

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

Chang-Ki Kim<sup>1</sup>, Jong Hwa Yum<sup>2</sup>, Dongeun Yong<sup>3,4</sup>,  
Seok Hoon Jeong<sup>3,4</sup>, Kyungwon Lee<sup>3,4</sup>, Yunsop Chong<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, Seoul;

<sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Dong-Eui University College of Natural Science, Busan;

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

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

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

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

M-3 producers had the same genetic environment (*pemK-ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-3</sub>-*orf477-mucA*). An IS903-like element was found downstream of *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. *ISCR1* was identified upstream of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> and *ISCR1* and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> were located on *sul1*-type class 1 integron. The variable region between the 5'-CS and the first 3'-CS contained *dfra16* and *aadA2*. Its structure was similar to that of In60, but our isolates did not have IS3000 or second 3'-CS.

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

**Key Words:** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M, Genetic characteristics

## 서 론

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

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

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

Received 4 February, 2008, Accepted 20 August, 2008

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

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

본 연구에서는 종특이적 염색체성 AmpC -lactamase를 생성하는 *Enterobacteriaceae* 균종을 대상으로 *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자를 검출하고, 이 유전자의 주변 구조를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주수집

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

France)를 이용하였다.

### 2. 항균제 감수성 시험

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

### 3. ESBL 생성시험

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

**Table 1.** Sequences of the primers for *bla* genes and *bla*<sub>CTX-M</sub> genetic environment

Target	Primer name	Primer sequence	Reference
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M 1F	5'-CCGTCACGCTGTTGTTAGG-3'	[27]
	CTX-M 1R	5'-GACGATTTTAGCCGCCGAC-3'	[27]
	CTX-M 2F	5'-CGGTGCTTAAACAGAGCGAG-3'	[27]
	CTX-M 2R	5'-CCATGAATAAGCAGCTGATTGCC-3'	[27]
	CTX-M 8F	5'-ACGCTCAACACCGCGATC-3'	[27]
	CTX-M 8R	5'-CGTGGGTTCTCGGGGATAA-3'	[27]
	CTX-M 9F	5'-GATTGACCGTATTGGGAGTTT-3'	[27]
	CTX-M 9R	5'-CGGCTGGGTAAAATAGGTCA-3'	[27]
	CTXM-3A	5'-CCCATGGTTAAAAATCACT-3'	This study
	CTXM-3B	5'-CCGTTTCCGCTATTACAAAC-3'	This study
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM F	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGT-3'	[27]
	TEM R	5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGA-3'	[27]
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV F	5'-CCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT-3'	[27]
	SHV R	5'-TAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	[27]
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES/IBC F	5'-GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT-3'	[27]
	GES/IBC R	5'-TGTCCTGCTCAGGATGAGT-3'	[27]
<i>bla</i> <sub>VEB</sub>	VEB1-F	5'-ACGAAGAACAATGCACAAGG-3'	This study
	VEB1-R	5'-GAACAGAATCAGTTCCTCCG-3'	This study
orf477	orf477 reverse	5'-ACTTCAAAAATTATGCCACC-3'	[7]
<i>mucA</i>	<i>mucA</i> lower	5'-GGCATCAGGCAGGGGTAAGG-3'	[7]
orf513	orf513	5'-TGGAAGAGGGCGAAGACGAT-3'	[7]
	orf513 rev	5'-GCGTTTTATCGGTAGTCGTC-3'	[7]
3'CS	qacED1	5'-TCGCAACATCCGCATTAATA-3'	[7]
	qacED1 reverse	5'-TTTTAATGCGGATGTTGCCA-3'	[7]
	sulI rev	5'-GCTCAAGAAAAATCCCATCCCC-3'	[7]
ISEcp1	tnpA1 ISEcp1	5'-AATACTACCTTGCTTTCTGA-3'	[7]
	ISEcp1 5	5'-TTCAAAAAGCATAATCAAAGCC-3'	[7]
	ISEcp1 reverse	5'-CAACCACCTTCAATCATTTTT-3'	[7]
IS903	IS903 Rev	5'-CATCATCCAGCCAGAAAAGTT-3'	[7]
	tnpA1 IS903 Rev	5'-CGGTTGTAATCTGTTGTCCA-3'	[7]
<i>pemK</i>	<i>pemK</i> F	5'-AGGGGAAATCTGGCTGTCT-3'	[27]
	<i>pemK</i> R	5'-TCTGTCAAACAATGGGTCA-3'	[27]

에 억제대가 커지면 DDS 양성으로 해석하였다.

