

Escherichia coli가 생성하는 CTX-M형 Extended-Spectrum β -lactamase

황현용¹, 박재선², 배일권¹, 이유내¹, 정석훈¹

고신대학교 의과대학 진단검사의학과 교실¹, 소아과 교실²

Escherichia coli Producing CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase

Hyun Yong Hwang¹, Jae Sun Park², Il Kwon Bae¹, Yu Nae Lee¹, Seok Hook Jeong¹

Department of Laboratory Medicine¹, and Pediatric² Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background β -lactam antibiotics have been broadly used to treat gram negative microorganisms, which resulted in the occurrence of antibiotics-resistant microorganisms. Microorganisms mainly achieve resistance to antibiotics by producing β -lactamases that decrease activities of antibiotics. Various types of CTX-M extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have been known since CTX-M-1 and CTX-M-2 ESBLs were reported in 1996. CTX-M-14 β -lactamases were reported in Seoul and Cheju Island of Korea in 2001. Until now, there has been no CTX-M type ESBL report in Korea. So, the research on the identification of the CTX-M type ESBLs and their genetic types using *E. coli* resistant to or intermediate to cefotaxime were performed. **Methods** Total of 365 isolates of *Escherichia coli* from Kosin University Hospital in Busan for a six-month periods were examined. Disk diffusion test for antibiotics susceptibility, double disk synergy test for confirming ESBL, polymerase chain reaction (PCR) for identifying genetic types of CTX-M ESBLs, minimal inhibitory concentration tests of CTX-M ESBLs and isoelectricfocusing (IEF) for measuring the pI of β -lactamase were tested using *E. coli* resistant or intermediate to cefotaxime. **Results** Thirty one out of 365 *E. coli* isolates were resistant to or intermediate to cefotaxime. Fifteen out of 31 *E. coli* isolates resistant or intermediate to cefotaxime were positive to double disk synergy, 6 isolates of which were positive to PCR by CTX-M-2F and CTX-M-2R primers. MICs of cefotaxime to isolates carrying CTX-M ESBL were as high as ≥ 128 mg/L. MICs of ceftazidime were relatively low as 2-64 mg/L. Isoelectric point was 8.4 for *bla*_{CTX-M-3} and 8.6 for *bla*_{CTX-M-15}, respectively. **Conclusion** CTX-M-3 β -lactamase and CTX-M-15 β -lactamase found in this study are genetically different from previous types of CTX-M-type ESBLs in Korea. Also newly found CTX-M type ESBLs are expected to cause difficulties in the treatment of infections. So, extensive studies on the prevalence, genetic types, and epidemiology of CTX-M-type ESBLs are needed to refine the infection treatment.

Key Words : *E. coli*, cefotaxime, ceftazidime, CTX-M-3, CTX-M-15.

서론

그람음성세균에 임상적 효용성이 있는 첫 penicillin

교신저자 : 정 석 훈

주소 : 602-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 진단검사의학과
TEL : 051-990-6373, FAX : 051-990-3034
E-mail : kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

계 항균제인 ampicillin이 도입된 이후, β -lactam 항균제는 그람음성세균에 의한 감염증 치료에 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나 항균제 사용의 결과로 내성세균이 출현하였으며, 이들 내성세균의 치료를 위해 보다 강력한 항균제를 개발해야 하는 악순환이 되풀이되고 있다.

세균이 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은 다양하는데, penicillin과 cephalosporin계 β -lactam 항균제에 대한 내성은 대부분의 경우 β -lactamase 생성에 의하며, β -lactamase는 β -lactam ring에 작용하여 가수분해로 항균제를 불활화한다.¹⁾ 이러한 β -lactamase 생성에 의한 항균제의 불활성화가 β -lactam 항균제에 대한 내성획득의 가장 중요한 기전이다. 많은 종류의 그람 음성 세균이 자연적으로 발생하는 염색체 매개 β -lactamase를 소유하며 이러한 효소는 penicillin-binding 단백질에서 유래한 것으로 사료된다. 1960년대 초에 그람음성세균에서 plasmid-mediated- β -lactamase인 TEM-1이 최초로 보고되었다.²⁾ 이후 수년 동안에 TEM-1 β -lactamase는 전 세계로 확산되었으며, 오늘날 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* 및 *Neisseria gonorrhoeae* 등의 다양한 균주에서 발견되며, plasmid-mediated β -lactamase인 SHV-1은 대부분의 *Klebsiella pneumoniae*와 대부분의 *E. coli* 분리 균주에서 염색체와 plasmid에 의해 각각 나타난다.³⁾

과거 많은 종류의 β -lactam 항균제가 특별히 β -lactamase의 가수분해 작용에 견디도록 만들어졌으나 이러한 항균제의 사용으로 새로운 β -lactamase가 출현하여 약제 내성을 초래하였으며, 이들 약물 중 대표적인 것이 1980년대에 심각한 그람음성 세균에 감염되었을 때 널리 사용된 oxyimino-cephalosporins이다.³⁾ 항균제의 광범위한 사용으로 세균 β -lactamase의 항균제에 대한 활성의 증가, 특히 oxyimino-cephalosporins에 대한 활성의 증가로 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)라고 불리게 되었다.

