
aztreonam	8	128	0.125- >256	8 (44.4)	6 (33.3)	4 (22.2)	32	64	0.25- 64	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
ampicillin	>512	>512	1->512	2 (11.1)	0 (0)	16 (88.9)	>512	>512	>512	0 (0)	0 (0)	5 (100)	
nalidixic acid	>256	>256	4->256	3 (16.7)	0 (0)	15 (83.3)	>256	>256	128- >256	0 (0)	0 (0)	5 (100)	
ciprofloxacin	16	>64	0.008- >64	6 (33.3)	0 (0)	12 (66.7)	>64	>64	0.25- >64	2 (40.0)	0 (0)	3 (60.0)	
chloramphenicol	2	>512	0.25- >512	16 (88.9)	0 (0)	2 (11.1)	1	2	0.5-2	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
tetracycline	4	>512	1->512	11 (61.1)	2 (11.1)	5 (27.8)	>512	>512	4- >512	2 (40.0)	0 (0)	3 (60.0)	
streptomycin	16	>256	4->256	5 (27.8)	5 (27.8)	8 (44.4)	>256	>256	32->256	0 (0)	0 (0)	5 (100)	
amikacin	4	8	0.25- >512	17 (94.4)	0 (0)	1 (5.6)	8	8	2-8	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
tobramycin	2	32	0.064- 32	10 (55.6)	0 (0)	8 (44.4)	0.5	1	0.25-1	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
kanamycin	32	64	2->512	9 (50.0)	7 (38.9)	2 (11.1)	16	16	8-16	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
gentamicin	128	>512	0.125->512	8 (44.4)	1 (5.6)	9 (50.0)	0.5	1	0.25-1	5 (100)	0 (0)	0 (0)	
sulfamethoxazol- trimethoprim	>320	>320	10- >320	9 (50.0)	0 (0)	9 (50.0)	>320	>320	40- >320	1 (20.0)	0 (0)	4 (80.0)	

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. ^a The p value was computed using the Fisher's exact test.

Table 4. Antibiotic susceptibility of CTX-M group 1-producing and CTX-M group 9-producing *Escherichia coli* isolated in Korea

Antibiotic	CTX-M group 1-producing isolates (n=18)						CTX-M group 9-producing isolates (n=23)						p value		
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	S	I	R
cefotaxime	>512	>512	32->512	0 (0)	0 (0)	18 (100)	256	>512	64->512	0 (0)	0 (0)	23 (100)	.	.	.
cefotaxime-clavulanate	2	4	0.25-256	4 (22.2)	13 (72.2)	1 (5.5)	2	2	0.5-256	6 (26.1)	17 (73.9)	0 (0)	1.000 ^a	1.000 ^a	0.44 ^a
ceftazidime	32	128	0.064->512	8 (44.4)	0 (0)	10 (55.6)	2	32	0.25-128	15 (65.2)	3 (13.0)	5 (21.7)	0.219	0.243 ^a	0.049
ceftazidime-clavulanate	0.5	1	0.25-1	17 (94.4)	1 (5.5)	0 (0)	0.5	1	0.125-64	21 (91.3)	1 (4.3)	1 (4.3)	1.000 ^a	1.000 ^a	1.000 ^a
imipenem	0.5	0.5	0.125-0.5	18 (100)	0 (0)	0 (0)	0.25	0.5	0.125-2	21 (91.3)	2 (8.7)	0 (0)	0.495 ^a	0.495 ^a	.
aztreonam	64	>256	0.064->256	4 (22.2)	2 (11.1)	12 (66.7)	8	64	0.125-256	9 (39.1)	7 (30.4)	7 (30.4)	0.321	0.254 ^a	0.030
ampicillin	>512	>512	>512	0 (0)	0 (0)	18 (100)	>512	>512	1->512	2 (8.7)	0 (0)	21 (91.3)	0.495 ^a	.	0.495 ^a
nalidixic acid	>256	>256	4->256	1 (5.5)	0 (0)	17 (94.4)	>256	>256	4->256	3 (13.0)	0 (0)	20 (87.0)	0.618 ^a	.	0.618 ^a
ciprofloxacin	>64	>64	0.012->64	3 (16.7)	0 (0)	15 (83.3)	12	>64	0.008->64	8 (34.8)	0 (0)	15 (65.2)	0.291 ^a	.	0.291 ^a
chloramphenicol	2	>512	1->512	13 (72.2)	2 (11.1)	3 (16.7)	1	4	0.25->512	21 (91.3)	0 (0)	2 (8.7)	0.209 ^a	0.187 ^a	0.638 ^a
tetracycline	>512	>512	1->512	7 (38.9)	1 (5.5)	10 (55.5)	4	>512	1->512	13 (56.5)	2 (8.7)	8 (34.8)	0.262	1.000 ^a	0.183
streptomycin	16	>256	4->256	6 (33.3)	3 (16.7)	9 (50.0)	32	>256	4->256	5 (21.7)	5 (21.7)	13 (56.5)	0.489 ^a	1.000 ^a	0.678
amikacin	8	>512	0.25->512	11 (61.1)	2 (11.1)	5 (27.8)	4	8	0.25->512	22 (95.7)	0 (0)	1 (4.3)	0.013 ^a	0.187 ^a	0.070 ^a
tobramycin	16	>512	0.064->512	7 (38.9)	1 (5.5)	10 (55.5)	0.5	32	0.064-32	15 (65.2)	0 (0)	8 (34.8)	0.093	0.439 ^a	0.183
kanamycin	128	>512	8->512	3 (16.7)	1 (5.5)	14 (77.8)	16	32	2->512	14 (60.9)	7 (30.4)	2 (8.7)	0.004 ^a	0.055 ^a	<0.001
gentamicin	8	>512	0.125->512	8 (44.4)	1 (5.5)	9 (50.0)	0.5	>512	0.125->512	13 (56.5)	1 (4.3)	9 (39.1)	0.443	1.000 ^a	0.486
sulfamethoxazol-trimethoprim	60	>320	10->320	8 (44.4)	1 (5.5)	9 (50.0)	>320	>320	10->320	10 (43.5)	0 (0)	13 (56.5)	0.951	0.439 ^a	0.678

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. The p value was computed using the chi-square test. ^a, Fisher's exact test.

*bla*_{CTX-M} 보유와 다제내성과의 관계

*bla*_{CTX-M} 보유균들은 41주 모두가 다제내성균이었으며, 실험에 사용한 17종 항균제중에서 최소 3종 이상의 항균제에 내성을 나타내었고, 최대 15종의 항균제에 내성을 나타내었다(Fig. 1). *bla*_{CTX-M} 보유균들은 평균 7.7개의 항균제에 내성을 가지고 있었으며 비 내성균은 한 주도 없었다. *bla*_{CTX-M} 비 보유균들은 평균 2.7개의 항균제에 내성을 나타내었으며, 3종 이상의 항균제에 내성인 균은 38주(47.5%)였다. *bla*_{CTX-M} 비 보유균 중에서 최대 10종 항균제에 동시에 내성인 것이 2주 있었고, 17종 항균제 모두에 내성이 없는 비 내성균이 26주(32.5%)였다. *bla*_{CTX-M} 보유에 따른 다제내성 빈도와 내성 항균제 수를 비교한 결과 *bla*_{CTX-M} 보유균이 비 보유균에 비해 다제내성 빈도는 2.1배 이상 높았고, 내성 항균제 수는 2.8배 이상 많았다.