4. ESBL 유전자 검출 및 CTX-M 유전자 주변구조 분석

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

CTX-M 유전자의 주변구조는 PCR mapping과 염기서열분석을 통해 분석하였다. *ISEc1*, *IS903* 및 *ISCR1* 등의 *bla*<sub>CTX-M</sub> 주

변 구조를 분석하는데 사용한 시발체는 Table 1과 같다.

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 분석

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

결 과

1. ESBL 생성현황

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

Table 2. Types of ESBL produced by species

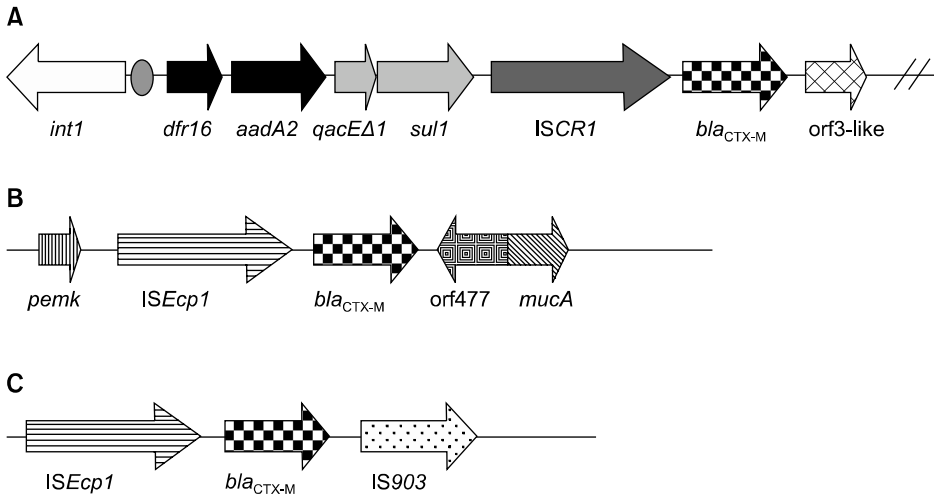
Species (No. tested)	No. (%) of DDS positive	ESBL (No. of isolates)			
		CTX-M type	SHV type	TEM type	Mixed ESBLs
<i>E. aerogenes</i> (50)	6 (12)	-	SHV-12 (3)	TEM-52 (2)	CTX-M-9+SHV-12 (1)
<i>E. cloacae</i> (50)	10 (20)	CTX-M-3 (1), -9 (1)	SHV-12 (3)	-	CTX-M-9+SHV-12 (5)
<i>S. marcescens</i> (50)	8 (16)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

Abbreviation: DDS, double disk synergy.

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

Isolate	Specimen	Ward	CTX-M type	Other β-lactamases	Upstream of <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>		Associated resistances
					<i>ISEc1</i>	<i>ISCR1</i>	
<i>C. freundii</i> 06-5-U664	Urine	Hematology	CTX-M-12	TEM-1	+	-	GEN TOB
<i>C. freundii</i> 06-5-U1734	Urine	Medical ICU	CTX-M-9	-	-	+	AMK GEN NET TOB COT
<i>C. freundii</i> 06-5-P448	Wound	Oncology	CTX-M-3	TEM-1	+	-	AMK GEN NET TOB COT
<i>E. aerogenes</i> 06-6-R756	Sputum	Neurology	CTX-M-9	TEM-1, SHV-12	-	+	GEN NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-2-R1363	Sputum	Cardiosurgery	CTX-M-9	SHV-12	-	+	AMK NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1137	Sputum	Neurology ICU	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R468	Sputum	GI	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1186	Sputum	GI	CTX-M-9	SHV-12	-	+	NET TOB COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-R1124	Sputum	GI	CTX-M-9	-	-	+	AMK GEN NET TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-5-C242	Pleural fluid	CCU	CTX-M-9	SHV-12	-	+	AMK GEN TOB LEV COT TET
<i>E. cloacae</i> 06-4-P445	Wound	Neurosurgery	CTX-M-3	-	+	-	AMK NET TOB LEV COT TET
<i>M. morgani</i> 06-8-P334	Bile	Oncology	CTX-M-14	TEM-1	+	-	
<i>S. marcescens</i> 06-6-R1088	Sputum	Pediatrics	CTX-M-3	-	+	-	AMK GEN NET TOB LEV COT TET
<i>S. marcescens</i> 06-7-B4288	Discharge	ENT	CTX-M-3	-	+	-	AMK GEN NET TOB LEV COT TET

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



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

성하였다.

