

## 임상검체에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase 유전자형 및 분자유전학적 특성

안산1대학 임상병리과

정 경 석

### Molecular Characteristics of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Kyung-Suk Chung

Department of Clinical Laboratory Science, Ansan college, Ansan 426-701, Korea

Recently, the rapid increase in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing clinical isolates has become a serious problem. In this study, the epidemiologic features and molecular characteristics of ESBL among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic susceptibility testing, genotype of the ESBL and patterns of chromosomal DNA from PFGE (pulsed field gel electrophoresis) were observed. A total of 53 ESBL-producing clinical isolates (30 of *E. coli* and 23 of *Klebsiella pneumoniae*) were collected from two university hospitals in the period of June to July in 2002 and 2003 respectively.

The antibiotic resistance frequency of those 53 strains was tested by the disk agar diffusion method with the result that all the strains were resistant to cephalothin. To other antibiotics, the resistance rates of *E. coli* (30 isolates) were in order of ceftazidime (90.0%), cefotaxime and aztreonam (respectively 83.3%). Also, the resistance rates of *K. pneumoniae* (23 isolates) were in order of aztreonam (78.3%), ceftazidime (73.9%) and cefotaxime (65.3%). Also the sensitivity of ceftazidime-clavulanic acid were 100% in *E. coli* and 95.7% in *K. pneumoniae*. And the sensitivity of cefotaxime-clavulanic acid was 96.7% in *E. coli* and 91.3% in *K. pneumoniae*. The types of the ESBL genes were determined by using polymerase chain reaction (PCR). Among the 30 isolates of ESBL-producing *E. coli*, 6 (20.0%) have SHV only, 5 (16.7%) have TEM only and, 18 (60.0%) have both of TEM and SHV. Among the 23 isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae*, 7 (30.4%) have SHV only, 2 (8.7%) have TEM only, and 14 (60.9%) have both of TEM and SHV. These results show that 52 strains, with only one exception, were confirmed as either TEM or SHV. The patterns of *Xba*I-digested chromosomal DNA of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates were analyzed by PFGE. PFGE patterns of *E. coli* and *K. pneumoniae* were multiclonal, but many strains were grouped into a few types. Therefore, it seems that there were clonal outbreaks or possible horizontal spread.

In conclusion, the TEM and SHV  $\beta$ -lactamase are most widely spread in *E. coli* and *K. pneumoniae* in Korea. As these types are usually carried by plasmids, the spread of these  $\beta$ -lactamase genes could compromise the future usefulness of third generation cephalosporins for the treatment of infections caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*.