제 3세대 cephalosporin과 aztreonam과 같은 광범위 항균제가 임상에서 사용된 후, ESBL 항균제에 대한 내성이 급속하게 확산되었으며 이러한 β -lactam 항균제를 가수분해하는 효소인 SHV-2가 독일에서 *Klebsiella ozaenae* 분리주에서 처음으로 보고되었으며,⁴⁾ 1983년 독일에서 ESBL 생성으로 cefotaxime 내성을 획득한 *K. pneumoniae*가 검출되는 등 전 세계적으로 다양한 유형의 ESBL 생성균주가 분리되었으며, 그 빈도는 계속 증가하고 있다.⁵⁾

대부분의 ESBLs은 TEM 혹은 SHV 효소 유도체

다. TEM 및 SHV형 ESBL은 *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2}, *bla*_{SHV-1} 등 BSBL 유전자의 점 변이에 의한 아미노산 치환에 의해서 생성되었다.⁶⁾ Plasmid에 의해 매개되는 이들 ESBL은 가수분해 활성범위가 매우 넓은 효소로, 가수분해 기질특이성 및 억제특이성에 따른 Bush 등의 분류에서 Group 2be, 분자구조에 의한 분류에서는 Class A에 속한다.⁷⁾ 이들 효소는 penicillin, 협범위 cephalosporin 뿐만 아니라 제 3, 4세대 cephalosporin, aztreonam 등 광범위 항균제도 가수분해하지만, cephamycin과 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid, sulbactam 등 β -lactamase inhibitor에 의해서 활성이 억제되는 특징이 있다.⁸⁾ 지금까지 80가지 이상의 TEM형 ESBL과 30가지 이상의 SHV형 ESBL이 보고되었다. (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>)⁹⁾ TEM-1이 그람음성세균의 β -lactamase로 가장 흔히 분리되는 형태며 *E. coli*의 ampicillin 내성의 90% 이상이 TEM-1의 생산에 의한 것이다.¹⁰⁾ TEM-3가 최초로 ESBL 형태를 나타낸 TEM형 β -lactamase다.¹¹⁾ TEM형 ESBLs은 주로 *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* 및 *Salmonella* spp. 와 같은 다양한 종류의 장내 세균에서 보고되었다.¹²⁾ SHV형 β -lactamase는 TEM형 β -lactamase와는 달리 상대적으로 적은 수의 유도체를 가지며, SHV-1 β -lactamase는 *K. pneumoniae*에서 가장 흔히 발견되고, 최고 20%까지 이 균주의 plasmid 매개 ampicillin 내성의 원인으로 사료된다.¹³⁾ ESBL 형태를 나타내는 대부분의 SHV 유도체는 ESBL 형태를 나타내며 이러한 SHV형 ESBLs은 대부분 *K. pneumoniae* 균주에서 발견된다.

근래에 CTX-M이라고 불리는 plasmid 매개의 ESBLs이 발견되어 cefotaxime을 완전히 가수분해하는 것으로 알려졌다. 첫 유도체인 CTX-M-1이 1990년대 보고되었는데,¹⁴⁾ 주로 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium와 *E. coli*와 다른 *Enterobacteriaceae*에서 발견되었다. β -lactamase의 CTX-M family는 계통발생학적으로 1) CTX-M-1과 CTX-M-3를 포함하는 CTX-M-1-type, 2) CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 및 Toho-1을 포함하는 CTX-M-2-type, 3) Toho-2 및 4) CTX-M-8의 4개의 주

요 형태로 구분된다.¹⁵⁾ CTX-M형 ESBL 역시 plasmid에 유전자가 매개되는데, TEM 혹은 SHV형 ESBL과 기질특이성 및 억제특이성이 유사하지만, ceftazidime에 대한 가수분해 활성이 cefotaxime에 비해 강하거나 비슷한 TEM 혹은 SHV형 ESBL과 달리 cefotaxime에 대한 활성이 ceftazidime에 비해 상대적으로 강한 특성이 있다. 또한 이 효소는 cefotaxime에 대한 강한 가수분해작용 외에 sulbactam이나 clavulanate β -lactamase inhibitor보다 tazobactam β -lactamase inhibitor에 의해 더 잘 억제되는 특징이 있으며, 모든 CTX-M 효소에 존재하는 position 237의 serine residue가 CTX-M-type β -lactamase의 extended-spectrum 활성에 중요한 역할을 하는 것이 제안되어왔다.¹⁶⁾