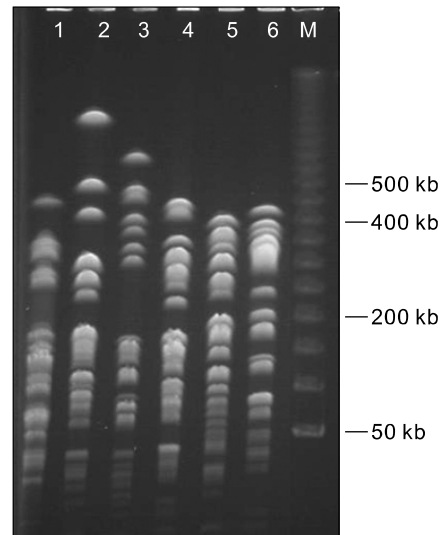
**2. ESBL 유전형 및 CTX-M 생성균주의 항균제 감수성**

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

*bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자를 지닌 14주 중 7주는 levofloxacin, 12주는 cotrimoxazole, 10주는 tetracycline에 내성이었다. 또한 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 유전자를 지닌 *M. morgani*를 제외한 모든 균주가 다양한 aminoglycoside 항균제에 내성이었다(Table 3).

**3. CTX-M 유전자의 주변구조 및 PFGE 분석 결과**

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



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

이 있었으나 integron이나 다른 IS 등의 주변구조는 검출되지 않았다.

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

**고 찰**

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

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

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

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

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

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

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

CTX-M ESBL 생성 균주는 다른 계열 항균제에 내성인 경우

가 많다[9]. Golebiewski 등은 폴란드에서 확산된 plasmid pCTX-M3에 *bla*<sub>CTX-M-3</sub>와 16S rRNA methylase 유전자인 *armA*를 비롯한 여러 내성 유전자가 함께 있었다고 보고하였다[34]. 또한 CTX-M형 ESBL 생성균주 중에는 fluoroquinolone에 대한 내성 비율이 높는데[38], plasmid로 전이되는 quinolone 내성 유전자인 *qnr*이나 *aac(6')-Ib-cr*와 밀접한 연관성이 있음이 알려져 있다[39-41]. 본 연구에서도 CTX-M 생성 균주들은 aminoglycoside와 fluoroquinolone, tetracycline 및 cotrimoxazole 등에 내성인 경우가 많았다. 따라서 *bla*<sub>CTX-M</sub>을 전달하는 plasmid를 분석할 필요가 있으며, 16S rRNA methylase, *qnr* 및 *aac(6')-Ib-cr*에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

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

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 대한임상미생물학회 지원으로 이루어진 것임.

## 참 고 문 헌

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

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

=국문초록=

## 염색체성 AmpC $\beta$ -Lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 균종에서의 CTX-M형 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase 검출과 분자유전학적 특성 규명

<sup>1</sup>대한결핵협회 결핵연구원, <sup>2</sup>동의대학교 자연과학대학 임상병리학과, <sup>3</sup>연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>4</sup>세균내성연구소 김창기<sup>1</sup>, 염종화<sup>2</sup>, 용동은<sup>3,4</sup>, 정석훈<sup>3,4</sup>, 이경원<sup>3,4</sup>, 정윤섭<sup>3,4</sup>

**배경:** 세계 여러 지역에서 CTX-M형 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생성하는 그람음성 간균이 증가하고 있다. 본 연구에서는 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 균종에서 CTX-M형 ESBL유전자를 검출하고, *bla*<sub>CTX-M</sub>의 주변 유전구조를 규명하고자 하였다.

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

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

**결론:** 염색체성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성 *Enterobacteriaceae* 중에 ESBL 생성균주가 흔하였으며 가장 흔한 ESBL형은 SHV-12이었고, 그 다음은 CTX-M-9이었다. CTX-M유전자는 IS*Ecp*I와 연관되거나 complex integron에 존재하였다. [대한임상미생물학회지 2008;11:90-97]

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