



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2009 년 2월

석사학위 논문

광주의 한 대학병원에서 3년간 수집된 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 임상 분리주가 함유한 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases 및 AmpC  $\beta$ -lactamases 유전자의 빈도와 분포

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

광주의 한 대학병원에서 3년간 수집된 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 임상 분리주가 함유한 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases 및 AmpC  $\beta$ -lactamases 유전자의 빈도와 분포

Prevalence and distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamases genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from an university hospital in GwangJu for three years

2009 年 2 月

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

Prevalence and distribution of extended  
-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and A  
mpC  $\beta$ -lactamases genes in clinical isol  
ates of *Escherichia coli* and *Klebsiella*  
*pneumoniae* collected from an universit  
y hospital in GwangJu for three years

지도교수 장 숙 진

이 논문을 의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2008年 10月

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 학 민

# 이학민의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	박영진	인
위원	조선대학교 교수	문대수	인
위원	조선대학교 교수	장숙진	인

2008年 11月

조선대학교 대학원

# 목 차

<i>List of tables</i> .....	iii
영문초록.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료와 방법.....	4
1. 균주의 수집.....	4
2. 균주의 동정.....	4
3. 항생제 감수성 검사 .....	4
4. 접합에 의한 내성 전달.....	5
5. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인.....	5
6. Duple-disk synergy tese에 의한 ESBL 확인 검사.....	6
7. <i>Bronic Acid disk</i> tese에 의한 AmpC 확인 검사.....	6
III. 결과 .....	7
1. ESBL 양성률.....	7
2. 항생제 감수성 결과.....	7
3. 접합에 의한 내성 전달.....	7
4. <i>Boronic Acid disk</i> tese에 의한 AmpC 확인 검사.....	7
5. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인 .....	8

IV. 고안 .....10

V. 참고 문헌.....19

# LIST OF TABLES

**Table 1.** Primers used for the detection and sequencing of ESBL genes .....13

**Table 2.** PCR conditions used for the detection of ESBL and AmpC.....14

**Table 3.** Primers used for the detection and sequencing of AmpC  
Multiplex PCR.....15

**Table 4.** Positive rates of ESBL gene-specific PCR of *K. pneumoniae*  
and *E. coli* isolated from an university hospital in GwangJu for  
3years.....16

**Table 5.** Prevalence of ESBL and AmpC  $\beta$ -lactamase genes of *E. coli*  
and *K. pneumoniae*.....17

**Table 6.** Antimicrobial susceptibilities of ESBL-producing *K. pneumoniae*  
with and without concomitant production of PABLs..... 18



## Abstract

Prevalence and distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamases genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from an university hospital in GwangJu for three years

Li Xue Min

Advisor: Prof. Sook Jin Jang Ph.D

Dept of Bio New Drug Development

Graduate School of Chosun University

Background: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are cephalosporinases that confer resistance to a wide variety of oxyiminocephalosporins. Although ESBLs have been reported with increasing frequency in Korea, their prevalence and genotypic distribution in Gwangju area remain unknown. This study was designed to evaluate the occurrence and genotypic distributions of ESBL- and AmpC  $\beta$ -lactamases-producing strains in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from an university hospital in Gwangju for three years.

Methods: we tested the clinical isolates of 350 *E. coli* and 240 *K. pneumoniae* at an university hospital in Gwang-Ju during the period from Sep 2005 to Aug 2008. Antimicrobial susceptibility test and ESBL production test was performed by Vitek-II system. Searches for ESBL genes and AmpC  $\beta$ -lactamases genes were performed by PCR amplification using plasmid DNA. The transferability of resistance wa

s examined by conjugation.

