

## 한국에서 발생한 플라스미드성 CMY-2 $\beta$ -Lactamase 생성 *Escherichia coli*

이창훈 · 김재석<sup>1</sup> · 어영<sup>2</sup> · 이종욱<sup>3</sup> · 이경원<sup>4</sup> · 송원근<sup>1</sup>

건국대학교 의과대학 진단검사의학교실, 한림대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 연세대학교 원주의과대학 진단검사의학교실<sup>2</sup>,  
건양대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>3</sup>, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>4</sup>

### Emergence of Plasmid-Mediated CMY-2 $\beta$ -Lactamase Produced by Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Korea

Chang-Hoon Lee, M.D., Jae-Seok Kim, M.D.<sup>1</sup>, Young Uh, M.D.<sup>2</sup>, Jongwook Lee, M.D.<sup>3</sup>, Kyungwon Lee, M.D.<sup>4</sup>,  
and Wonkeun Song, M.D.<sup>1</sup>

Department of Laboratory Medicine, Kon Kuk University College of Medicine, Chungju; Hallym University College of Medicine<sup>1</sup>, Seoul; Yonsei University Wonju College of Medicine<sup>2</sup>, Wonju; Konyang University College of Medicine<sup>3</sup>, Daejeon; Yonsei University College of Medicine<sup>4</sup>, Seoul, Korea

**Background** : Of the plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases (ABLs), CMY-2 is the most prevalent and is distributed in many countries. However, little is known about the emergence and characteristics of CMY-2 among *Escherichia coli* isolates in Korea. The aims of this study were to detect the emergence of the CMY-2  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *E. coli* from various regions in Korea.

**Methods** : Eighteen cefoxitin non-susceptible isolates of 1,130 consecutive, nonrepeat isolates of *E. coli* at five university hospitals were tested for antimicrobial susceptibility by the broth microdilution method. The cefoxitin non-susceptible isolates were further investigated by AmpC disk tests, double disk synergy (DDS) tests, isoelectric focusing, CMY-2-specific PCR, DNA sequencing, and plasmid analysis.

**Results** : Seven (0.6%) isolates of plasmid-mediated ABL-producing *E. coli* were found at three of the five hospitals; all seven isolates produced CMY-2  $\beta$ -lactamase and one of the isolates was also tested positive by the DDS test. All isolates demonstrated different plasmid patterns by plasmid analysis.

**Conclusions** : Our data indicate that CMY-2-producing *E. coli* has emerged and is prevalent in the medical institution in Korea. Therefore, constant surveillance is needed to prevent its further spread. (*Korean J Lab Med* 2005; 25: 98-103)

**Key Words** : Plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, *Escherichia coli*, CMY-2

## 서 론

AmpC  $\beta$ -lactamase (ABL)는 extended-spectrum  $\beta$ -lacta-

접 수 : 2004년 11월 4일                      접수번호 : KJLM1810

수정본접수 : 2005년 1월 2일

교신저자 : 송원근

우 150-071 서울시 영등포구 대림1동 948-1

한림대학교 강남성심병원 진단검사의학과

전화 : 02-829-5259, Fax : 02-847-2403

E-mail : swonkeun@hallym.or.kr

\*본 논문은 2002년도 건국대학교 학술연구 지원비에 의한 논문임.

mase (ESBL)와는 달리 broad-spectrum  $\beta$ -lactamase 유도체의 일종이 아니고 Bush group 1, molecular class C에 속하는  $\beta$ -lactamase이다[1]. ABL은  $\beta$ -lactamase 억제제에 내성을 보이고 cephamycin제를 가수분해한다는 점에서 ESBL과 다르다. 이 유전자는 염색체나 플라스미드에 존재한다. 염색체성 ABL은 유도성(inducible)과 구조성(constitutive)이 있는데, 유도성 ABL 생성균주는 보통 저농도로 생성되나 고농도의 유도성 ABL을 생성하기도 한다[2]. *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Ser-*

락 4-5개를 Brain Heart Infusion 액체배지에 풀어서 15분간 10,000×g로 원심분리하여 상층액을 버리고 500 μL 멸균증류수로 재 부유시킨 다음 95°C에서 10분간 가열하여 세포를 파괴시키고 15분간 10,000×g로 원심분리하여 상층액 2 μL를 PCR에 이용하였다. PCR은 최종 부피가 20 μL가 되게 하였다. 각각의 DNA 2 μL에 18 μL의 반응액을 넣었다. PCR 프로그램은 처음 denaturation이 94°C, 5분, 그 다음 cycle은 denaturation 94°C, 30초; annealing 64°C, 30초; extension 72°C, 1분간 25 cycle 시행하고 마지막 extension은 72°C, 7분간으로 하였다. PCR 산물은 1% agarose (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)에 전기영동하여 분석하였다. Gel은 10 μg/mL의 ethidium bromide로 염색하였고 자외선 투사기로 판독하였다. 100-bp DNA ladder (Bioneer, 대전)를 marker로 사용하였다. Table 1의 primer를 이용한 PCR 산물을 이용하여 DNA sequencing을 시행한 후 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)으로 염기서열을 배열하고 분석하였다.