CTX-M-type β -lactamase를 표현하는 균주는 1996년 Bauerfeind 등에 의해 CTX-M-1과 CTX-M-2가 처음 보고 된 이후 30여가지 변종이 알려졌다.¹⁷⁾ 국내에서는 서로 다른 지역에서 분리된 *Shigella sonnei*, *E. coli* 및 *K. pneumoniae*에서 CTX-M-14 β -lactamase가 확인되었으며, 이들 분변과 혈액의 임상검체에서 분리된 CTX-M-14 생성 *K. pneumoniae* 2주, *E. coli* 1주 및 *S. sonnei* 1주에 대한 확인 연구 외엔 지금까지 CTX-M형 ESBL의 보고가 없었다.¹⁸⁾

이에 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 검출된 cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. coli*를 대상으로 CTX-M형 ESBL 생성현황을 조사하고 내성유전자의 유전형을 규명하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 균주의 수집

부산의 한 대학병원에서 2003년 1월에서 6월 사이에 임상검체에서 분리된 *E. coli*를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 균종은 전통적인 생화학적 방법 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 시험

디스크 확산법으로 시험하였다. 항균제 디스크로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, cefepime 및 imipenem 디스크 (이상 BBL, Cockeysville, MI, USA)를 사용하였다. 결과의 정확성을 위하여 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. ESBL 생성균주의 확인

Double disk synergy 시험을 사용하였다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10 μ L, BBL, Cockeysville, MI, USA), 그 주위에는 30 μ L의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 1.5 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

4. 접합에 의한 내성 전달

Jacoby 및 Han의 방법을 참조하여서 시험하였다.¹⁹⁾ Azide에 내성인 *E. coli* J53을 내성수여자로 사용하였으며, 내성공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (Difco, Cockeysville, MI, USA) 액체배지에 접종하여서 3시간 진탕배양하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37°C로 1시간 배양 후, cefotaxime 8 μ g/mL와 azide 100 μ g/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. 37°C에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선별하였다. 내성 전달의 확인을 위해서 transconjugant의 cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였다.

5. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다. 시험 항균제로는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefotetan, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam, cefepime 및 imipenem을 사용하였다. 시험균주 10^4

Table 1. Nucleotide primers used for detection of CTX-M- β lactamase

Name	Nucleotide Sequence	GenBank Accession No.	Product Size(bp)
CTX-M-1F	5' -atgatgactcagagcattcgc- 3'	AJ272538	893
CTX-M-1R	5' -tcgctccatttattgcatca- 3'		
CTX-M-2F	5' -cccatgggttaaaaaatcactg- 3'	AF488377	891
CTX-M-2R	5' -ccgtttccgctattacaac- 3'		
CTX-M-3F	5' -gattgaccgtattgggagttt- 3'	AF174129	909
CTX-M-3R	5' -tattgagagttacagcccttcg- 3'		
CTX-M-4F	5' -atgttaatgacgacgcctgtg- 3'	AY157676	689
CTX-M-4R	5' -ccgcttttatcccccagaca- 3'		

colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 mg/L 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator (Craft Machine, Chester, PA, USA)로 접종하였다. 37°C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

6. Isoelectrofocusing (IEF)에 의한 등전점(pI) 측정

세균 crude extract 10 μ L와 동량의 sample buffer (TEFCO Corporation, Tokyo, Japan)를 섞어 agarose gel (pH 3-10, TEFCO Corporation, Tokyo, Japan)에 100V 1시간, 200V 1시간 및 300V 40분간 전기영동하였다. Nitrocefin (OXOID, Hampshire, England)에 적신 여과지로 gel을 덮고 20초간 염색하였다. Gel에 나타난 붉은색의 band를 관찰하여 β -lactamase의 pI를 확인하였다.

7. Primer 고안

CTX-M형 β -lactamase 유전자의 염기서열을 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 취하였다. DNASpace version 3.02 (Genetic Systems, Hitachi, Japan)와 Vector NTI Suite (InforMax, Frederick, MD, USA)을 사용한 multialignment 분석 결과에 기초하여 CTX-M형 β -lactamase 유전자에 특이적인 부분을 primer로 고안하였다(Table 1). 고안된 primer와 CTX-M형 β -lactamase 유전자 염기서열 동정은 BLAST로 분석하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

8. 분자생물학적 방법에 의한 내성유전형 확인

PCR시험세균을 Tryptic Soy broth (Difco, Cockeyville, MI, USA)에 접종하여 37°C로 하룻밤 진탕배양 하였다. 배양액 1 mL를 취하여 5분간 13,000 g로 원심하였다. 상청액은 버리고, 침사는 증류수 500 μ L에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000 Xg로 원심하고, 상청액을 취하여 DNA 추출액 5 μ L, primer 각 1 μ L, deoxynucleotide triphosphates 2.5 mM (8 μ L), Taq DNA polymerase 2.5 U (0.5 μ L), 10X buffer 10 μ L 및 증류수 로 CTX-M형 ESBL의 유전형을 시험하였다. 75.5 μ L를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 94°C로 30초간 denaturation, 58°C로 1분간 annealing, 72°C로 1분간 extension하는 35 cycle의 PCR을 시행하였다. 증폭산물 10 μ L를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)에 40분간 전기 영동하여 증폭산물의 band를 확인하였다. PCR 증폭산물을 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH, USA)를 이용하여 dideoxy-mediated chain termination 법으로 염기서열을 양방향으로 분석하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상

항균제 감수성 검사를 위해 시험기간 중 분리된 *E.*

coli 365주 중 *E. coli* 31주(8.5%)가 cefotaxime에 중간 혹은 내성이었다.