Results: The result of Vitek-II system showed 46 (13.1%) of 350 *E. coli* and 54 (22.5%) of 240 *K. pneumoniae* isolates were ESBL-producers. The plasmid DNA of ESBL-positive strains showed positive reaction for ESBL gene PCR assay in all (100%) of 54 strains of *K. pneumoniae* and 18 (39%) of 46 strains of *E. coli*. Major ESBL types in the plasmid DNA of 54 *K. pneumoniae* strains were TEM (98.1%) and SHV (96.3%). Those of 18 ESBL-positive *E. coli* strains were TEM (77.8%), CTX (27.8%), and SHV (11.1%). Yearly prevalence of CTX gene in *K. pneumoniae* and those of SHV, TEM, and CTX gene in *E. coli* were changed considerably during the study period. Twenty-nine (53.7%) of 54 samples of *K. pneumoniae* plasmid DNA were DHA-1 PCR positive and one (2.2%) of 46 samples of *E. coli* plasmid DNA were CMY-2 PCR positive in AmpC  $\beta$ -lactamases PCR analysis. Most *K. pneumoniae* strains simultaneously contained multiple ESBL gene, 75.9% had TEM and SHV and 18.5% had TEM, SHV and CTX. In contrast, only 22.2% of *E. coli* simultaneously contained multiple ESBL genes. Ten (55.6%) of 18 strains of *E. coli* contained TEM only. The ceftazidime or cefotaxime resistance of the ESBL-producers was transferred to azide-resistant *E. coli* J53 by conjugation in 41 (89.1%) of 46 *E. coli* and 38 (70.4%) of 54 *K. pneumoniae* isolates.

Conclusion: Because the yearly prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains and types of prevalent ESBL genes were changed, it seemed necessary to follow up the prevalence of ESBL genes to cope rapidly to the increase of multi-resistant ESBL producers.

# I. 서 론

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases 생성균주는 penicillin, 협범위 및 광범위 cephalsporin과 monobactam 등 carbapenem을 제외한  $\beta$ -lactam계 항생제 대부분에 내성이고 aminoglycoside, trimethoprim-sulfamethoxazole 등 다른 계열의 항생제에도 다제 내성인 경우가 많다. ESBL 생성균주로 감염되면 마땅한 치료약제를 선택하기 어렵고 환자의 입원기간이 길어지기 때문에 ESBL 생성주는 병원의 환자 진료뿐만 아니라 국민 건강 보건의 측면에서도 중요한 균이다. 이들의 빈도와 유전형에 대해 그 변화추이를 파악하는 것은 환자 진료와 보건 정책을 수립하는데 중요한 기초적인 자료를 제공해줄 수 있다.[1]

AmpC  $\beta$ -lactamases는 oxyimino- and 7- $\alpha$ -methoxy-cephalosporins.에 대한 내성을 부여하며 cefepime과 cefpirome에 대해 ESBL 보다 활성이 낮고  $\beta$ -lactamase 저해제에 의해 저해되지 않는다. 이들은 Enterobacter, Citrobacter, Serratia and Pseudomonas와 같은 세균의 염색체에 자연적으로 존재하였는데 최근 이 AmpC 효소가 plasmid에 들어가 자연적으로 chromosomal AmpC가 결합되어 있는 Klebsiella나, Salmonella, Proteus mirabilis 세균들에서 검출되는 경우가 증가되고 있다. 최근 국내의 ESBL 생성주에서도 AmpC  $\beta$ -lactamases가 함께 나오는 경우가 보고되고 있다.

국내의 ESBL 생성주에 대해서는 여러 연구가 진행되어 왔으며 ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 균의 빈도와 유전형에 대해 한국의 전반적인 현황을 파악한 연구들은 보고되어 왔으나, 한 병원에서 다년간 검체를 대상으로 그 변화추이를 추적한 논문은 거의 없다. 본 연구에서는 광주광역시의 한 대학 병원에서 3년간 분리된 *E. coli*와 *K.pneumoniae* 균주에 대하여 ESBL 및 AmpC  $\beta$ -lactamases 유전자의 생성률과 유전형의 분포를 조사하고 그 변화추이를 살펴보려고 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집

2005년 9월부터 2008년 8월까지 조선대학교병원 진단검사의학과 미생물 검사실에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 각각 350주와 240주를 무작위적으로 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집 대상에서 제외하였다.