---

**Key Words** : *E. coli*, *K. pneumoniae*, ESBL, TEM, SHV

## I. 서 론

그람음성간균 치료제로 penicillin계 항균제인 ampicillin이 소개된 이후  $\beta$ -lactam 항균제는 광범위한 치료제로 사용되어 왔다. 그러나  $\beta$ -lactam항균제의 광범위한 사용은 이들 항균제에 대해 TEM-1, TEM-2, SHV-1 등의 broad-spectrum  $\beta$ -lactamase를 생성하는 내성세균의 출현을 유도하게 되었고 이들 내성세균에 의한 감염치료를 위해 1980년대 초에 이들 효소에 안정한 제 3세대 cephalosporin과 monobactam 등이 개발되어 임상에서 널리 사용되어 왔다(Bush, 1989; Livermore, 1995). 그러나 1982년 영국에서 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase(ESBL) 생성으로 ceftazidime에 내성인 *Klebsiella oxytoca*가 분리되었고 그후 1983년 독일에서 cefotaxime 내성을 획득한 *Klebsiella pneumoniae*가 검출되는 등 전세계적으로 다양한 유형의 ESBL생성 균주가 분리되었으며 그 빈도는 계속 증가하고 있다(Knothe 등, 1983; Phillipon 등, 1989; Arlet 등, 1990; Jacoby와 Medeiros 1991; Bauernfeind 등, 1993; Bradford, 2001). 이들 ESBL 효소 중 가장 널리 알려져 있는 TEM 및 SHV형 ESBL은 *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub>, *bla*<sub>SHV-1</sub> 등 ESBL 유전자의 점돌연변이에 의한 아미노산 치환에 의해서 생성되는 지속적인 변이 효소가 생김으로써 근래에는 100가지 이상의 TEM형과 50가지 이상의 SHV형 ESBL이 보고되었다(Jacoby, 1994; Paterson과 Bonomo, 2005). Plasmid 매개에 의한 이들 효소는 기능적인 분류에 따른 Bush 등의 분류에서 2be군에, Ambler의 분류에서는 class A에 속한다(Ambler 등, 1991; Bush 등, 1995). 또한 이들 효소는 penicillin과 협범위 cephalosporin뿐 아니라 제3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등은 분해하지만 cephamycin과 carbapenem에는 활성이 없으며 clavulanic acid에 의해 활성이 억제되는 특성이 있다(Livermore, 1995; Dubois 등, 1995). 국내에서도 1990년대 초부터 이 효소를 생성하는 그람음성간균이 보고되었으며 근래에는 더욱 증가하고 있는 실정이다(이 등, 1994; 홍 등, 2001; Jeong 등, 2004). 이러한 ESBL 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 내성전달이 용이하며 급속도로 전파될 수 있으므로 3, 4세대 cephalosporin 계열의 항균제 치료에 심각한 문제가 되고 있다. 이에 본 연구에서는 서울의 2곳의 대학 병원 환자의 임상검체에서 분리된 ESBL생성 *Escherichia coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 항균제 내성 양상과 내성 유전자의 유전자형을 규명하고 PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)를 이용하

여 유전자 양상들을 확인함으로써 이들 균주에 대한 분자역학적 분석을 통하여 세균들에 의한 감염증 치료와 새로운 항균제 개발 및 항균제 내성 세균의 역학적 관리에 도움이 되는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용된 균주는 2002년과 2003년 6월부터 7월사이의 서울소재의 K 및 H 대학 병원으로부터 수집하여 Vitek system (bioMerieux Vitek inc., Hazelwood, Mo., USA)을 이용하여 ESBL로 확인된 *Escherichia coli* 30주와 *K. pneumoniae* 23주를 대상으로 하였다.

### 2. 방법

#### 1) 항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002) 법에 따라 디스크 확산법으로 시행하였다. 항균제 디스크(BBL, Cockeysville, Md., USA)는 amoxicillin/clavulanic acid(20/10  $\mu$ g), cephalothin(30  $\mu$ g), cefotaxime(30  $\mu$ g), cefotaxime/ clavulanic acid(30/10  $\mu$ g), ceftazidime(30/10  $\mu$ g), ceftazidime/clavulanic acid (30/10  $\mu$ g), aztreonam(30  $\mu$ g) 디스크를 사용하였다. 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다.

#### 2) Double disk synergy 시험

시험 대상 균주는 Jarlier 등(1988)이 권장한 double disk synergy(DDS) 시험으로 ESBL 생성을 확인하였다. 즉, 시험 세균을 McFarland 제 0.5관의 탁도에 맞춘 후 Mueller-Hinton 배지에 접종하고, 30  $\mu$ g의 cefotaxime 및 ceftazidime 디스크를 amoxicillin/clavulanic acid 디스크(20/10  $\mu$ g) 가장자리에서 15 mm 떨어진 거리에 놓았다. 35°C 항온기에서 하룻밤 배양한 후 디스크 억제대를 측정하였다. Amoxicillin/clavulanic acid 디스크로 인해 cefotaxime 및 ceftazidime 디스크 중 한 가지의 억제대만이 커져도 DDS 양성으로 해석하였다.