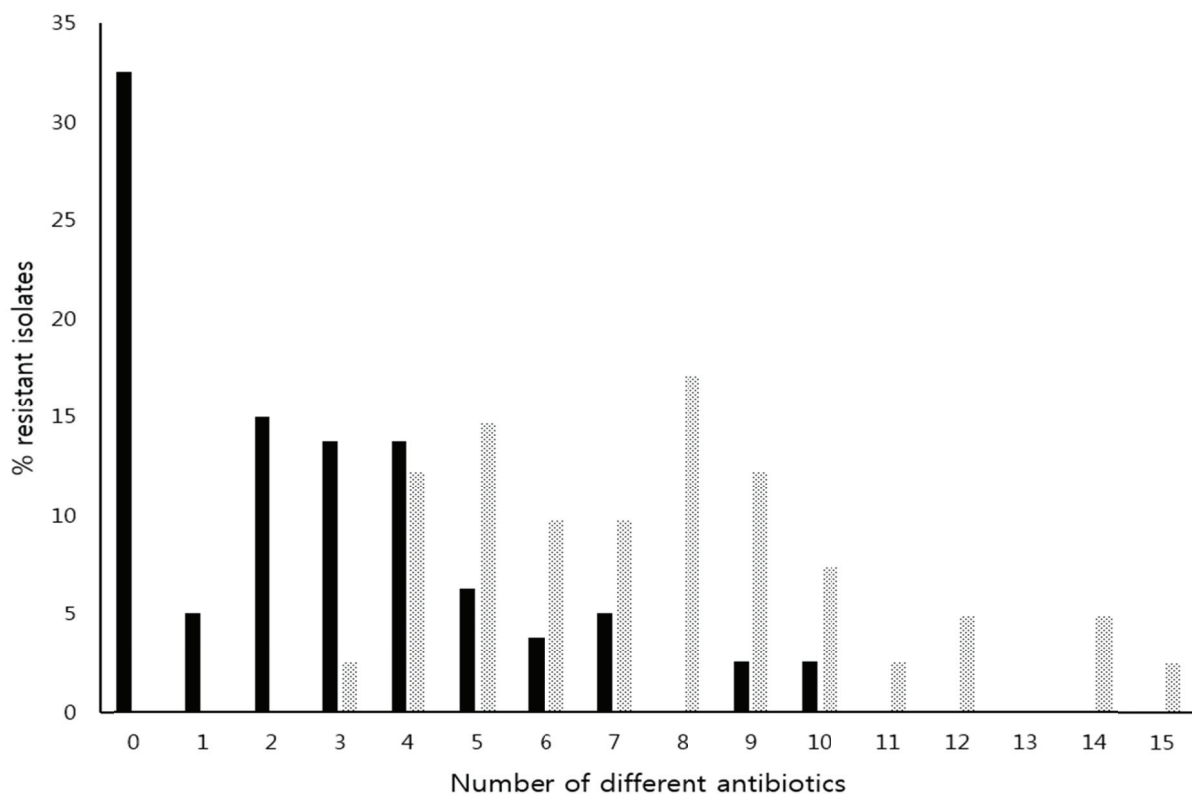


Figure 1. Resistance to increasing numbers of different antibiotics in CTX-M-producing (▨) and CTX-M-non-producing (■) isolates.

CTX-M 유전자형에 따른 분석

다약제 내성 대장균들의 β -lactam계 항균제에 대한 내성기전을 분석하기 위해 CTX-M을 포함한 다양한 β -lactamase 유전자 유무를 PCR 및 DNA 염기서열분석을 이용하여 조사한 결과, 대표적인 ESBL인 CTX-M 생산균들이 41주(33.9%)였고, ampicillin 등의 일반적인 penicillin에 내성을 나타내는 기본형 β -lactamase 유전자인 *bla*_{TEM-1} 보유균이 57주(47.1%)였으며, CTX-M 생산균 중에서 *bla*_{TEM-1}을 함께 보유하고 있는 균은 20주(48.8%)였다. CTX-M균 중에서는 23주(19.0%)의 균이 CTX-M 9군 [CTX-M14형 18주(14.9%), CTX-M27형 5주(4.1%)]이었고, 18주(14.9%)의 균이 CTX-M 1군 [CTX-M15형 10주(8.3%), CTX-M3형 5주(4.1%), CTX-M55형 3주(2.5%)]이었다. 기타 ESBL로서는 *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-26} 및 *bla*_{DHA-1}이 각각 한 주씩 검출되었다.

CTX-M 1군 CTX-M3/15/55 유전자들의 유전적 기반

CTX-M ESBL의 전파 방식과 발현 기전 규명에 필요한 *bla*_{CTX-M} 상위 및 하위 DNA서열의 유전적 기반을 PCR 및 DNA 염기서열 분석을 이용하여 조사하였다(Table 5와 Table 6). CTX-M 1군에 속하는 대장균은 18주 모두에서 CTX-M3/15/55 유전자들의 상위

Table 5. Genotypic characterization of *bla*_{CTX-M} surrounding DNAs of CTX-M group 1-producing *Escherichia coli* isolated in Korea

Strain	CTX-M identified by sequencing	Upstream <i>bla</i> _{CTX-M}										Downstream <i>bla</i> _{CTX-M}						
		<i>tnpA</i>	<i>pemK</i>	TD	IRL	<i>tnpA</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	Promoter	IRR	Space ^a	Size (bp)	<i>bla</i> _{CTX-M}	Space ^b	<i>orf477</i>	IRR-like	TD	<i>mucA</i>
	IS26	start	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	(bp)	(bp)	(bp)	<i>ISEcp1B</i>				
JE120	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	127	876	46	+	+	+	+	+
JE125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	127	876	46	+	+	+	+	-
JE64	+	-	-	-	-	T	+	+	+	+	127	876	46	+	+	+	+	-
JE62	-	-	-	-	-	T	+	+	+	+	127	876	46	+	+	+	+	-
JE36	+	-	-	-	-	T	+	+	+	+	48	876	46	+	+	+	+	-
JE56	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	48	876	46	+	+	+	+	-
JE77	-	-	-	-	-	T	+	+	+	+	48	876	46	+	+	+	+	-
JE28	-	-	-	-	-	T	+	+	+	+	48	876	46	+	+	+	+	-
JE11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	45	876	46	+	+	+	+	-

TD, Target duplication of *ISEcp1B*; IRL, Inverted repeat left; IRR, Inverted repeat right; T, Truncated in upstream sequence of the gene; a, Space between IRR and start codon of *bla*_{CTX-M} gene; b, Space between stop codons of *bla*_{CTX-M} gene and *orf477*.