### 2. 균주의 동정

균주의 동정은 Vitek II ID-GPI Kit (BioMerieux, Durham, NC, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 즉, 혈액한천배지에 2회 계대배양 후 균 집락을 0.45% 식염수에 부유한 후 Vitek densicheck에서 0.5 McFarland에 맞추고 Vitek filling stands 및 sealer plug를 이용하여 ID-GPI 카드에 분주하였다. 카드를 Reader/Incubator에 넣어서 반응시켰다.

### 3. 항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Vitek II system을 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 즉, 혈액한천배지에 2회 계대배양 후 균 집락을 0.45% 식염수에 부유한 후 Vitek AST-N017 혹은 N022 kit (BioMerieux, Durham, NC, USA)를 이용하여 시행하였다. 반응이 끝나면 Vitek II의 Advanced Expert System software version (VT2-R03.01)에 의해 판독된 결과를 얻었다. 항생제 감수성 검사결과와 ESBL 양성률은 Vitek II 결과에서 나온 자료로 분석하였다.

#### 4. 접합에 의한 내성 전달

Azide에 내성인 *E. coli* J53을 내성 수여자로 사용하였으며, Jacoby 및 Han의 방법[2]을 참조하여 시험하였다. 내성 공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (Difco, Cockeysville, MI, USA) 액체 배지에 접종하여서 3시간 진탕 배양하였다. 공여자 배양액 0.2 mL와 수여자 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37°C로 1시간 배양 후, cefotaxime 8 µg/mL와 azide 100 µg/mL가 함유된 MacConkey 한천과 ceftazidime 8 µg/mL와 azide 100 µg/mL가 함유된 MacConkey 한천에 접종하였다. 37°C에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선별하였다.

#### 5. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인

ESBL 및 AmpC β-lactamases 유전자를 찾기 위해서 여러 가지 PCR을 진행하였다(Table 1). Plasmid Extraction Kit (BioNeer, 대전, 한국)를 사용하여 세균의 plasmid DNA를 추출하였다. plasmid DNA에 오염되어 있는 Chromosome DNA를 제거하기 위하여 Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase kit (Biotchnologies, USA)를 사용하였다. 10X Taq buffer (2.5 uL), 10 mM dNTP mix (0.5 uL), primer 각 10 pmol, 0.7U Taq DNA polymerase (SolGent Co, Korea) 및 증류수를 혼합하여 20 uL의 PCR 반응액을 만들었다. 각 유전자의 PCR은 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Co, Norwalk, CT, USA)으로 Table 2와 같은 조건으로 시행하였다. AmpC Multiplex PCR도 논문에 보고된 조건을 따라 시행하였다(Table 3)[18]. 각각의 PCR 산물을 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel의 홈에 넣고 30분간 전기영동하여 띠를 확인하였다. PCR 산물의 내성 유전자형을 염기서열분석으로 확인하기 위해 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 와 ABI PRISM 3730 DNA analyzer (PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하는 Solgent회사 (Solgent Co, Daejeon, Korea)에 직접 염기서열분석을 의뢰하였다.

## 6. Double-disk synergy test에 의한 ESBL 확인검사

Double-disk synergy test 법으로 class A ESBL 생성하는 균주를 선별하였다[3]. 세균 부유 액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천 (Difco, Cockeysville, M D, USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 ceftazidime 30  $\mu$ g 디스크, 주 위에는 amoxicillin-clavulanic acid (20/10  $\mu$ g), imipenem (30  $\mu$ g) 및 cefoxitin (30  $\mu$ g, BBL) 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 15 mm가 되게 하였다. GES/IBC, PER, VEB 등 일부 non-TEM, non-SHV ESBL 은 clavulanic acid뿐 아니라 cefoxitin 혹은 imipenem에 의해서 활성이 억제되 기 때문에 이들 디스크 모두를 사용하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기 에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 ESBL 생성 양성으로 판정하였다.