### 3) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의한 ESBL형 감별시험

Mueller-Hinton 배지에서 35°C 항온기에 하루 밤 배양 후 잘 분리된 2~3개의 집락을 멸균증류수에 부유시킨 후 10분간 끓여서 원심분리한 후 DNA가 추출된 상층액 1uL를 주형 DNA로 사용하였다. *bla*<sub>TEM</sub>형 시발체로 sense 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3', anti sense 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'과 *bla*<sub>SHV</sub>형 시발체로 sense 5'-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3' antisense 5'-GGT TAGCGTTGCCAGTGCT-3'을 사용하였고(Pai 등, 1999) PCR 반응 조건은 *bla*<sub>TEM</sub>은 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분 의 순환반응으로, *bla*<sub>SHV</sub>는 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분의 순환반응을 30회 반복하였다. 전기영동하여 1080 bp의 *bla*<sub>TEM</sub> 및 870 bp의 *bla*<sub>SHV</sub>산물이 생기는지를 확인하였다.

### 4) PFGE를 이용한 유전자 구조 분석

PFGE 방법은 Gautom(1997)의 방법을 이용하였다. 시험 대상 세균을 Tryptic soy agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 배양 하였다. 30 unit의 *Xba* I(Promega, New England Biolab.)로 plug를 37°C에서 3시간 반응시켜 DNA를 절단시킨 후, CHEF-DR II system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 6 V/cm, switch time 2.1~35.0초로 14°C에서 16시간 전개시켰다. Size marker로는 Lambda ladder(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca., USA)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 겔을 ethidium bromide(1µg/mL) 용액으로 염색 후 자외선 조영하에서 확인하였으며 PFGE pattern은 computer software Molecular Analyst(Bio-Rad Laboratories, Inc.)로 분석하였다. 유전적 상관성의 Dice coefficient는 PFGE pattern을 토대로 “공통된 절편의 수 × 2 × 100/절편의 전체수”의 공식을 이용하여 구하였으며 균주간의 clustering 은 unweighed pair group method of average linkage (UPGMA)법에 의한 dendrogram을 구성하였다(Li, 1981).

## III. 결 과

### 1. 검체별 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 분리빈도

시험대상 ESBL 생성 균주는 *E. coli* 30주 중 27주

**Table 1.** Distribution of ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates by the source

source of strain	No.(%) of isolates from source		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total
<b>Specimen</b>			
Blood	3( 10.0)	2( 8.7)	5( 9.4)
Urine	27( 90.0)	10( 43.5)	37( 69.8)
Sputum	0 ( 0.0)	7( 30.4)	7( 13.2)
Pus	0 ( 0.0)	3( 13.1)	3( 5.7)
Others	0 ( 0.0)	1( 4.3)	1( 1.9)
Total	30(100.0)	23(100.0)	53(100.0)
<b>Service</b>			
OPD	0( 0.0)	2( 14.3)	2( 5.4)
Ward	4( 17.4)	5( 35.7)	9( 24.3)
ICU	19( 82.6)	7( 50.0)	26( 70.3)
Total	23(100.0)	14(100.0)	37(100.0)

Abbreviation : ESBL, extended-spectrum β-lactamase ; OPD, outpatient department ; ICU, intensive care unit

(90.0%)와 3주(10.0%)가 각각 요와 혈액에서 분리되었으며, *K. pneumoniae* 23주 중 10주(43.5%), 7주(30.4%), 3주(13.1%) 및 2주(8.7%)가 각각 요, 객담, 농, 및 혈액에서 분리되었다. 또한 환자의 소속과를 알 수 있었던 ESBL 생성균주 중 *E. coli* 는 중환자실 분리주 19주(82.6%), 일반 병동 분리주 4주(17.4%)이었으며, *K. pneumoniae*는 중환자실 분리주 26주(70.3%), 일반 병동분리주 5주(35.7%), 외래환자 분리주 2주(14.3%) 순이었다(Table 1).