2. ESBL 생성 확인과 접합에 의한 내성 전달

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 *E. coli* 31주 중 15주가 double disk synergy 양성이었다. 이 중 *E. coli* 3주의 cefotaxime 내성이 recipient인 *E. coli* J53으로 전달되었다.

3. ESBL 유전형

Double disk synergy 양성인 *E. coli* 15주 중 6주는 CTX-M-2F 및 CTX-M-2R primer를 이용한 PCR에 양성반응을 보였다. CTX-M-1F와 CTX-M-1R primer, CTX-M-3F와 CTX-M-3R, CTX-M-4F와 CTX-M-4R를 이용한 PCR에 양성반응을 보인 균주는 없었다. CTX-M-2F와 CTX-M-2R primer에 의한 PCR산물 중 *E. coli* 1주(K17391)는 *bla*_{CTX-M-3}와 나머지 5주의 산물은 *bla*_{CTX-M-15}와 일치하였다.(Table 1, Fig 1, 2)

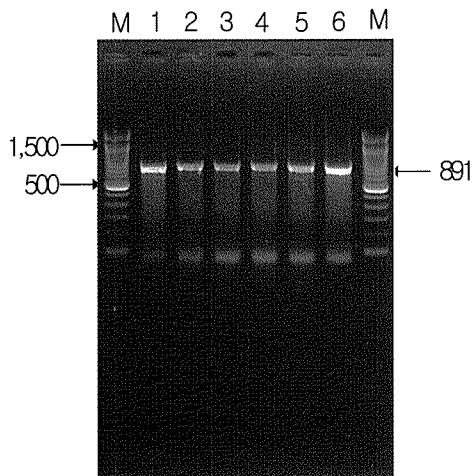


Fig 1. PCR for identification of CTX-M type ESBL;
lane 1 and 8, M : molecular size marker;
lane 2, 1 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K12241);
lane 3, 2 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K12776);
lane 4, 3 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K14911);
lane 5, 4 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K16875-1);
lane 6, 5 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K17391);
lane 7, 6 : plasmid from ESBL producing *E. coli* (K18585).
The numbers to the right and left of the gel are in base pair.

4. MIC 및 pI

CTX-M형 ESBL 유전자를 지닌 균주에 대한 cefotaxime의 MIC는 ≥ 128 mg/L로 높았으며, ceftazidime의 MIC는 2-64 mg/L로 상대적으로 낮았으며, isoelectric focusing으로 *bla*_{CTX-M-3} 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.4, *bla*_{CTX-M-15} 유전자를 지닌 균주에서는 pI 8.6의 β -lactamase band를 각각 확인할 수 있었다.(Table 2)

고찰

아직 그 기원이 정확하게 밝혀지지 않은 CTX-M형 ESBL은 plasmid에 매개되며 class A ESBL에 속한다. Cephalosporin 대부분에 대해 가수분해 활성을 지니고 있지만, carbapenem과 cephamycin에 대한 활성은 없으며, clavulanic acid에 의해서 활성이 억제된다. 이 효소는 주로 *Salmonella enterica*와 *E. coli*에서 주로 발견되었지만 다양한 장내세균에서 이 효소가 보고되어 왔다. 이 효소의 TEM 및 SHV형 ESBL과의 상동성은 대략 40%로 그다지 밀접하게 연관되어 있지는 않다.¹⁶⁾ 그러나 *K. oxytoca*, *C. diversus*, *Proteus vulgaris*, 및 *Serratia fonticola*에서 발견된 염색체성 class A cephalosporinases는 상당한 유사성을 공유하여 대략 73-77%의 상동성을 보인다.¹²⁾ 최근에는 Humeniuk 등에 의해 *Kluyvera ascorbata*의 염색체성 AmpC 효소와 CTX-M 효소 사이에 아주 밀접한 상동성이 보고되어 이 균종이 일부 CTX-M 효소의 기원으로 제시되었다.²⁰⁾ CTX-M ESBL은 일반적으로 ceftazidime보다 cefotaxime에 더 큰 활성을 가진다.²¹⁾ CTX-M-15와 CTX-M-16 β -lactamase는 position 240에서 아미노산의 치환 (aspartate→glycine)이 존재하는데, 이 지역은 일부 TEM/SHV형 ESBL의 ceftazidime 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 구조적으로 유사한 β -lactamase인 CTX-M-15 효소와 CTX-M-3 효소의 생화학적 연구에서 CTX-M-15는 CTX-M-3보다 β -lactam에 대해 더 높은 친화도를 나