## 7. Boronic Acid disk test에 의한 AmpC 확인시험

Boronic Acid disk test 법으로 AmpC 생성하는 균주를 선별하였다.[17] Amp C를 생성하는 균주는 cefoxitin 감수성 시험에서 내성 또는 중간을 나타내는 특 성이 있기 때문에 cefoxitin (30  $\mu$ g, BBL) 디스크만 사용하였다. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 cefoxitin 30  $\mu$ g 디스크, 주위에는 3-aminophenylboronic acid (Sigma, St. Louis, MO, U SA) 20mL를 첨가한 cefoxitin (30  $\mu$ g, BBL) 디스크를 놓았다. 두 디스크의 가 장자리 간격은 15mm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18 시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 3-aminophenylboronic acid를 첨가한 디스 크의 억제대가 첨가하지 않은 디스크의 억제대보다 5mm이상 더 생성되면 Am pC 생성 양성으로 판정하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. ESBL 양성률

각 균종별로 ESBL 양성률을 살펴보면 *E. coli*는 350주 중 46주 (13.1%)가, *K. pneumoniae* 240주 중 54주 (22.5%)가 양성이었다. 중환자실, 병동, 외래에서 ESBL 생성 균주의 분리율은 각각 61%, 29%, 10%로 중환자실에서 분리율이 훨씬 높음을 볼 수 있었다.

#### 2. 항생제 감수성 결과

전체 조사 대상 균의 항생제 감수성 결과를 보면 ampicillin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime 및 cefepime에 대한 *E. coli* 350주의 내성률은 각각 97.8%, 23.8%, 9.6%, 11.27% 및 7.3%이었고, *K. pneumoniae* 240주의 내성률은 각각 100%, 31.3%, 18.9%, 13.6% 및 12.5%이었다. 분리된 균주는 모두 imipenem에 감수성이었다.

#### 3. 접합에 의한 내성 전달

ESBL 양성인 *E. coli* 46주 중 41주 (89.1%)와 *K. pneumoniae* 54주 중 38주 (70.4%)에서 cefotaxime이나 ceftazidime에 대한 내성이 *E. coli* J53으로 전달되었다. 나머지 균주에서는 3회 이상 반복된 시험에서도 내성이 전달되지 않았다.

#### 4. Boronic acid disk test에 의한 AmpC 확인시험

Boronic acid disk test 법으로 *E. coli* 46주 중 14주 (30.4%)와 *K. pneumoniae* 54주 중 20주 (37.0%)가 AmpC 생성 균주로 확인되었다.

## 5. 분자생물학적 방법에 의한 내성 유전형 확인

Vitek-II system으로 검출된 ESBL 양성 균에서 plasmid DNA를 추출하여 ESBL gene PCR을 한 결과 *K. pneumoniae*는 54 주 모두 양성 결과를 보였고 *E. coli*는 46주중 18주 (39%)가 양성 결과를 보였다(Table 4).

*K. pneumoniae* 54주의 주된 ESBL 유전형은 TEM (98.1%)과 SHV (96.3%)이고 CTX (18.5%)이 그 다음 순이었다. 대부분의 *K. pneumoniae* 균주들은 복수의 ESBL 유전자를 함께 보유하고 있어서 54주중 41주 (75.9%)가 TEM과 SHV를 함께 가졌고, 10주 (18.5%)가 TEM과 SHV, CTX를 함께 가지고 있었다. ESBL gene PCR에 양성인 *E. coli* 18 주의 주된 ESBL 유전형은 TEM (77.8%), CTX (27.8%), SHV (11.1%) 이었다. *K. pneumoniae*와 대조적으로 *E. coli*는 18주중 4주 (22.2%)만 복수의 ESBL 유전자를 함께 보유하고 있었다. 이중 CTX와 TEM이 함께 나온 형이 3주이고 CTX와 SHV이 함께 나온 형이 1주였다(Table 5). PER 유전자는 2006년에 *K. pneumoniae* 1주에서만 검출되었다. VEB 유전자 PCR에 양성인 균주는 하나도 없었다.