### 2. 항균제 감수성 시험

분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 53주를 대상으로 디스크 확산법을 사용한 항균제 내성 양상은 모든 균주가 cephalothin에 내성을 보였다. *E. coli* 30주 중에 ceftazidime에 27주(90.0%), cefotaxime 및 aztreonam에 각각 25주(83.3%)가 내성을 보였으나, *K. pneumoniae* 23주 중에 aztreonam에 18주(78.3%), ceftazidime에 17주(73.9%), cefotaxime에 15주(65.3%)가 내성을 보였다. Clavulanic acid 와의 병합제에 대해서는 amoxicillin에 *E. coli* 15주(50.0%)와 *K. pneumoniae* 14주(60.9%)가 내성을 보였으나, ceftazidime에 *E. coli* 30주(100%), *K. pneumoniae* 22주(95.7%)가 감수성을 보였고 cefotaxime에 *E. coli* 29주(96.7%), *K. pneumoniae* 21주(91.3%)가 감수성을 보였다

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility of the 53 isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* by disk diffusion method

Antibiotics	No.(%) of susceptibility					
	<i>E. coli</i> (n=30)			<i>K. pneumoniae</i> (n=23)		
	S	I	R	S	I	R
Amoxicillin+clav	3( 10.0)	12( 40.0)	15( 50.0)	1( 4.3)	8( 34.8)	14( 60.9)
Cephalothin	0( 0.0)	0( 0.0)	30(100.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	23(100.0)
Cefotaxime	0( 0.0)	5( 16.7)	25( 83.3)	1( 4.3)	7( 30.4)	15( 65.3)
Cefotaxime+clav*	29( 96.7)	1( 3.3 )	0( 0.0)	21( 91.3)	2( 8.7)	0( 0.0)
Ceftazidime	2( 6.7)	1( 3.3)	27( 90.0)	1( 4.3)	5( 21.8)	17( 73.9)
Ceftazidime+clav†	30(100.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	22( 95.7)	0( 0.0)	1( 4.3)
Aztreonam	1( 3.3)	4( 13.4)	25( 83.3)	0( 0.0)	5( 21.7)	18( 78.3)

\* , followed to the breakpoint of cefotaxime

† , followed to the breakpoint of ceftazidime

Abbreviation : S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; clav, clavulanic acid

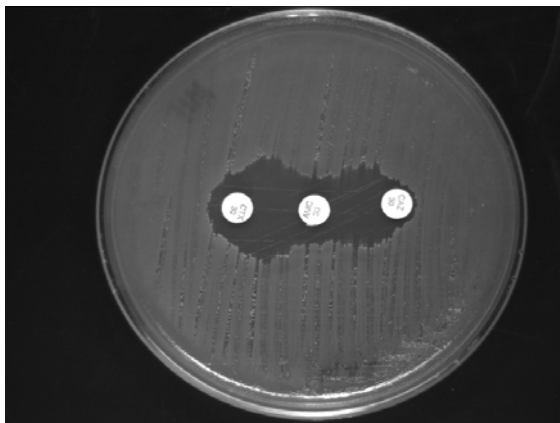
(Table 2).

### 3. Double disk synergy 시험

시험된 균주는 *E. coli* 30주와 *K. pneumoniae* 23주 모두 double disk synergy 양성이었다(Table 3, Fig. 1).

**Table 3.** ESBL screening test using double disk synergy test

Species	No. of tested	Positive (%)	Negative (%)
<i>E. coli</i>	30	30(100.0)	0(0.0)
<i>K. pneumoniae</i>	23	23(100.0)	0(0.0)



**Fig. 1.** Examples of double disk synergy obtained with ESBL-producing *E. coli*. Two 30 µg antibiotic disks (left, ceftriaxone; right, ceftazidime) were placed 15 mm apart (margin to margin) around disk of amoxicillin plus 10 µg of clavulanic acid.