Escherichia coli가 생성하는 CTX-M형 Extended-Spectrum β -lactamase

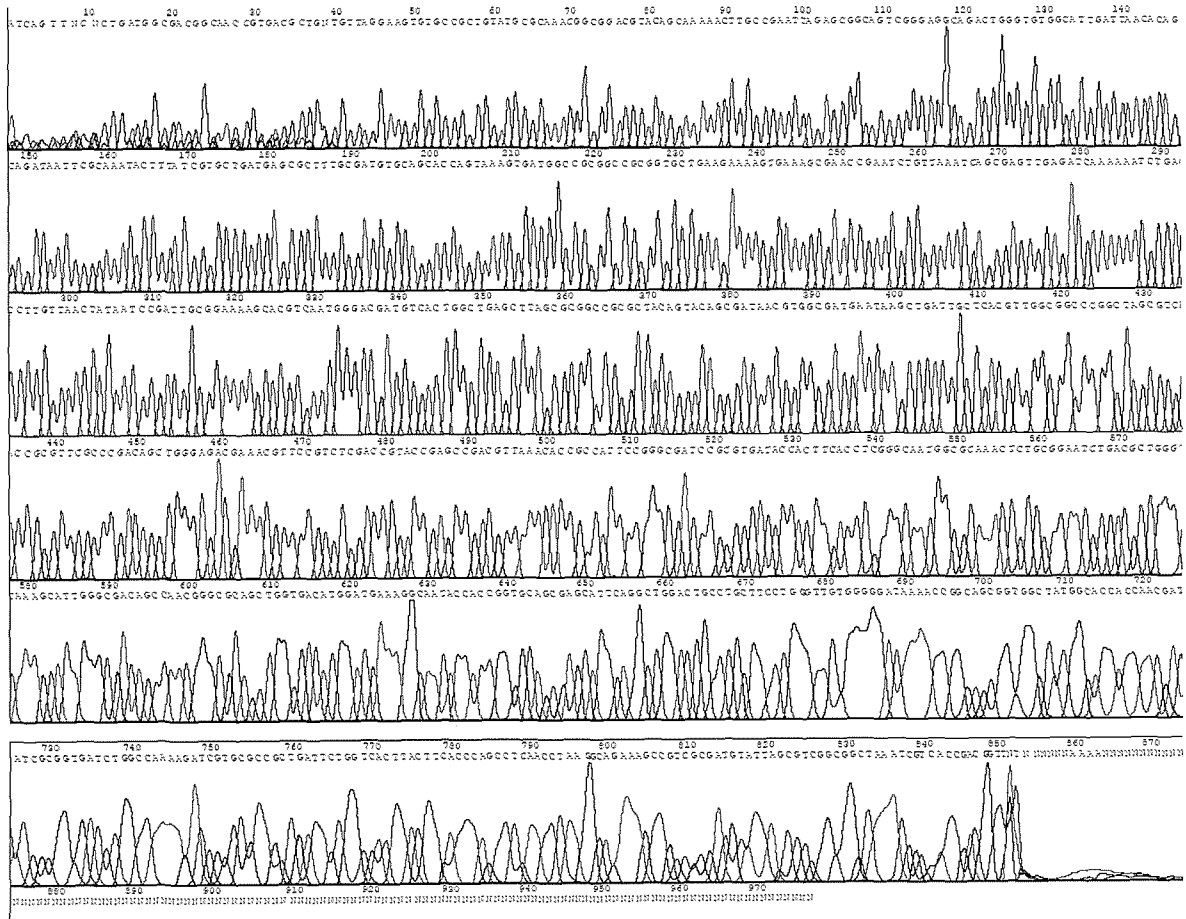


Fig 2. Sequencing for identification of blaCTX-M-3 gene for CTX-M-3 beta-lactamase

Table 2. Antimicrobial susceptibilities and IEFs of CTX-M- β lactamase positive *E. coli*

Lab No	Specimen	MIC											pI
		PIP	PIP/TAZ	A/S	CFP	CEP	FOX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IPM	
<i>E. coli</i>	K12441 E-tube* tip	>256	32	64	256	>256	4	8	>256	64	64	0.25	8.4
	K12776 urine	>256	16	32	>256	>256	4	64	>256	256	256	0.25	8.4
	K14911 E-tube tip	>256	8	32	>256	>256	2	2	>256	64	32	0.25	8.4
	K16875-1 pus	>256	8	32	>256	>256	8	8	>256	256	64	0.25	8.4
	K17391 urine	>256	32	32	>256	>256	16	64	>256	128	128	0.12	8.6
	K18585 urine	>256	16	32	>256	>256	16	8	128	128	64	0.12	8.4

Abbreviations of antibiotics are as follows ; PIP : piperacillin, PIP/TAZ : peperacillin/tazovactam, A/S : ampicillin/sulbactam, CEP : cephalothin, CFP : cefoperazone, FOX : cefoxitin, CAZ : ceftazidime, FEP : cefepime, ATM : aztreonam, IPM : imipenem