보유한 ESBL 유전형의 연도별 변화 추이를 살펴보면 *K. pneumoniae*의 경우 4년간 SHV와 TEM은 높은 양성률이 지속되었고 CTX는 2006년도에 양성률이 가장 높았고 2007년, 2008년에는 양성률이 점차 떨어지는 것을 볼 수 있다. *E. coli*의 경우 4년간 CTX와 TEM의 양성률이 2005년에 가장 높고 2006년부터 2008년까지 큰 변화가 없이 비슷한 수치를 나타내고 있다(Table 4).

ESBL 생성균주들이 plasmid성 AmpC  $\beta$ -lactamases를 함께 보유하고 있는지 조사하기 위해 AmpC  $\beta$ -lactamases PCR 검사를 시행한 결과 *K. pneumoniae* 54주중 29주 (53.7%)에서 DHA-1 PCR 양성이었고, *E. coli*는 1주 (2.2%)에서 CMY-2 PCR 양성이었다. ESBL과 AmpC  $\beta$ -lactamases를 함께 보유한 *K. pneumoniae* 균주들 중 ESBL 유전형별로 AmpC  $\beta$ -lactamases 유전자의 분포를 함께 살펴보면 TEM과 SHV이 함께 나온 41주중 26주 (63.4%)와, TEM과 SHV, CTX형이 함께 나온 10주중 2 (20%)주, 그리고 SHV가 단독으로 나온 1주에서 DHA-1형이 함께 나왔다 (Table 5). ESBL 생성 *E. coli* 균주들 중 AmpC  $\beta$ -lactamases 유전자 PCR에 함께 양성인 경우는 드물어서 TEM이 단독



으로 나온 1주에서만 CMY-2가 함께 나왔다.

ESBL-양성 *K. pneumoniae* 균주들의 항생제 감수성 검사결과를 PABL 양성균과 음성균의 두 군으로 나누어 비교해 보면 PABL 양성균과 음성균의 cefoxitin에 대한 내성률이 각각 95%와 35.3%로 큰 차이를 보이는 반면 cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem에 대한 내성률은 두 군 간에 큰 차이가 없었다(Table 6).

## IV. 고 안

$\beta$ -lactam 항생제는 세균 감염증 치료에 가장 널리 사용되고 있는 항생제로, 전 세계에서 사용되는 항균제의 50% 정도를 차지한다. 그람음성 세균에 임상적 효용성이 있는 ampicillin이 도입된 이후,  $\beta$ -lactam 항균제는 그람음성 세균에 의한 감염증 치료에 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나 항균제 사용량이 늘어날수록 내성 세균도 증가하는 부작용이 나타나, 내성 세균의 치료를 위하여 보다 강력한 항균제를 개발해야 하는 악순환이 되풀이되어 왔다.  $\beta$ -lactamase가 penicillin제와 협범위 cephalosporin제의 효과를 억제하게 됨에 따라 1980년대 초에 새로운 제2세대 cephalosporin제가 개발되어  $\beta$ -lactam 항생제에 내성인 균주에 대하여 임상적으로 사용되었다. 1983년 독일에서 cefotaxime에 내성인 균주가 처음 보고되었고, 이후 ESBL 생성 균은 세계적으로 다양한 유전형이 보고되어왔다.[1]

국내 여러 병원에서 조사된 임상 분리 주종 ESBL 생성균의 빈도와 유형을 살펴 보면 박 등[4]은 *E. coli*의 9%, *K. pneumoniae*의 30%가, 이 등[5]은 *E. coli*의 10.4%, *K. pneumoniae*의 25.0%가 ESBL 생성균이라고 보고하였다. 본 연구에서 검사한 *E. coli*의 13.1%, *K. pneumoniae*의 22.5%가 ESBL 생성 균이어서 전국적인 보고와 비슷한 결과를 보였다.