### 4. ESBL의 유전형 분석

ESBL형을 PCR을 이용하여 검출하였다. ESBL 생성 균주인 *E. coli* 30주의 경우 *bla*<sub>TEM</sub>과 *bla*<sub>SHV</sub>의 혼합형이 18주(60.0%), *bla*<sub>SHV</sub>형만 갖고 있는 균주가 6주(20.0%), *bla*<sub>TEM</sub>형만 갖고 있는 균주가 5주(16.7%) 이었으며, *K. pneumoniae*의 경우 *bla*<sub>TEM</sub>과 *bla*<sub>SHV</sub> 혼합형이 14주(60.9%), *bla*<sub>SHV</sub>형만 갖고 있는 균주가 7주(30.4%), *bla*<sub>TEM</sub>형만 갖고 있는 균주가 2주(8.7%) 이었다(Table 4, Fig. 2)

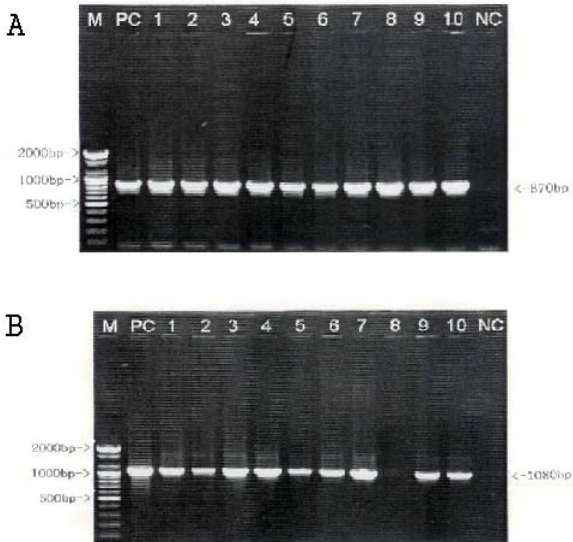
### 5. PFGE 양상 분석

시험균주를 대상으로 PFGE 양상을 분석한 결과, *E. coli*의 경우 표준균주를 제외하고 15가지 band pattern을 확인할 수 있었다. 균주 E15, E17과 E19, 균주 E11, E12, E14, E16, E18, E20과 E21, 균주 E1, E2, E3, E5와 E8, 균주 E7과 E9는 각기 같은 band pattern을 보였다. 또한 28균주 중 25균주가 80% 정도에서 높은 유사성을 보였는데 이들은 대부분이 H병원의 중환자실의 요 검체로부터 분리된 균주들이었다.

*K. pneumoniae*의 경우는 K병원의 다양한 검체들로부터 분리된 균주들이었는데 15가지 band pattern을 보였으며 대부분이 다양한 양상으로 나타났다. 그러나 9균주들은 4가지 pattern(균주 K16, 18과 K20, 균주 K4와 K6, 균주 K3와 K8, 균주 K1과 K2)으로 같은 양상을 보였고 그 중에 2그룹(균주 K3와 K8, 균주 K1과 K2)은 90% 이상의 높은 유사성을 보였다(Fig. 3).

**Table 4.** Resistance genotype of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates with ESBL

Species	No. (%) of frequency of resistance genes				
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Unknowns	Total
<i>E. coli</i>	5 (16.7)	6 ( 20.0)	18 (60.0)	1(3.3)	30 (100.0)
<i>K. pneumoniae</i>	2 (8.7)	7 (30.4)	14 (60.9)	0 (0.0)	23 (100.0)