* : endotracheal tube

타내며 ceftazidime을 가수분해 할 수 있어 장내세균에서 extended-spectrum cephalosporin에 내성을 나타낼 수 있음을 암시하였다.²³⁾

CTX-M형 ESBL은 1989년 독일에서 분리된 *E. coli*

에서 처음 발견되었으며, 이후 유럽, 남아메리카, 동아시아, 아프리카 등 전 세계 여러 국가에서 보고되었다.¹⁷⁾ CTX-M-type β -lactamase를 표현하는 균주는 세계의 여러 곳에서 분리되었는데 주로 동유럽, 남

미, 및 일본에서 집중적으로 분리되는 양상을 보였다.^{24,25)} 1990년과 1995년 사이에 보고된 바에 의하면 독일, 이탈리아, 아르헨티나, 파파과이, 이스라엘 및 일본에서 CTX-M-1, CTX-M-3 및 Toho-1의 단지 3개의 CTX-M 효소가 임상 검체에서 발견되었다.²⁶⁾ 1998년 이후로 CTX-M-3, CTX-3-like, CTX-M-3-4~17, Toho-2 및 Toho-3가 추가로 폴란드, 라티비아, 러시아, 그리스, 브라질, 스페인, 케냐, 및 중국 등지에서 보고되었다.²⁷⁾

최근에 분리된 CTX-M-3과 CTX-M-15 β -lactamase를 살펴보면, 프랑스에서 CTX-M-15 생산 균주의 만연이 보고되었고,²⁸⁾ Edelstein 등이 러시아에서 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 병원감염 균주에서 검출된 CTX-M β -lactamase가 대부분 CTX-M-3과 CTX-M-15 β -lactamase임을 확인하였다.²⁹⁾ 또한 캐나다의 ESBL을 생산하는 균주 중 CTX-M-3 생산 균주, CTX-M-14 생산 균주, 및 CTX-M-15 생산 균주가 각각 1균주, 15균주, 11균주로 확인되어 먼 지역간의 이들 CTX-M 효소의 전파 가능성이 암시되었다.³⁰⁾

아시아에서는 1993년 일본에서 Toho-1 ESBL을 생성하는 *E. coli*가 분리된 것을 필두로, 대만, 중국 등에서 다양한 CTX-M형 ESBL이 보고되었는데, 타이완에서는 Yan 등이 *E. coli*의 CTX-M-3형 β -lactamase를 극동에서 처음 보고하였으며,³¹⁾ 최근 중국의 ESBL 생산 균주의 발생빈도 조사에서 CTX-M-3 β -lactamase의 비율이 높았다.³²⁾ 국내에서는 2001년 CTX-M-14- β -lactamase가 5년의 기간 동안 서로 다른 지역에서 분리되었는데, 이들 산물의 아미노산 배열이 스페인에서 분리된 CTX-M-9와 한 곳(Ala-231→Val)에서 달랐으며, 유전자 배열이 근래에 중국(accession no. AF252622)과 일본(accession no. AF311345)에서 분리된 것과 일치하였다.¹⁸⁾

본 연구에서는 분자 구조적으로 CTX-M형 ESBL을 4분류로 나누었다. 먼저 첫 번째 CTX-M group은 주로 유럽에서 보고된 것이다. *K. ascorbata*에서 분리된 것은 모두 프랑스에서 보고된 것으로 kluA-1, 2, 3, 4, 5등이 있으며, CTX-1(MEN-1)과 84%의 상동성이 있는 CTX-M-2, 237번째 serine이 alanine으로 치환된 보고된 CTX-M-4 등이 여기에 포함된다.³³⁾

두 번째 group은 유럽전역과 동아시아 및 아프리카에서 분리된 것으로 최초 CTX-M형 ESBL인 CTX-M-1(MEN-1),³⁴⁾ 폴란드에서 검출된 CTX-M-3,³⁵⁾ 인도에서 발견된 CTX-M-15,³⁶⁾ CTX-M-3와 99%의 염기서열 상동성을 갖는 CTX-M-10,³⁷⁾ 케냐에서 발견되어 *K. pneumoniae*에 의한 아프리카 최초의 집단 발병의 사례를 남긴 CTX-M-12 그리고 Toho-1등이 여기에 속한다.³⁸⁾ 세 번째 group은 유럽, 북미 및 남미에서 주로 보고되고 있다. 여기에는 브라질에서 발견된 CTX-M-8과 캐나다에서 보고된 CTX-M-25, -26이 있다.³⁹⁾ 네 번째 group은 유럽과 아시아 그리고 남미 일부 지역의 임상검체에서 분리된 것들로 스페인에서 발견된 CTX-M-9와⁴⁰⁾ 중국에서 보고되어 남미의 것과 비슷하나 유럽이나 북미의 것과는 다른 것으로 알려진 CTX-M-13,⁴¹⁾ 브라질에서 보고된 CTX-M-16,⁴²⁾ 베트남에서 발견된 CTX-M-17 등이고,⁴³⁾ 일본에서 발견되어 Toho-1과 76%의 염기서열 상동성을 보인 Toho-2는 primer 고안을 위한 group화에서는 같은 형으로 분류되지 못하였다.⁴⁴⁾