6. 플라스미드 분석

GENE ALL Plasmid SV mini kit (generalbiosystem, 서울)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 2% agarose (Qbiogene Inc.)에 70 volt로 3시간 동안 전기영동을 하였으며, gel의 염색과 분석은 PCR 분석에서와 동일하였다.

결 과

5개 병원에서 2004년 5월에서 7월 사이에 분리된 *E. coli*는

Table 1. Primers used for DNA sequencing

Primer	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	Nucleotide position	GenBank accession no.
CMY-2 LF	CAA CAC GGT GCA AAT CAA AC	484	62-81	X91840
CMY-2 LR	CCT GCC GTA TAG GTG GCT AA	545-526		
CMY-2 RF	GCG TGA AAT CCA GCG TTA TT	518	866-885	X91840
CMY-2 RR	CAT GGG ATT TTC CTT GCT GT	1383-1364		

Table 3. Characteristics of CMY-2 β-lactamase-producing *E. coli* isolates

No. patient	Isolate	Location	Age/Sex	Source	Ward	AD	DDS	β-lactamase bandon IEF	Plasmid profile
1	KN84	Seoul	4/F	Urine	OPD	P	N	5.4, >8.6	P1
2	KN100	Seoul	42/M	Wound	IPD	P	N	>8.6	P2
3	KD123	Seoul	1/F	Urine	IPD	P	N	>8.6	P3
4	KD128	Seoul	4/F	Urine	IPD	P	N	5.4, >8.6	P4
5	CJ4	Chungbuk	64/M	Urine	OPD	P	N	5.4, >8.6	P5
6	CJ6	Chungbuk	70/M	Urine	OPD	P	P	5.4, >8.6	P6
7	CJ7	Chungbuk	75/F	Urine	ICU	P	N	>8.6	P7

Abbreviations: AD, AmpC disk test; DDS, double disk synergy test; IEF, isoelectric focusing; M, male; F, female; IPD, inpatient department; OPD, outpatient department; ICU, intensive care unit; P, positive; N, negative.

1,130주이었다. 그 중 cefoxitin에 비감수성인 균주는 18주(1.6%)이었다. Cefoxitin 비감수성 *E. coli* 중 44%는 중간 내성이었고 56%는 내성이었다. Imipenem에 비감수성인 균주는 없었다. β-lactam제 뿐만 아니라 gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, cotrimoxazole의 감수성률도 낮았다(Table 2).

18주의 cefoxitin 비감수성균주를 대상으로 AmpC disk 시험을 시행한 결과 9주가 양성이었고 9주가 음성이었다. IEF에서는 AmpC disk 시험에 양성이었던 9주 중 7주가 pI >8.6의 밴드를 보였다. pI >8.6의 밴드를 보였던 7주 모두 CMY-2-specific PCR에 양성이었다. DNA sequencing 시행 후 염기서열을 분석한 결과 7주 모두 CMY-2 (GenBank accession number X91840)와 일치하였다. 7주의 CMY-2 생성균주 중 1주(14.3%)가 DDS 시험에도 양성이었다(Table 3).

미량액체배지희석법에 의한 MIC 검사 결과, 7주의 CMY-2 생성균주 모두 cefoxitin의 MIC가 128 μg/mL 이상으로 높았고 ceftazidime보다 aztreonam의 MIC가 모두 낮았다. Cefepime은 1주만 MIC가 높았고 imipenem은 7주 모두 낮았다. β-lactam제가 아닌 aminoglycoside, ciprofloxacin, cotrimoxazole에 대한 내성표현형은 다양한 양상을 보였다(Table 4).

*E. coli* 7주(0.6%)가 ABL 생성균주였고 5개 대상 병원 중 3곳(서울 4주, 충북 3주)에서 분리되었다. ABL 생성균주 중 6주(86%)가 요검체에서 분리되었고 1주가 창상에서 분리되었다. 입

Table 2. Antimicrobial susceptibility (%) of 18 cefoxitin non-susceptible *E. coli* isolates

Antimicrobial agent	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin	11	0	89
Piperacillin-tazobactam	67	22	11
Cephalothin or cefazolin	6	11	83
Cefoxitin	0	44	56
Cefotaxime or ceftriaxone	61	17	22
Cefepime	88	6	6
Aztreonam	61	17	22
Imipenem	100	0	0
Amikacin	100	0	0
Tobramycin	33	29	38
Gentamicin	38	6	56
Ciprofloxacin	11	0	89
Cotrimoxazole	44	0	56