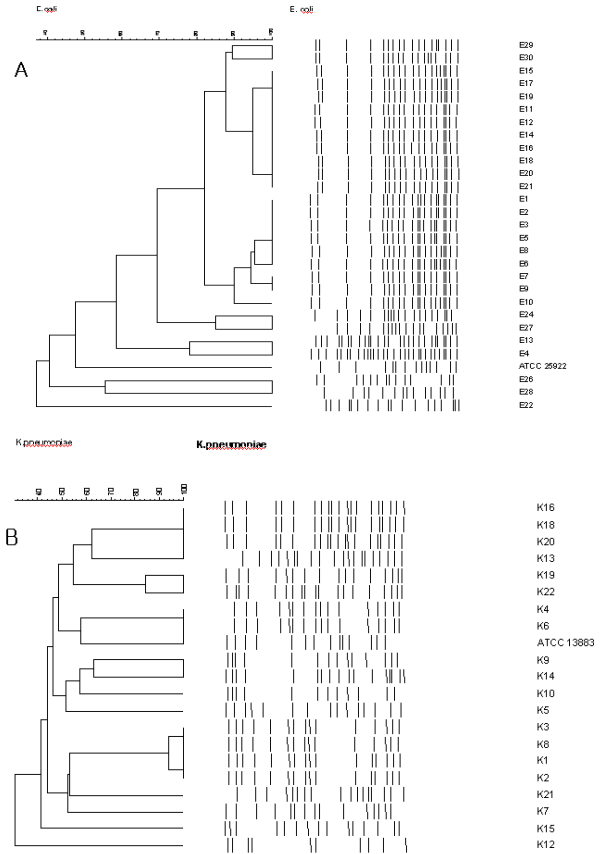


**Fig. 2.** Detection of amplified products for *bla*<sub>SHV</sub> genes (A) and *bla*<sub>TEM</sub> genes (B) by PCR. M, DNA molecular weight marker; PC, positive control strain; NC, negative control strain; Lane 1 to 10, clinical isolates of ESBL-producing *E. coli*.

#### IV. 고 찰

ESBL은 cefotaxime, ceftazidime 등의 oximinocephalosporin과 aztreonam 등의 monobactam 항균제를 분해하는 효소들이다. 이들은 보통의 plasmid 매개성 β-lactamases, 특히 TEM과 SHV 효소의 돌연변이에 의해 나타나며, 효소 활성부위의 구조변화로 oximinocephalosporin에 대한 가수분해능이 커졌다. 근래 폐렴이나 균혈증 등 중증감염을 일으키는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중에 ESBL을 생산하는 균주가 증가하고 있다(Jacoby와 Medeiros, 1991). 또한 ESBL 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 전파될 수 있으므로, 심각한 문제가 되었다. 국내에서도 ESBL 생성균주의 분리가 증가하고 있으며 감수성 비율이 점점 감소하는 추세로 있다고 보고하였다(이 등, 1994; 정 등, 1997; 홍 등, 2003).

본 연구에서는 서울 소재 2곳의 대학병원으로부터 ESBL 생성균주로 확인된 *E. coli* 30주 *K. pneumoniae* 23주를 포함한 53주를 대상으로 시험하였다. 이들 분리 균



**Fig. 3.** Dendrograms of similarities among the ESBL-producing *E. coli* (A) and *K. pneumoniae* (B) strains by PFGE patterns. The chromosomal DNA were cleaved Xba I. Pattern clustering on a matrix of dice coefficient was based on the unweight pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

주 중 *E. coli* 30주 중에 27주(90.0%)가 요에서 분리되었으며, *K. pneumoniae* 23주 중에 요 10주(43.5%), 객담 7주(30.4%)로 요와 객담이 74%를 차지했다. 이는 송 등(2000)이 보고한 ESBL 생성 *E. coli* 경우 분리된 검체의 비율중 요 65%, 객담 13%로 요 분리수가 가장 많았던 것과 유사하였으나 *K. pneumoniae* 경우 객담이 52%, 요 28%로 객담에서 분리율이 높았던 것과는 다소 상이한 결과를 나타냈는데. 이는 본 조사에서 단기간에 소수의 균주를 대상으로 했기 때문으로 생각된다. ESBL 생성균주에 의한 균혈증인 경우 ESBL 비생성 균주에 비해 적절한