이와 같은 특징들을 이용하여 CTX-M형 ESBL 유전자를 찾기 위한 primer를 고안하였다. 위의 분류를 바탕으로 PCR을 시행한 결과 CTX-M-1F와 CTX-M-1R primer, CTX-M-3F와 CTX-M-3R primer, 및 CTX-M-4F와 CTX-M-4R primer를 이용한 PCR에 양성을 보인 균주는 없었다. CTX-M-2F 및 CTX-M-2R primer에 의한 PCR산물 중 *E. coli* 5주의 산물은 blaCTX-M-3와 일치하였으며, *E. coli* 1주의 산물은 blaCTX-M-15와 일치하였다. 최근 보고가 계속되고 있는 blaCTX-M-3은 1998년 폴란드에서 환자의 가검물에서 채취한 *C. freundii*에서 처음 보고되었으며,³⁵⁾ 최근 중국과 대만, 프랑스, 러시아에서 보고가 있다.²⁸⁻²⁹⁾ blaCTX-M-15는 인도의 한 병원에서 CTX-M-3와 같은 염기서열을 보이거나 position ABL238에서 aspartate가 glycine으로 치환된 양상을 보이는 β -lactamase가 분리된 것을 최초로 해서,⁴⁵⁾ 최근 캐나다, 러시아, 프랑스, 폴란드에서 보고되었다.²⁸⁻³⁰⁾ 최근 CTX-M-3과 CTX-M-15가 동시에 보고되었고,^{29,46)} blaCTX-M-3과 blaCTX-M-15는 염기서열의 상동성을 보이는 점에서 CTX-M형 β -lactamase의 진화 발생에 관한 세밀한 연구가 필요

할 것으로 사료되며, 아미노산이 치환되는 곳으로 알려진 position 240이 일부 TEM/SHV형 ESBLs에서 ceftazidime의 내성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다,⁴⁷⁾ 또한 CTX-M-15가 ceftazidime에 대한 활성이 큰 것으로 보고되어,²³⁾ 항균제에 대한 내성 양상의 변화에도 지속적인 관심을 두어야 할 것으로 생각된다.

국내 서울지역과 제주지역에서 CTX-M-14 β -lactamase이 처음 보고된 이래로 아직 CTX-M ESBL을 생성하는 세균의 보고가 없었다. 본 연구에서 분리된 CTX-M ESBL은 기존의 보고된 것과는 다른 CTX-M-3과 CTX-M-15 β -lactamase로 이미 여러 형태의 CTX-M β -lactamase가 생겨나거나 전파된 것이 의심되며 지역별 차이의 가능성도 배제할 수 없다. 단 한곳의 염기서열 상동성의 차이가 있는 CTX-M-3과 CTX-M-15의 발견으로 국내도 폴란드에서 보고된 것과 같이 이미 CTX-M-3 β -lactamase가 가장 만연되어 있는 가운데 CTX-M-15 β -lactamase가 새로이 보고된 것일 가능성도 있어, 국내에서도 이러한 CTX-M-3, 및 CTX-M-15 β -lactamase의 토착화 가능성에 대한 더 많은 연구가 필요할 것이다. 특히, 최근에 보고되는 CTX-M-15 β -lactamase는 ceftazidime에 대한 활성이 이미 보고된 대부분의 CTX-M ESBL보다 큰 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 ceftazidime에 대한 MIC가 64 mg/L로 다소 높았다. 따라서 이들 CTX-M형 β -lactamase 유전자의 확산으로 β -lactamase 항균제에 새로운 내성 패턴이 나타날 것이 예상되며 이들 CTX-M β -lactamase들에 의한 감염증 치료에 제약이 우려된다. 그러므로 향후 CTX-M β -lactamase에 대한 전국적인 보고를 통해 지역적인 차이와 국내의 토착화 여부를 위한 연구가 추가로 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서 발견된 CTX-M-3 β -lactamase와 CTX-M-15 β -lactamase는 2001년 서울지역에서 보고된 CTX-M-14 β -lactamase와는 유전자 염기서열 상동