수성이 저하된 경우 플라스미드성 ABL 생성균주일 가능성이 있으나 세포외막의 투과도가 저하된 경우에도 cefoxitin 감수성이 저하되어 플라스미드성 ABL 생성균주의 표현형과 같은 양상을 보이므로 cefoxitin 감수성시험을 이용한 ABL 생성균주의 검출은 특이도가 떨어지게 된다. Coudron 등[20]은 플라스미드성 ABL 생성균주의 선별 기준으로 cefoxitin의 억제대 18 mm 미만, 확인시험으로 3차원 추출시험을 제시하였는데, 3차원 추출 시험은 16주의 플라스미드성 ABL 생성균주 모두와 1주의 비생성균주에서 양성을 보여 유용성이 높다고 보고하였다. 용 등[28]은 플라스미드성 ABL 생성균주의 검출을 위한 변법 Hodge 시험의 유용성을 분석하였는데, 예민도와 특이도가 각각 100%와 94.9%로 나타나, 예민도와 특이도가 각각 100%, 97.4%인 3차원 추출 시험과 비슷한 결과를 보여 변법 Hodge 시험이 간편하고 유용한 선별방법임을 보고하였다. 이번 연구에서는 cefoxitin 비감수성균주를 대상으로 AmpC disk 시험을 시행하였다. Black과 Thomson[11]은 AmpC 디스크 시험의 예민도와 특이도가 각각 100%와 95%로 보고하여, 3차원 추출시험의 효소추출 과정이 생략되고 변법 Hodge 시험에 비해 한 평판배지에서 보다 많은 균주를 시험할 수 있는 AmpC disk 시험도 플라스미드성 ABL 선별검사로 유용함을 알 수 있었다. 그러나 이번 연구에서 예민도는 100%로 좋았으나 특이도는 82%로 낮았는데, 이는 대상균주 수가 적었던 것이 한 원인이 될 수 있을 것으로 생각되었다.

이 연구에서 7주의 플라스미드성 ABL 생성균주는 요검체와 입원환자에서 분리된 것이 각각 86%와 57%로 가장 많았다. 이는 플라스미드성 ABL 생성균주가 요검체(65%)와 입원환자(57%)에서 가장 흔하게 분리되었다고 보고한 스페인[29]의 경우와 유사하였다. 플라스미드 분석에서 3개 병원에서 분리된 7주의 CMY-2 생성 *E. coli*가 모두 다른 양상을 보여 병원 내 전파의 증거는 없었다.

결론적으로, 한국에서도 CMY-2  $\beta$ -lactamase 생성 *E. coli*가 발생되어 유행하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 임상미생물검사실에서는 이에 대한 지속적인 감시를 통해 병원감염의 관리에 많은 주의가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경 :** CMY-2  $\beta$ -lactamase는 플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase (ABL) 중 가장 흔하고 전세계적으로 분포되어 있는 효소이다. 그러나 한국의 경우 CMY-2 생성 *Eschechichia coli*의 발생이나 특성 등에 대한 연구 보고가 드물다. 이에 저자들은 한국의 임상검체에서 분리되는 *E. coli*를 대상으로 CMY-2 생성 균주의 발생 빈도와 분포 등에 대해서 연구하고자 하였다.

**방법 :** 한국의 5개 대학병원에서 분리된 총 1,130주의 *E. coli* 중 18주의 cefoxitin 비감수성 균주를 대상으로 미량액체배지 희석법에 의한 항균제감수성시험을 시행하였고 AmpC disk 시험,

double disk synergy (DDS) 시험, isoelectric focusing, CMY-2-specific PCR, DNA sequencing 및 플라스미드 분석을 시행하였다.

**결과 :** 총 18주(1.6%)가 cefoxitin에 비감수성이었고 이 중 7주(0.6%)가 플라스미드성 ABL 생성균주이었으며 5개 대상 병원 중 3곳에서 ABL 생성균주가 분리되었다. 7주 중 1주는 DDS 시험에도 양성이었다. 7주의 플라스미드성 ABL 생성 *E. coli* 모두 CMY-2형이었다. CMY-2 생성 *E. coli*에 대한 플라스미드 분석 결과 7주 모두 다른 유형으로 나타났다.

**결론 :** CMY-2  $\beta$ -lactamase 생성 *E. coli*가 한국에서 발생되어 유행하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 이에 대한 지속적인 감시가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
2. Sanders CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 573-93.
3. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
4. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
5. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC  $\beta$ -lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998; 39: 520-5.
6. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-9.
7. Perez-Perez FJ and Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153-62.
8. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Epidemiological investigation of blood stream infections by extended spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in a Taiwanese teaching hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3329-32.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7th ed., Approved standard M2-A7. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 12th information-