Table 6. Genotypic characterization of *bla*_{CTX-M} surrounding DNAs of CTX-M group 9-producing *Escherichia coli* isolated in Korea

Strain	CTX-M identified by sequencing	Upstream <i>bla</i> _{CTX-M}										Downstream <i>bla</i> _{CTX-M}						
		IRR	<i>tnpA</i>	TD	IRL	<i>ISEcp1B</i>	<i>ISEcp1B</i>	Promoter	IRR	Space ^a	Size (bp)	Space ^b	IS _{903D}	<i>iron</i>	IRR-like	TD	<i>tnpA</i>	
		IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆	IS ₂₆
JE45	CTX-M-14	-	-	+	+	+	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	-
JE121	CTX-M-14	-	-	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	-
JE123	CTX-M-14	+	+	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	-
JE124	CTX-M-14	+	+	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	-
JE22	CTX-M-27	+	+	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	+
JE78	CTX-M-27	+	+	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	+	+	+	+	T ^d
JE80	CTX-M-27	+	+	-	-	T ^c	+	+	+	+	42	876	79	T ^d	-	-	-	-

TD, Target duplication of *ISEcp1B*; IRL, Inverted repeat left; IRR, Inverted repeat right; a, Space between IRR and start codon of *bla*_{CTX-M} gene; b, Space between stop codon of *bla*_{CTX-M} gene and start codon of *IS903D tnpA*; c, Truncated in upstream sequence of the gene; d, Truncated in downstream sequence of the gene.

부에 이동성 DNA *ISEcp1B*가 완전한 상태 혹은 일부 결손된 상태로 발견되었으며, *ISEcp1B*의 우측 역 반복 서열(IRR)과 *bla*_{CTX-M-3}의 시작 codon 사이는 127 염기 쌍의 DNA서열이 존재하였고(Table 5), *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M-15}의 시작 codon 사이는 48 염기쌍, 그리고 *bla*_{CTX-M-55}의 시작 codon 사이는 45 염기 쌍의 DNA서열이 존재하였다(Table 5). *bla*_{CTX-M-3} 보유 주 JE120과 JE125에서는 *ISEcp1B*의 상위 부에 18 염기쌍으로 이루어진 *ISEcp1B* 좌측 역 반복 서열(IRL)과 5 염기쌍(TGCAG)으로 이루어진 target 복제 서열(TD)이 관찰되었으며, 더 상위 부에 *pemKI* 중독 계가 존재하였다(Fig. 2와 Fig. 3). CTX-M3형 대장균 중 2주(40.0%)와 CTX-M15형 대장균 중 4주(40.0%)에서 *ISEcp1B*의 상위 부에 이동성 DNA *IS26*에 발견되었으며, *IS26*의 전사 방향은 CTX-M3형에서는 순방향 서열을 갖고 있었고, CTX-M15형에서는 상보적 역방향 서열을 갖고 있었다(Fig. 2와 Fig. 4). 모든 CTX-M3/15/55형 대장균의 *bla*_{CTX-M}의 하위 부에는 *orf477*이 완전한 상태 혹은 일부 결손된 상태로 존재하였으며, *orf477*은 모두 상보적 역방향 서열을 갖고 있었다(Fig. 2와 Fig. 4). *bla*_{CTX-M-3/15/55}의 정지 codon과 *orf477*의 정지 codon 사이는 46 염기쌍의 DNA서열이 존재하였으며(Fig. 2와 Fig. 4), *bla*_{CTX-M-3} 보유 주 JE120에서는 *orf477*의 하위 부에 *mucA*유전자가 관찰되었다(Fig. 2).

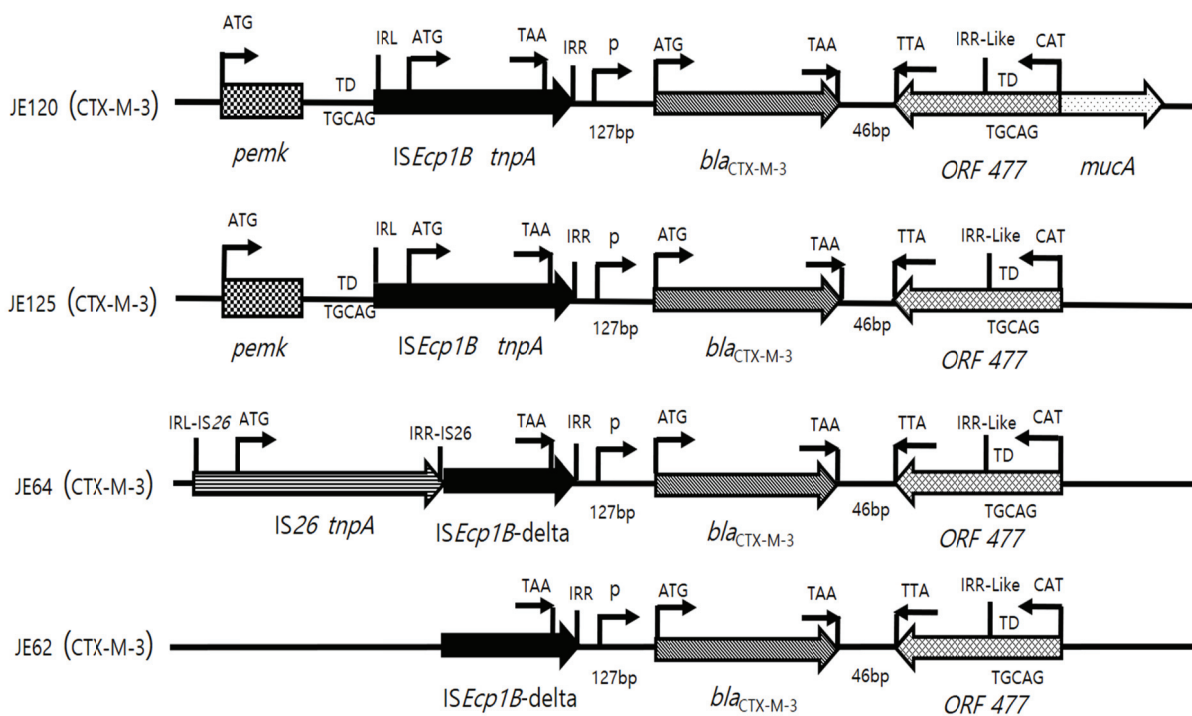


Figure 2. Schematic representation of the surrounding DNA sequences of the *bla*_{CTX-M-3} genes of four multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. Row1, JE120: 2, JE125: 3, JE64: 4, JE62. TD, Target duplication. IRL and IRR, left and right inverted repeat sequences for *ISEcp1B* or *IS26*. *tnpA*, transposase gene. ATG, start codon. TAA, stop codon. P, promoter.

```

474 TGGCGTATTTA TGCAGCCTAGATTCTACGTCAGTACTTCAAAAAGCATAATCAAAGCCTT 533
      TD      IRL ISEcp1B

534 GATAAATATGCATTCCTTCGAAATTCAGCTTTCACCCATTGGGTGAAAGAAAAGTGCTCA 593

594 AAAATATGTTAAATTATCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAATAATAGTAAGAAAA 653

      → tnpA ISEcp1B
654 GTAGTAAAAAGGGGTTCTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAG----//----
      M I N K I D F K A K
      stop ISEcp1B
1914 AGTGTATGAAAAATGTCTGGTATAATAA--//--AACACACGTGGAATTTAGGTTTCATTC 2153
      Y E K C L V *      IRR ISEcp1B

2154 TGGCGACGTCCGTATTTGCCTTTCGGAAGCATAAAATCGGACGCGTGTGGCTCGCTTCA 2213
      -35 signal

2214 GGTA AAAATATTGACTATTCATGTTGTTGTTATTTCTGCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCA 2273
      -10 signal      stop blaCTX-M-3      RBS
      blaCTX-M-3

2274 TGGTTAAAAAATCACTG---//---ACGGTTTGTAATAGCGGAAACGGAATG----//-----
      M V K K S L      D G L *
      stop orf477 complement
3184 TGTTTATCGCCTTAGACGGCAAA---//--GGGCGCACGTAGGTCCCGAGG TGCAGCATGGTT 3551
      * V A F      IRR-like ISEcp1B      TD