성이 낮은 것으로 지역적 차이가 있는 것으로 생각되며 다양한 CTX-M β -lactamase의 출현에 의한 감염증 치료에 제약이 예상되므로 향후 국내의 CTX-M ESBL 발생현황, 토착화 및 내성유전형을 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 정운섭, 이경원, 김현숙, 이삼열 : 최신 진단미생물학. 제3 개정판. 서흥출판사. 2000. 406-407
2. Datta N, Kontomichalou P : Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in enterobacteriaceae. Nature 208 : 239-244, 1965
3. Wyeth-Ayerst research : Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century : Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat 14 : 933-951, 2001
4. Kleibe C, Nies BA, Meyer RM, Tolxdorff-Neutzling, Weidemann B : Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporin. Antimicrob. Agent Chemother 28 : 302-307, 1985
5. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection 11 : 315-317, 1983
6. Phillippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13(Suppl. 1) : 17-29, 1994
7. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13(Suppl. 1) : 2-11, 1994
8. Jacoby GA and Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 35 : 1697-1704, 1991
9. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14 : 933-951, 2001
10. Livermore DM : β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev 8 : 557-584, 1995
11. Sougakoff W, Goussard S, Courvalin P : The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid

- substitutions. *FEMS Microbiol. Lett* 56 : 343-348, 1988
12. Bonnet R, Champs CD, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J : Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 43 : 2671-2677, 1999
13. Tzouvelekis LS, Bonbomo RA : SHV-type- β -lactamase. *Curr. Pharm. Des* 5 : 847-864, 1999
14. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S : A new phlsmidic cefotaximease in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18 : 294-298, 1990
15. Bonnet R, Sampaio LM, Labia R, Champs CD, Sirot D, Chanal C, Sirot J : A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother* 44 : 1936-1942, 2000
16. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ : CTX-M-type β -lactamase : an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agent* 14 : 137-143, 2000
17. Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40 : 509-513, 1996
18. 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*, *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 39 : 3747-3749, 2001
19. Jacoby JA and Han P. Detection of expended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 34 : 908-911, 1996
20. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A : β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother* 46 : 3045-3049, 2002
21. Barthelemy M, Peduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R : Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim. Biophys. Acta* 1122 : 12-22, 2001
22. Huletsky A, Knox JR, Levesque RC : role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *J. Biol. Chem* 268 : 3690-3697, 1993
23. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P : Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob Chemother* 50 : 1031-1034, 2002
24. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G : CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob. Agents Chemother* 42 : 1980-1984, 1998
25. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS : A plasmid-mediated β -lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St. Petersburg, Russia. *J. Antimicrob. Chemother* 41 : 119-121, 1998
26. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H : Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 39 : 2269-2275, 1995
27. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M : Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganism of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother* 46 : 151-159, 2002
28. Eckert C, Gautire V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lamber T, Philippon A, Arlet G : Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother* 48 : 1249-1255, 2004
29. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratachounski L : Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 47 : 3724-3732, 2003
30. Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, Paton S : Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 48 : 1204-1214, 2004

31. Jing-Jou Yan, Wen-Chien Ko, Shu-Huei Tsai, Hsiu-Mei Wu, Ying-Tai Jin, et al. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan. *J Clin Microbiol.* 38 : 4320-4325, 2000
32. Hui Wang, Swathi Kelkar, Weiyuan Wu, Minjun Chen, et al. Clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases : Prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 47 : 790-793, 2003
33. Maria G, Eva T, Sergei V, et al. Sequencing of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4) : Involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 42 : 1259-1262, 1998
34. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18 : 294-298, 1990
35. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland : Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 42 : 827-832, 1998
36. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett.* 201(2) : 237-241, 2001
37. A Oliver, José Claudio Pérez-Díaz, Teresa M. Coque, Fernando Baquero, et al. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 616-620, 2001
38. S. Kariuki, J. E. Corkill, G. Revathi, R. Musoke, and C. A. Hart. Molecular Characterization of a Novel Plasmid-Encoded Cefotaximase (CTX-M-12) Found in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 2141-2143, 2001
39. R. Bonnet, J. L. M. Sampaio, R. Labia, C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, and J. Sirot. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 : 1936-1942, 2000
40. Montserrat Sabaté, Raül Tarragó, Ferran Navarro, Elisenda Miró, Clara Vergés, Jordi Barbé, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 : 1970-1973, 2000
41. Aroonwadee Chanawong, Fatima Hannachi M'Zali, John Heritage, Jian-Hui Xiong, and Peter Michael Hawkey. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* 46 : 630-637, 2002
42. R. Bonnet, C. Dutour, J. L. M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic Efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2245 : 2269-75, 2001
43. Van Cao, Thierry Lambert, and Patrice Courvalin. ColE1-Like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother.* 46 : 1212-1217, 2002
44. Ling Ma, Yoshikazu Ishii, Masaji Ishiguro, Hiroshi Matsuzawa, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a Class A β -Lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 42 : 1181-1186, 1998
45. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P : Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 201 : 237-241, 2001
46. Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, Paton S : Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 48 : 1204-1214, 2004
47. Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M : Cefazidime-hydrolyzing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J. Antimicrob Chemother* 50 : 393-396, 2002
48. Aumeran C, Chanal R, Labia D, Sirot D, Sirot J, Bonnet R : Effects of Ser130Gly and Asp240Lys substitutions in extended-spectrum β -lactamase CTX-M-9. *Antimicrob Agents Chemother* 47 : 2958-2961, 2003