항균제의 선택의 어려움과 더불어 항균제 내성 전파 및 발생에 매우 심각한 문제인데(Kim 등, 2002), 본 연구의 혈액 분리주 중에도 *E. coli* 3주(10.0%), *K. pneumoniae* 2주(8.7%)를 차지하였다. 또한 ESBL생성균주는 원내감염을 일으키며 중환자실 분리주 중에 흔한 것으로 알려져 있다(송 등, 2000). 본 연구에서도 수집된 균주 중 중환자실 분리주가 26주(70.3%)로 외래나 일반 병실환자 분리주에 비해 높았다. 시험기간 중 분리된 균주들의 항생제 내성률은 cephalothin에 대해서는 모두가 감수성이었고 *E. coli*의 경우 ceftazidime에 대한 내성률이 90.0% cefotaxime과 aztreonam에 대한 내성률이 각각 83.3%로 *K. pneumoniae*의 73.9%, 65.3% 78.3%보다 높은 내성률을 나타내었다. 또한 송 등(1999년)은 *K. pneumoniae* 42주, *E. coli* 15주를 포함한 57주의 ESBL 생성균주에 대한 항생제 내성 조사에서 ceftazidime에 대한 중간 감수성 또는 내성률이 87.7%, cefotaxime에 94.7%, aztreonam에 89.3%이었는데 본 연구에서는 ceftazidime에 94.3%, cefotaxime과 aztreonam에 각각 98.1%로 본 연구의 결과가 대체로 높은 내성을 보였다. 이는 다양한 beta-lactamase 유전자들을 중복해서 가진 균주가 증가하거나 세포막의 불투과성과 관련된 돌연변이의 증가에 의한 것으로 생각된다. Clavulanic acid와의 병합제에서는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 ceftazidime에 각각 100%, 95.7%, cefotaxime에 96.7%, 91.3%의 감수성을 보여 *E. coli*가 *K. pneumoniae*보다 더욱 높은 감수성을 보였다. 또한 시험된 53주 모두가 DDS 시험에서는 양성을 보였으며 이들 52주는 *bla*<sub>TEM</sub>이나 *bla*<sub>SHV</sub>를 갖고 있었는데, *E. coli* 18주(60.0%), *K. pneumoniae* 14주(60.9%)는 *bla*<sub>TEM</sub>이나 *bla*<sub>SHV</sub>를 모두 갖고 있었으므로 *E. coli*, *K. pneumoniae* 모두가 TEM과 SHV형 ESBL이 우세한 것으로 나타났다. Pai(1998)와 Kim 등(1998) 국내의 3개 대학병원에서 분리된 ESBL 생성 균주를 대상으로 한 조사에서 *E. coli*의 경우는 TEM-52가 *K. pneumoniae*의 경우는 SHV-12, SHV-2a가 가장 흔하다고 보고하였고, 본 연구에서도 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 SHV가 각각 80.0%와 91.3%, TEM이 76.7%와 69.6%로 *E. coli*는 TEM이 *K. pneumoniae*는 SHV가 더욱 높게 관찰되었다. Chaves 등(2001)은 *K. pneumoniae*에서 *bla*<sub>SHV-1</sub>를 chromosome에 95% 이상 차지한다고 보고 하였는데, 이러한 이유로 본 연구에서도 *K. pneumoniae*가 *E. coli*보다 높게 *bla*<sub>SHV</sub>가 관찰되는 것으로 보인다. 따라서 PCR 결과 *bla*<sub>SHV</sub>에 대해 비록 양성이라도 *K. pneumoniae*뿐 아니라 *E. coli* 중 SHV에

의한 ESBL이 아닌 균주도 혼재해 있을 것으로 보인다. 또한 *E. coli* 1 주에서 표현형은 ESBL로 나타났지만 *bla*<sub>TEM</sub>이나 *bla*<sub>SHV</sub> 중 어느 하나도 나타나지 않았는데 이는 *bla*<sub>TEM</sub>이나 *bla*<sub>SHV</sub> 이외의 *bla* CTX-M과 같은 다른 유전자형일 것으로 추측된다.

최근 국내에서도 ESBL 생성 균주에 의한 병원 감염이 계속 보고되고 있다. 이들 균주는 ESBL 유전자가 흔히 plasmid에 존재하며, 다른 장내세균간에 전파될 수 있어 심각한 문제가 될 수 있다. 본 연구에서 *E. coli* 28주와 *K. pneumoniae* 20주에 대한 PFGE 양상을 보면 *E. coli*의 경우 23주는 80% 이상의 유사성을 보였는데 이들 균주는 대부분 H병원의 중환자실에서 분리된 균주로서 집단 발생에 의한 clonal spread인 것으로 추측된다. 또한 *K. pneumoniae*는 주로 K 병원에서 중환자실, 외래 및 일반 병동 등의 다양한 환자들로부터 분리된 균주들이었는데 일부 균주들은 동일한 PFGE 양상을 나타내므로 clonal spread인 것으로 추정되지만 대부분이 균주간의 유전적 유연관계가 낮은 것으로 판단된다. 같은 병원내에서 분리된 균주간에 유사성이 낮은 것은 여러 클론의 균주에 의한 감염이 존재하거나 또는 plasmid에 의한 수평전달로 유전자 전달 등을 통한 전파에 의한 것으로 추측할 수 있다.