```

Figure 3. Nucleotide sequence of DNA region of CTX-M-3-producing *Escherichia coli* JE120. The deduced amino acid sequence is indicated in single-letter code below the nucleotide sequence. Horizontal arrows, start codons. Asterisks, stop codons. TD, target duplication. IRL and IRR, left and right inverted repeat sequences, respectively. RBS, ribosomal binding site. The -35 and -10 signals, the promoter sequences of the *bla*_{CTX-M-3}. *tnpA*, transposase gene.

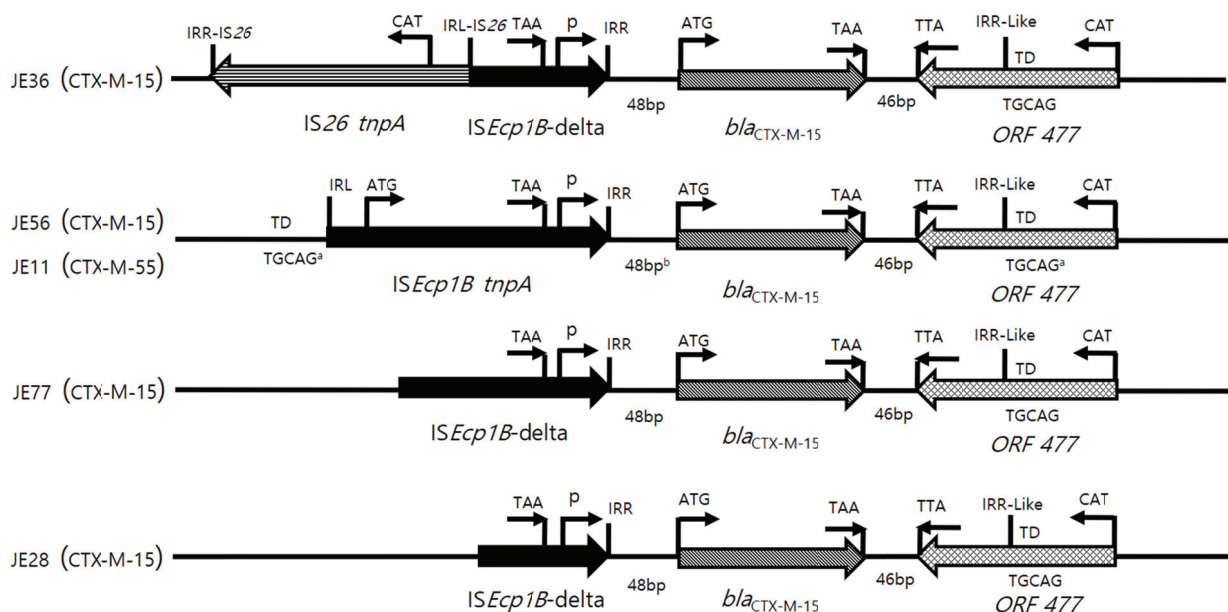


Figure 4. Schematic representation of the surrounding DNA sequences of the *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-55} genes of five multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. Row1, JE36: 2, JE56 and JE11: 3, JE77: 4, JE28. TD, Target duplication. IRL and IRR, left and right inverted repeat sequences for IS26 or *ISEcp1B*. *tnpA*, transposase gene. ATG, start codon. TAA, stop codon. P, promoter. a. TTCCT in JE11 (CTX-M-55). b. 45 bp in JE11 (CTX-M-55).

CTX-M 9군 CTX-M14/27 유전자들의 유전적 기반

CTX-M 9군에 속하는 CTX-M14/27형 대장균 23주 중 20주(87.0%)에서 CTX-M14/27 유전자들의 상위 부에 *ISEcp1B*가 완전한 상태 혹은 일부 결손된 상태로 발견되었고, *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M-14/27}의 시작 codon 사이는 42 염기쌍의 DNA서열이 존재하였다(Table 6). CTX-M14형 대장균 중 5주(27.8%)와 CTX-M27형 대장균 중 5주(100.0%)에서 *ISEcp1B*의 상위 부에 이동성 DNA IS26이 발견되었으며, IS26의 전사 방향은 모두다 상보적 역방향 서열을 갖고 있었다(Fig. 5와 Fig. 6). 모든 CTX-M14/27형 대장균의 CTX-M14/27 유전자의 하위 부에서 이동성 DNA IS903D가 완전한 상태 혹은 일부 결손된 상태로 발견되었다(Fig. 5와 Fig. 6). *bla*_{CTX-M-14/27}의 정지 codon과 IS903D의 IRL 사이는 79 염기 쌍의 DNA서열이 존재하였다(Table 6). CTX-M27형 대장균 JE22와 JE78에서는 IS903D의 하위 부에 IS26이 관찰되었으며 전사 방향은 순방향이었다(Fig. 6).

CTX-M promoter영역

이동성 DNA *ISEcp1B*가 발견된 CTX-M 생산 대장균들을 대상으로 *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M} 시작 codon 사이에 promoter영역이 존재하는지 여부를 DNA 염기서열분석을 통하여 조사한 결과 38주 모두에서 *bla*_{CTX-M}의 발현에 필요한 -35 서열(TTGACA, TTGAAA 혹은 TTGTGG)과 -10 서열(TATAAT, TACAAT 혹은 TAAAAT) 및 AGGAG 혹은 AGG 등의 리보솜 결합 서열(RBS)이 잘 보존되어 있었다(Table 5와 Fig. 3).

CTX-M 유전자 하위 부의 IRR-유사 서열과 TD서열 분석

CTX-M 1군 대장균들의 *orf477* 뒤쪽에 *ISEcp1B*의 IRR과 유사한 18 염기쌍의 DNA서열(IRR-유사 서열)이 존재하였다(Table 5와 Fig. 3). IRR은 염기서열이 5'-ACA CAC GTG GAA TTT AGG-3'이었으며, IRR-유사 서열은 염기서열이 5'-GCG CAC GTA GGT CCC AGG-3'으로서 18 염기 쌍 중에서 10 염기 쌍이 서로 동일하였다(Fig. 3). IRR-유사 서열의 하위 부에는 5 염기 쌍(TGCGAG)으로 이루어진 TD가 존재하였다(Table 5와 Fig. 3). CTX-M 9군 대장균 중 JE78은 IS903D의 하위 부에 철분 유전자(*iron*)를 가지고 있었고, 그 뒤쪽에 *ISEcp1B*의 IRR과 유사한 18 염기쌍의 IRR-유사 서열이 존재하였다(Fig. 6). IRR-유사 서열의 하위 부에는 5 염기 쌍(TAACA)으로 이루어진 TD가 존재하였다(Fig. 6). 이와 같이 *ISEcp1B*의 IRR과 유사한 DNA서열들이 CTX-M유전자들의 하위 부에서 관찰되었고 TD들이 *ISEcp1B*의 IRL서열과 IRR-유사 서열 옆에서 각각 관찰되었다(Table 5와 Table 6).