ESBL 생성 균이 분리된 장소 중 특히 중환자실과 일반 병동에 초점을 두어 그 분리빈도를 비교 분석한 연구를 보면 Pena 등[7]은 중환자실에서 분리된 균주의 40%, 일반 병동의 16%가 ESBL 생성 균이라고 보고하였고, Kolar 등[8]도 각각 38.9%, 13.1%로 보고하였다. 본 연구결과를 보면 중환자실의 61%, 일반병동의 29%가

ESBL 생성 균이다. 중환자실의 분리 빈도가 일반 병동보다 두 배 이상 높다는 결과는 중환자실에서 3세대 cephalosporin, 특히 cefotaxime과 ceftazidime을

빈번하게 사용하기 때문이라고 추측할 수 있다.

국내의 연구결과를 살펴보면 cefotaxime, ceftazidime에 대한 내성이 *E. coli*는 각각 7.3%, 11.1%이고 *K. pneumoniae*는 각각 19.0%, 14.6%이라고 하였다 [6]. 본 연구에서는 cefotaxime, ceftazidime에 대한 내성이 *E. coli*는 각각 11.2%, 9.6%이고 *K. pneumoniae*는 각각 13.6%, 18.9%로 국내 보고와 비슷하였다.

ESBL-양성 *K. pneumoniae* 균주들 중 PABL을 동시에 보유한 균들과 그렇지 않은 균들의 항생제 감수성 검사 결과를 비교해 보았을 때 PABL 동시 보유 균이 비보유 균에 비해 cefoxitin에 대한 내성률이 훨씬 높고 다른 항생제에 대한 내성률은 두 균 간에 큰 차이가 없었던 점은 염 등의 보고와 비슷하였다 [20].

ESBL 유전형에 관한 국내의 보고들을 보면, 1996년 서울지역에서 *E. coli*에서는 TEM-52가, *K. pneumoniae*에서는 SHV-12가 가장 흔하다고 하였고[9], 1996년 서울지역에서 *K. pneumoniae*에서는 SHV-2a, SHV-12가 흔하다고 하였다[10]. 1999년 서울지역에서 *E. coli*에서는 TEM-52, SHV-12, SHV-2a 순으로 많았고, *K. pneumoniae*에서는 TEM-52, SHV-2a, SHV-12 순으로 많았다고 보고하였다[11]. 그러나 2003년 대구에서 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 한 연구에서 CTX-M과 SHV-12가 가장 흔하다고 보고하였고[12], 2003년 서울에서[6], 2003년 대구에서[13] *E. coli*에서는 CTX-M이, *K. pneumoniae*에서는 SHV-12과 CTX-M이 가장 흔하다고 보고하였다. 이를 종합해 보면 2000년 이전에는 TEM과 SHV가 주된 유형으로 분리된 반면 2003년부터는 CTX-M이 가장 흔했다는 보고가 많았으나 본 연구에서 *E. coli*에서는 TEM 다음으로 CTX가 많았고, *K. pneumoniae*에서는 TEM과 SHV 다음으로 CTX가 많아 광주 지역의 ESBL 유전형 분포는 최근의 전국적인 분포와 유행하는 유전자의 빈도 순에서 약간 차이점을 보였다. 이와 같이 균의 분리 시기나 지역적으로 유전형의 분포가 서로 다르기 때문에 지역별로 유전형의 변화추이를 주기적으로 감시

할 필요가 있다고 보인다.