이상의 결과로 ESBL로 확인된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에는 *bla*<sub>TEM</sub>과 *bla*<sub>SHV</sub>형 유전자가 만연되어 있는 것으로 판단된다. 따라서 일선 검사실에서의 검사성적으로 치료에 오류가 발생할 소지가 많으므로 ESBL 성적 보고가 필요하다. 이들  $\beta$ -lactamase 생성에 관여하는 유전자의 확산은 제3세대 cephalosporin으로 *E. coli* 혹은 *K. pneumoniae* 감염증 치료 시 제3세대 cephalosporin의 유용성을 낮게 함으로써 carbapenem 제제의 사용이 증가될 수 있다. 또한 이로 인해 carbapenem 내성균주 등장을 촉진시켜 환자 치료에 어려움이 증가하게 될 수 있다. 따라서 향후 이러한 균들의 전파방지를 위한 지속적인 감시와 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276:269-270, 1991.

2. Arlet G, Sanson-Le, Por MJ, Rouveau M, Fouenier G, Mario O, Schlemmer B. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4  $\beta$ -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:797-803, 1990.
3. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. *Infection* 21:18-22, 1993.
4. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933-951, 2001.
5. Bush K. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33:259-63, 1989.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 33:259-263, 1995.
7. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1  $\beta$  -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2856-2861, 2001.
8. DuBois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM-and SHV-derive extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 35:7-22, 1995.
9. Gautom RK, Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 35:2977-2980, 1997.
10. Jacoby GA, Medeiros AA. More Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 35(9): 1697-1704, 1991.
11. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(S1): 2-11, 1994.
12. Jarlier V, Nicolas H, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867-878, 1988.
13. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol* 42(7):2902-2906, 2004.
14. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho JW. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol* 36(5):1446-1449, 1998.
15. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, KIM EC. Bloodstream infections by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 46(5):1481-1491, 2002.
16. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11: 315-317, 1983.
17. Li Wen-Hsiung. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1085-1089, 1981.
18. Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557-584, 1995.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; Twelfth informational supplement, M100-S12. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
20. Pai H. The characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in korean isolate of Enterobacteriaceae. *Yonsei Med J* 39:514-519, 1998.
21. Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, Choe KW. Survey of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalance of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol* 37:1758-1763, 1999.

22. Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update laboratory. *Clin Microbiol Rev* Oct:657-686, 2005.
23. Phillippon A, Labia R, Jacoby GA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1131- 1136, 1989.
24. 송원근, 김현태, 이규만. Cefpodoxime 디스크를 이용한 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli* 선별법. *대한임상병리학회지* 19(2):196-201, 1999.
25. 송원근, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈, 신혜정 등. 전국 12개 병원에서 분리된 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *대한화학요법학회지* 18:401-410, 2000.
26. 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *감염* 26(4):341-348, 1994.
27. 정윤섭, 이경원, 오까모도 료이찌, 이노우에 마쓰히사. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum  $\beta$ -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 성장. *감염* 29:477-485, 1997.
28. 홍성근, 강명서, 최종락, 이경원, 정윤섭, 권오현. 임상검체에서 분리된 Enterobacteria ceae 균종의 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 유형 및 분자유전학적 특성. *대한임상병리학회지* 21:495-504, 2001.
29. 홍성근, 김선주, 정석훈, 장철훈, 조성란, 안지영, 신종희, 이혜수, 송원근, 어영, 염종화, 용동은, 이경원, 정윤섭. 국내에서 분리된 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도 및 유형. *대한임상미생물학회지*6(2): 149-155, 2003.