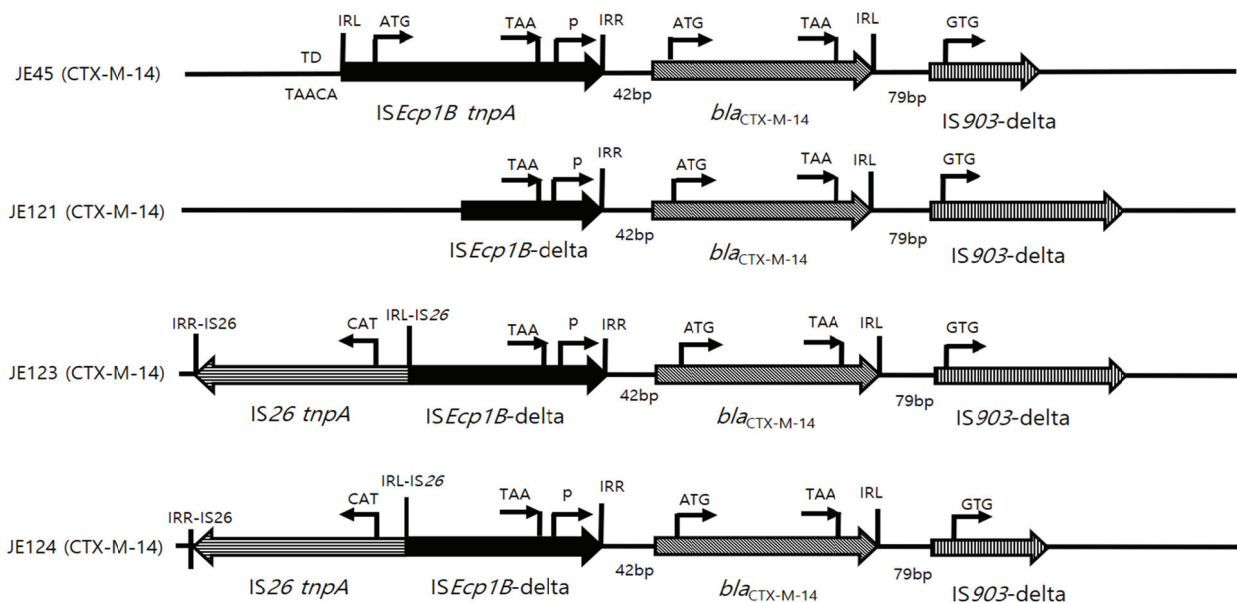


Figure 5. Schematic representation of the surrounding DNA sequences of the *bla*_{CTX-M-14} genes of four multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. Row1, JE45: 2, JE121: 3, JE123: 4, JE124. TD, Target duplication. IRL and IRR, left and right inverted repeat sequences for *ISEcp1B* or IS26. *tnpA*, transposase gene. ATG and GTG, start codon. TAA, stop codon. P, promoter.

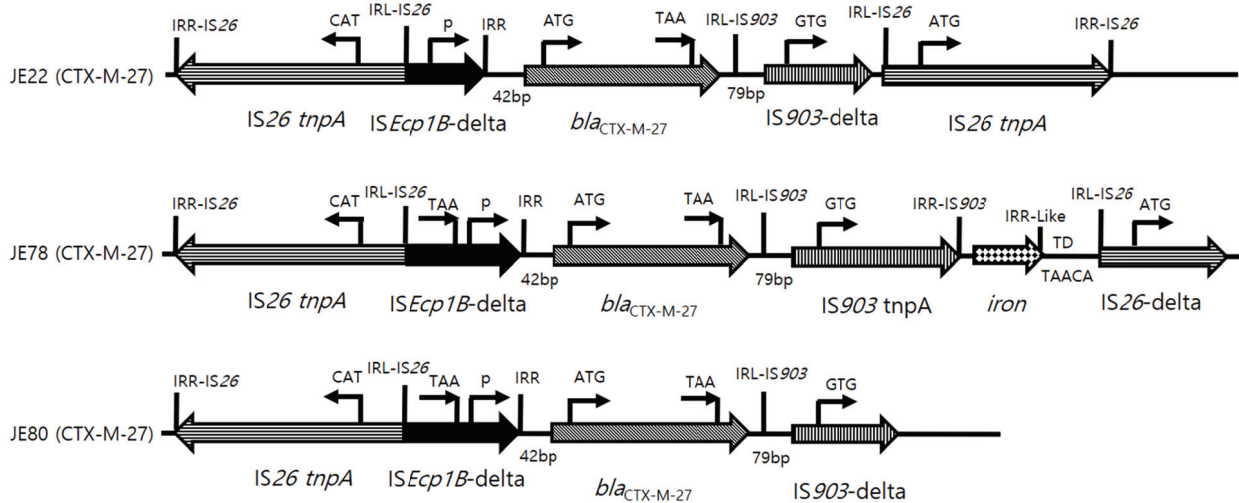


Figure 6. Schematic representation of the surrounding DNA sequences of the *bla*_{CTX-M-27} genes of three multidrug resistant *E. coli* isolates. Row1, JE22: 2, JE78: 3, JE80. TD, Target duplication. IRL and IRR, left and right inverted repeat sequences for *IS**Ecp1B* or *IS26*. *tnpA*, transposase gene. *iron*, iron transport gene. ATG and GTG, start codon. TAA, stop codon. P, promoter.

DISCUSSION

항균제 내성은 현재 인류가 직면하고 있는 주요 보건 위협 중의 하나이다 (25). 특히 CTX-M형 ESBL을 생산하는 대장균들은 일반적으로 사용되는 다양한 항균제에 내성을 가지는 다제내성균인 경우가 많기 때문에 치료제 선택에 큰 어려움을 주고 있으며 전 세계적으로 문제가 되고 있다 (6~9). 이 연구에서 *bla*_{CTX-M} 보유균들은 41주 모두가 다제내성균이었고, 실험에 사용한 17종 항균제 중에서 평균 7.7종 이상의 항균제에 내성을 가지고 있었으며, clavulanic acid복합제와 imipenem 이외의 모든 항균제에 내성을 나타내는 고도 내성균도 있었다. *bla*_{CTX-M} 보유에 따른 다제내성 빈도와 내성 항균제 수를 비교해 보면 *bla*_{CTX-M} 보유균이 비보유균에 비해 다제내성 빈도는 2.1배 이상 높았고, 내성 항균제 수는 2.8배 이상 많았다. 또한 *bla*_{CTX-M} 비보유균의 32.5%가 17종 항균제 모두에 감수성 균인데 비하여 *bla*_{CTX-M} 보유균은 감수성 균이 한주도 없었는데, 이러한 사실은 *bla*_{CTX-M} 보유균들의 다제내성율이 유의하게 높다는 것을 보여주며 ($p < 0.01$), 선행연구들의 보고와 유사하였다 (5, 8, 19).