본 연구에서 2007년 *K. pneumoniae* 검체에서 PER-1 양성을 나타내는 검체를 하나 발견하였다. 이 검체는 TEM, SHV 및 CTX를 동시에 양성으로 나타내고 있다. 국내 다른 보고를 살펴보면 2004년 부산지역의 연구에서는 *Acinetobacter baumannii* 검체에서 PER-1 양성을 발견하였고[14], *K. pneumoniae* 검체에서 PER-1 양성을 발견한 보고는 아직 없었다.

AmpC를 동시에 생성하는 ESBL의 유전형을 살펴보면 *K. pneumoniae*의 경우 TEM과 SHV가 함께 나온 41주중 26주에서 DHA-1과 함께 나온 것이 가장 흔하고 TEM, SHV과 CTX가 함께 나온 10주중 2주에서 DHA-1과 함께 나왔고 SHV가 단독으로 나온 1주에서 DHA-1과 함께 나왔다. *E. coli*의 경우 TEM이 단독으로 나온 1주에서 CMY-2이 함께 나왔다. 2003년 국내의 보고를 살펴보면 *K. pneumoniae*의 경우 DHA이 가장 흔하고 *E. coli*의 경우 CMY이 가장 흔하다[19]는 다른 지역과 유사한 소견으로 보였다.

결론적으로 4년간 ESBL 양성 균의 빈도와 그 유전형을 비교해 보면 연도별로 차이를 보이기 때문에 그 발생 추이를 추적하다가 갑자기 증가할 때는 돌발 감염 등 여러 가능성을 타진해보고 상응하는 원인에 맞는 대응책을 조기에 수립하여 다제내성 균의 확산을 조기 진화할 수 있도록 지속적으로 ESBL 양성 균의 빈도와 유전형의 변화 추이를 감시할 필요가 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Primers used for the detection and sequencing of ESBL genes

Primer name	Target gene	Primer sequence (5`-3`)	Product size	Reference
TEM-F	blaTEM	AGAGTATGAGTATTCAACATT	837bp	14
TEM-R		ATCTCAGCGATCTGTCTAT		
SHV-F	blaSHV	GGGTTATTCTTATTTGTCGCT	929bp	14
SHV-R		TAGCGTTGCCAGTGCTCG		
CTX-F	blaCTX	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856bp	15
CTX-R		ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
PER-F	blaPER	TGACGATCTGGAACCTTT	750bp	16
PER-R		AACTGCATAACCTACTCC		
VEB-F	blaVEB	GATAGGAGTACAGACATATG	913bp	17
VEB-R		TTTATTCAAATAGTAATTCCACG		
DHA-F	blaDHA	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405bp	18
DHA-R		CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
CMY-1-F	blaCMY1	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520bp	18
CMY-1-R		CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
CMY-2-F	blaCMY2	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp	18
CMY-2-R		TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		

*Table 2. PCR conditions used for the detection of ESBL and AmpC*

*β-lactamases genes*

<i>Target gene</i>	<i>PCR conditions</i>
<i>blaTEM</i>	<i>Denaturation for 5 min at 94°C 30cycles of 94°C for 45s, 54°C for 45s, 72°C for 45s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaSHV</i>	<i>Denaturation for 5 min at 94°C 30cycles of 94°C for 45s, 53°C for 45s, 72°C for 45s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaCTX</i>	<i>Denaturation for 5 min at 94°C 30cycles of 94°C for 45s, 61°C for 45s, 72°C for 45s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaPER</i>	<i>Denaturation for 5 min at 94°C 30cycles of 94°C for 45s, 54°C for 45s, 72°C for 45s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaVEB</i>	<i>Denaturation for 5 min at 94°C 30cycles of 94°C for 45s, 45°C for 45s, 72°C for 45s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaDHA</i>	<i>Denaturation for 15 min at 95°C 35cycles of 95°C for 30s, 64°C for 30s, 72°C for 60s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>blaCMY</i>	<i>Denaturation for 15 min at 95°C 35cycles of 95°C for 30s, 64°C for 30s, 72°C for 60s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>
<i>AmpCMultiple</i> <i>x</i>	<i>Denaturation for 3 min at 94°C 25cycles of 94°C for 30s, 64°C for 30s, 72°C for 60s; andfinal extension of 72°C for 7min.</i>