*bla*_{CTX-M} 보유균들은 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam 등의 β -lactam계 항균제에 대한 내성율이 *bla*_{CTX-M} 비보유균에 비해 6~18배나 높았고 ($p < 0.001$), MIC₉₀도 8~170배나 높았다 ($p < 0.001$). Imipenem에는 *bla*_{CTX-M} 보유 여부에 관계없이 실험한 모든 균이 감수성이어서 고도 내성 대장균의 치료제로 효과가 클 것으로 생각되나 자칫 남용하여 내성균이 발생하지 않도록 하기 위하여 엄격한 사용 지침이 필요할 것으로 생각된다 (25). *bla*_{CTX-M} 보유균들은 ciprofloxacin 등의 quinolone계 항균제에도 *bla*_{CTX-M} 비보유균에 비해 내성율이 2~2.7배 높았으며 ($p < 0.001$), tobramycin, kanamycin, gentamicin 및 amikacin 등의 aminoglycoside계 항균제에도 *bla*_{CTX-M} 비보유균에 비해 내성율이 2.7~7배 높았고 ($p < 0.001$), MIC₉₀도 8~16배 높았다 ($p < 0.001$). 이와 같이 대부분의 β -lactam계 항균제들과 quinolone계 및 aminoglycoside계 항균제들에 있어서 *bla*_{CTX-M} 보유와 항균제 내성을 증가와는 유의한 관계가 있었고, 선행연구들도 이와 유사한 보고를 하였으나 항균제 별로 약간의 차이를 보였다 (8, 19, 26, 27).

*bla*_{CTX-M-14} 보유균과 *bla*_{CTX-M-27} 보유균은 동일한 CTX-M 9군에 속하지만 ceftazidime, streptomycin 및 gentamicin에서 통계학적으로 유의한 항균제 감수성의 차이를 보였다. *bla*_{CTX-M-27} 보유균이 *bla*_{CTX-M-14} 보유균에 비해 ceftazidime 내성율이 5배 이상 높았고 ($p = 0.048$), MIC₉₀이 4배 높았는데, 이러한 차이는 *bla*_{CTX-M-27}과 *bla*_{CTX-M-14}의 DNA서열 차이에서 기인할 것으로 생각된다 (19, 28). *bla*_{CTX-M-27}은 *bla*_{CTX-M-14}의 240번째 codon이 D(Asp)에서 G(Gly)로 변이 되어 D240G 치환 서열을 가진 것으로서, CTX-M β -lactamase의 구조적으로 볼 때 D가 들어있는 구조보다 G가 들어있는 구조가 ceftazidime에 더 잘 결합되어 분해를 촉진하기 때문일 것으로 생각된다 (28). *bla*_{CTX-M-27} 보유균이 *bla*_{CTX-M-14} 보유균에 비해 streptomycin 내성율이 2.3배 높았고

($p=0.046$), gentamicin에는 $bla_{CTX-M-14}$ 보유균의 감수성율이 $bla_{CTX-M-27}$ 보유균에 비해 2.3배 낮게($p=0.046$) 나타나서, 동일한 CTX-M 9군에 속하지만 서로 다른 아군에 따라 다양한 항균제에 대하여 서로 다른 감수성을 나타내고 있음을 알 수 있었고 선행 연구도 이와 유사한 보고를 하였다 (19). 다양한 항균제 별로 감수성에 차이가 나타나는 원인은 추후 다양한 내성 유전자, 특히 aminoglycoside 유전자들을 채집하는 장치인 인테그론 보유 여부와의 관련성 등을 포함한 후속 연구에서 다루어져야 할 것으로 생각된다 (15).

CTX-M 1군과 CTX-M 9군의 항균제 감수성을 비교한 결과, CTX-M 1군이 CTX-M 9군에 비해 ceftazidime 내성율이 유의하게 높았으며($p=0.049$) 선행연구들의 보고와 유사하였다 (8, 19, 27). CTX-M 1군은 총 18주 중에서 bla_{CTX-M} 의 D240G 치환 서열을 가지고 있는 것이 $bla_{CTX-M-15}$ 와 $bla_{CTX-M-55}$ 등 13주(72.2%)였고, CTX-M 9군은 총 23주 중에서 D240G 치환 서열을 가지고 있는 것이 $bla_{CTX-M-27}$ 5주(21.7%)뿐이었다. 이와 같이 CTX-M 1군은 D240G 치환 서열을 가진 것이 72.2%로 빈도가 매우 높았고, CTX-M 9군은 D240G 치환 서열을 가진 것이 21.7%에 불과하였다. 그 결과 CTX-M 1군이 CTX-M 9군에 비해 ceftazidime 내성율이 유의하게 높게 나타난 것으로 생각된다 (19, 28). CTX-M 1군은 ceftazidime 이외에도 aztreonam, amikacin 및 kanamycin에서 CTX-M 9군에 비해 유의하게 높은 내성율을 보였는데, aztreonam 내성율이 2.2배 높았고($p=0.030$), amikacin 내성율이 6.5배 높았고($p=0.070$), 감수성율이 1.6배 낮았고($p=0.013$), kanamycin 내성율이 8.9배 높았고($p<0.001$), 감수성율이 3.6배 낮았다($p=0.004$). 이와 같이 CTX-M군이 서로 다른 경우 다양한 항균제에 대하여 서로 다른 감수성을 나타내고 있음을 알 수 있었으나, 각각의 항균제 별로 감수성에 차이가 나타나는 원인은 선행연구들의 보고를 찾아볼 수 없었고, 추후 후속 연구에서 다루어져야 할 것으로 생각된다.

이 연구에서 bla_{CTX-M} 보유균들의 분리 빈도가 흔하고 광범위한 일차 치료 약제에 감수성을 저하시킨다는 사실을 고려할 때, 원인균이 bla_{CTX-M} 을 보유하고 있으면 감염병 치료에 어려움을 증가시킬 우려가 있다 (8, 9). 실제로 다제내성 대장균, 특히 CTX-M 생산 대장균 감염시 항균제 선택에 어려움이 많아, 의료인들로 하여금 imipenem이나 meropenem 등의 carbapenem계 항균제를 선택할 수 밖에 없다 (2, 9). 그런데 carbapenem계 항균제의 사용빈도가 증가하게 되면 이에 대한 내성이 증가하게 되어, 녹농균이나 *Acinetobacter* 감염의 경우와 유사하게, 고도내성균에 의해 중증 감염의 치료에 어려움이 증가 되는 악순환이 CTX-M형 ESBL 생산 대장균 감염 시에도 초래될 우려가 있다 (29~31).

항균제 내성은 표현형으로는 같은 내성이라도 유전형으로는 다를 수 있으며, 유전형에 따라 내성 발현의 강도나 내성 전파 및 확산의 수준이 다르므로 항균제 감수성 검사로 확보된 내성 양상은 유전적으로도 확인해야 한다 (3, 11). 유전적 검사에는 특정 내성 유전자들을 대상으로 하는 PCR검사가 가장 유효하며 TEM, SHV 및 CTX-M β -lactamase를 검사하기 위해서는 DNA 염기서열분석이 필요하다 (3, 9, 32). 이 연구에서 다제내성 대장균들의 β -lactamase 항균제에 대한 내성 기전을 분석하기 위해 CTX-M을 포함한 다양한 β -lactamase 유전자 유무를 조사한 결과, 일반적인 penicillin에 내성을 나타내는 기본형 β -lactamase인 bla_{TEM-1} 보유균이 57주(47.1%)였고, ESBL은 45주(37.2%)였으며, ESBL 중에서는 CTX-M이 41주(91.1%)로 대부분을 차지하였는데, 그 빈도가 80.8~95.3%라는 선행연구들의 보고와 유사하였다 (8, 33, 34). CTX-M 생산 균들의 bla_{TEM-1} 보유 빈도는 48.8%(20주)로서, CTX-M 비 생산균들의 bla_{TEM-1} 보유 빈도 46.3%(37주)와 유사하였다 (2, 18). CTX-M이외의 ESBL로서는 bla_{SHV-11} , bla_{SHV-12} , bla_{SHV-26} 및 bla_{DHA-1} 이 각각 한 주씩 검출되어 분리 빈도가 bla_{CTX-M} 에 비하여 매우 낮았으며, 향후 수를 더 늘려 분석하면 더욱 다양한 종류의 유전자들이 검출될 수도 있을 것으로 생각된다 (18, 34, 35). CTX-M군 중에서는 CTX-M-14형이 18주(43.9%)로 가장 많았고, CTX-M-15형이 10주(24.4%), CTX-M-27형이 5주(12.2%), CTX-M-3형이 5주(12.2%), CTX-M-55형이 3주(7.3%)였는데, 유럽과 미국을 비롯하여 세계적으로 가장 흔한 형은 CTX-M-15형이라는 보고 (1, 2, 5, 18)와는 차이가 있었고, CTX-M-14형이 가장 흔하다는 보고 (6, 19, 34, 36)와 유사하였으나 국가나 지역별로 유행 형에 차이가 있을 것으로 생각된다 (6, 18, 19).

R 플라스미드는 접합에 의해 다양한 세균으로 전파되기 때문에 세균의 약제 내성화에 큰 문제를 일으키고 있다 (6, 11). 이 연구에서 CTX-M형 대장균들이 보유한 플라스미드 DNA는 118.6~172.2 mega dalton 사이의 대형 플라스미드들로서 그 특성이 선행 연구들의 보고 (34, 37)와 유사하였고, CTX-M 생산 균 41주 중 39주(95.1%)가 접합에 의해 피 전달균으로 내성이 전달되어, 51~80%의 전달율을 보인 선행 연구들의 보고에 비해 높았다 (34, 35, 37). 결과적으로 CTX-M형 ESBL 확산의 주 원인이 접합성 R 플라스미드를 통한 세균 간 수평적 내성유전자 전달임을 알 수 있었다 (6, 10, 11). R 플라스미드가 내성유전자들을 획득하는 기전으로서 transposon이나 IS 등의 이동성 DNA에 의한 유전자 가동이 주목받고 있다 (9, 12~14). 이 연구에서 ESBL의 주축을 이루고 있는 CTX-M 산생균들의 확산과 유전자 발현의 원인을 파악하기 위해 PCR mapping 기법과 DNA 염기서열 분석법으로 CTX-M 유전자 주변의 유전적 기반을 조사하였다. CTX-M 생산 균 41주중 38주(92.7%)에서 bla_{CTX-M} 의 상위 부에 이동성

DNA *ISEcp1B*의 존재가 확인되었으며, *ISEcp1B*의 IRL과 5염기쌍으로 이루어진 TD가 존재함을 확인하였다. *bla*_{CTX-M}의 하위 부에는 *ISEcp1B*의 IRR-유사 서열과 5염기쌍으로 이루어진 TD가 존재함을 확인하였다. 유전자의 상위 부 및 하위 부에 역반복서열과 TD가 존재한다는 사실은 이동성 DNA에 의한 유전자 전위가 일어났음을 보여주는 가장 확실한 증거이다 (13, 14). 이 연구에서 R 플라스미드가 *bla*_{CTX-M}을 획득하게 된 기전은 *ISEcp1B*의 전위로 인한 것으로 생각된다 (16~18). *ISEcp1B*의 IRR과 IRR-유사 서열은 각각 18염기쌍의 DNA서열이며 그 중에서 10 염기쌍이 서로 동일 하였는데, 선행연구들의 보고 (16, 38)와 유사하였으며, *ISEcp1B*의 전위 효소가 인식하는 DNA서열이 엄격하지 않고 허용범위를 넓게 인식하는 것으로 생각된다 (13, 16, 38).

CTX-M-14형 균 중에서 *ISEcp1B* 상위 부의 IRL과 TD가 결손된 균들에 대해 다른 이동성 DNA들이 존재하는지를 조사하였는데, 16주(39%)의 균에서 *ISEcp1B*의 상위 부에 IS26이 존재함을 확인하였으며 선행연구들이 보고한 Tn3는 발견되지 않았다 (16, 19). 이 균들은 먼저 *ISEcp1B*에 의한 전위가 일어나 R plasmid상에 *bla*_{CTX-M}이 획득되었고, 그 후 *ISEcp1B*의 상위 부에 IS26에 의한 전위가 일어나 *ISEcp1B*의 상위부가 일부 결손 되면서 IRL과 TD가 소실된 것으로 생각된다 (16~18). 그리고 *bla*_{CTX-M}의 하위부에 다른 이동성 DNA들이 존재하는지를 조사하였는데, 23주(56.1%)의 균에서 *bla*_{CTX-M}의 하위부에 이동성 DNA IS903D가 발견되었으며, 이들은 모두 다 CTX-M 9군에 속하였다 (Table 6). 이 균들은 먼저 *ISEcp1B*에 의한 전위가 일어나 *bla*_{CTX-M}이 획득된 이후, *bla*_{CTX-M}의 하위 부에 IS903D에 의한 전위가 일어난 것으로 생각된다 (16~18). 몇몇 균들은 *ISEcp1B*의 IRR-유사 서열과 TD를 관찰할 수 없는 것들도 있었는데 그 원인은 *ISEcp1B*에 의한 전위에 의해 *bla*_{CTX-M}의 유전자 이동이 이루어진 후, 이어서 하위 부에 IS903D에 의한 전위가 일어나면서 *ISEcp1B*의 IRR-유사 서열과 TD가 소실된 것으로 생각된다 (16~18). 이상과 같이 *bla*_{CTX-M}의 획득과 이동에는 *ISEcp1B*를 주축으로 하여 IS26, IS903D 등의 다양한 이동성 DNA들이 관여한 것으로 생각된다 (16~18, 38).

그리고 *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M-3}의 시작 codon 사이는 127 염기쌍의 DNA서열이 존재하였고, *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M-15}의 시작 codon 사이는 48 염기쌍의 DNA서열이 존재하였고, *bla*_{CTX-M-3/15/55}의 정지 codon과 *orf477*의 정지 codon 사이는 46 염기쌍의 DNA서열이 존재하였다. 이와는 달리 *ISEcp1B*의 IRR과 *bla*_{CTX-M-14/27}의 시작 codon 사이는 42 염기쌍의 DNA서열이 존재하였고, *bla*_{CTX-M-14/27}의 정지 codon과 IS903D의 IRL 사이는 79 염기 쌍의 DNA서열이 존재하였다. 이러한 사실은 *bla*_{CTX-M-3/15/55}와 *bla*_{CTX-M-14/27}이 *ISEcp1B*나 IS903D 등의 이동성 DNA들에 의해 전위가 될 때 무작위로 되는 것이 아니라, 선호하는 특정 DNA자리가 있어서 유전자 별로 규칙성을 가지고 전위가 일어난다는 것을 시사한다 (12, 16, 17). 선행연구들도 이러한 규칙성을 보고 (16, 17, 19)한 바가 있으나, 그 기전에 대해서는 아직도 알려진 바가 없으며 추후 이에 대한 연구가 필요하다 (13).

내성 유전자가 효율적으로 발현되기 위해서는 유전자 시작 codon 상위 부에 적절한 promoter와 RBS가 요구된다 (14). 이 연구에서 *bla*_{CTX-M}의 발현에 관여하는 promoter 영역을 조사하기 위하여 *bla*_{CTX-M}의 상위 부의 DNA염기서열을 분석한 결과, 실험한 41주중 38주(92.7%)에서 *ISEcp1B*의 하위 부와 *bla*_{CTX-M}의 시작 codon 사이에 promoter기능에 필요한 -35서열과 -10서열이 발견되어 전형적인 promoter구조를 갖추고 있었고, RBS가 잘 보존되어 있어서 이동성 DNA *ISEcp1B*가 제공하는 promoter서열이 *bla*_{CTX-M}의 발현을 촉진한 것으로 생각된다 (14, 16, 17). *ISEcp1B*가 발견되지 않은 3주의 대장균 중 JE4는 *bla*_{CTX-M-27}의 상위 부에 IS26이 바로 인접하고 있어서 *ISEcp1B* 대신 IS26의 promoter서열이 *bla*_{CTX-M-27}의 발현에 관련된 것으로 생각된다 (14, 19). promoter서열이나 RBS서열과 같은 *bla*_{CTX-M}의 발현과 관련된 분자유전학적 정보들은 antisense oligonucleotide 개발에 활용되어 *bla*_{CTX-M}의 발현을 저하시킴으로써 내성균의 항균제 감수성을 회복시킬 수 있으며, CTX-M형 대장균과 같은 고도 내성균의 새로운 치료법 개발에 응용될 수 있어서 향후 이 분야에 대한 연구가 필요하다 (39).

이상의 사실을 종합하면, CTX-M형 ESBL 내성의 확산과 발현 기전은 대장균이 보유하고 있는 접합성 R plasmid를 기반으로 하여 *ISEcp1B*, IS26, IS903D 등의 이동성 DNA들의 전위 기능과 항균제의 선택압 등이 연합적으로 작용함으로써 CTX-M형 ESBL 내성 유전자의 세균 내 이동과 발현 그리고 세균간 확산을 초래하는 것으로 생각된다 (9, 16, 17, 38). 이 연구는 CTX-M 생산균의 *bla*_{CTX-M} 유전자 주변의 유전적 기반을 분자수준으로 밝혀 CTX-M 유전자의 이동 기전과 유전자 발현의 특성을 이해하는데 기여하였으며, 향후 CTX-M 확산 방지를 포함한 ESBL 생산 균의 증가를 최소화하기 위한 대책수립에서 중요한 분자유전학적 정보로 활용될 것으로 기대된다 (6, 9, 11, 19).

REFERENCES

- 1) Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:33-41.
- 2) Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13:558-64.
- 3) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- 4) Pottinger P, Reller LB, Ryan KJ. Enterobacteriaceae. In: Ryan KJ, Ray CG, editors. *Sherris Medical Microbiology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill Education, Inc.; 2014. p.579-608.
- 5) Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1-14.
- 6) Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist* 2011;17:83-97.
- 7) Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al*. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1-12.
- 8) Kang CI, Wi YM, Lee MY, Ko KS, Chung DR, Peck KR, *et al*. Epidemiology and risk factors of community onset infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2012;50:312-7.
- 9) El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:113-22.
- 10) Skippington E, Ragan MA. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:707-35.
- 11) Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303:298-304.
- 12) Siguier P, Gournayre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:865-91.
- 13) Hickman AB, Dyda F. Mechanisms of DNA transposition. In: Craig NL, editor. *Mobile DNA III*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.531-53.
- 14) Siguier P, Gournayre E, Varani A, Ton-Hoang B, Chandler M. Everyman's guide to bacterial insertion sequences. In: Craig NL, editor. *Mobile DNA III*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.555-90.
- 15) Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation on demand. In: Craig NL, editor. *Mobile DNA III*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.139-61.
- 16) Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234:201-7.

- 17) 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.
- 18) Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:79-101.
- 19) Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, et al. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1639-49.
- 20) Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.685-713.
- 21) Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p.1253-73.
- 22) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 24th ed. Wayne: CLSI Press, 2014.
- 23) Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
- 24) Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981;145:1365-73.
- 25) Levy-Hara G, Amábile-Cuevas CF, Gould I, Hutchinson J, Abbo L, Saxynger L, et al. "Ten commandments" for the appropriate use of antibiotics by the practicing physician in an outpatient setting. *Front Microbiol* 2011;2:230.
- 26) Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4736-42.
- 27) Shin J, Kim DH, Ko KS. Comparison of CTX-M-14- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with bacteremia. *J Infect* 2011;63:39-47.
- 28) Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:29-35.
- 29) Cantón R, Morosini M. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:977-91.
- 30) Amábile-Cuevas CF. Antibiotic resistance: From Darwin to Lederberg to Keynes. *Microb Drug Resist* 2013;19:73-87.
- 31) Kuo HY, Chang KC, Kuo JW, Yueh HW, Liou ML. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:33-8.
- 32) Hegstad K, Samuelsen O, Hegstad J, Sundsfjord A. Molecular methods for detection of antibacterial resistance genes: rationale and applications. In: Amsterdam D, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 6th ed. Philadelphia: Wolters

Kluwer Health; 2015. p.408-49.

- 33) Adler A, Gniadkowski M, Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Hryniewicz W, *et al.* Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:497-505.
- 34) Ruiz del Castillo B, Vinué L, Román EJ, Guerra B, Carattoli A, Torres C, *et al.* Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum β -lactamases. *BMC Microbiol* 2013;13:84.
- 35) Kim J, Bae IK, Jeong SH, Chang CL, Lee CH, Lee K. Characterization of IncF plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-14} gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1263-8.
- 36) Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, *et al.* Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2612-20.
- 37) Mnif B, Harhour H, Jdidi J, Mahjoubi F, Genel N, Arlet G, *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol* 2013;13:147.
- 38) 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.
- 39) Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Translational inhibition of CTX-M extended-spectrum β -lactamase in clinical strains of *Escherichia coli* by synthetic antisense oligonucleotides partially restores sensitivity to cefotaxime. *Front Microbiol* 2016;7:373.