Table 3. Primers used for the detection and sequencing of AmpC Multiplex PCR

<i>Primer name</i>	<i>Target gene</i>	<i>Primer sequence (5'-3')</i>	<i>Product size</i>	<i>Reference</i>
<i>MOX-MF</i>	<i>MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11</i>	<i>GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT</i>	<i>520bp</i>	<i>18</i>
<i>MOX-MR</i>		<i>CACATTGACATAGGTGTGGTGC</i>		
<i>CIT-MF</i>	<i>LAT-1 to LAT-4, BIL-1, CMY-2 to CMY-7</i>	<i>TGGCCAGAACTGACAGGCAAA</i>	<i>462bp</i>	<i>18</i>
<i>CIT-MR</i>		<i>TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC</i>		
<i>DHA-MF</i>	<i>DHA-1, DHA-2</i>	<i>AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT</i>	<i>405bp</i>	<i>18</i>
<i>DHA-MR</i>		<i>CCGTACGCATACTGGCTTTGC</i>		
<i>ACC-MF</i>	<i>ACC</i>	<i>AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA</i>	<i>346bp</i>	<i>18</i>
<i>ACC-MR</i>		<i>TTCGCCGCAAT ATCCCTAGC</i>		
<i>EBC-MF</i>	<i>MIR-1T ACT-1</i>	<i>TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG</i>	<i>302bp</i>	<i>18</i>
<i>EBC-MR</i>		<i>CTTCCA CTGCGGCTGCCAGTT</i>		
<i>FOX-MF</i>	<i>FOX-1 to FOX-5b</i>	<i>AACATGGGGTATCAGGGAGATG</i>	<i>190bp</i>	<i>18</i>
<i>FOX-MR</i>		<i>CAAAGCGCGTAACCGGATTGG</i>		

Table 4. Positive rates of ESBL gene-specific PCR of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolated from an university hospital in GwangJu for 3 years

<i>mycetoma</i>	year	No iso lat es	SHV	TEM	CTX	PER	VEB	AmpC Multiple x	DHA	CMY -1	CM Y-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2005	2	100	100	0	0	0	50.0	50.0	0	0
	2006	7	100	100	57.1	14.3	0	28.6	28.6	0	0
	2007	29	93.1	97	17.2	0	0	75.9	75.9	0	0
	2008	16	100	100	6.3	0	0	25.0	25.0	0	0
	total	54	96.3	98.1	18.5	1.9	0	53.7	53.7	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2005	1	0	100	100	0	0	0	0	0	0
	2006	7	0	14.3	14.3	0	0	0	0	0	0
	2007	29	6.9	34.5	10.3	0	0	3	0	0	3
	2008	9	0	22.2	11.1	0	0	0	0	0	0
	total	46	4.3	30.4	10.9	0	0	2.2	0	0	2.2



Table 5. Prevalence of ESBL and AmpC  $\beta$ -lactamase genes of *E. coli* and *K. pneumoniae*

	types	CTX- M	SHV	TEM	DHA	CMY	N.of isolates	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I			p			2	3.7
	II		p		p		1	1.85
	III		p	p			15	27.8
	IV		p	p	p		26	48.1
	V	p	p	p			8	14.8
	VI	p	p	p	p		2	3.7
	Subtotal						54	100
<i>Escherichia coli</i>	I		p				1	5.55
	II	p					2	11.1
	III			p			10	18.5
	IV			p		p	1	5.55
	V	p	p				1	5.55
	VI	p		p			3	16.7
	Subtotal						18	100

*Table 6. Antimicrobial susceptibilities of ESBL-producing K. pneumoniae with and without concomitant production of PABLs*

ESBL-producing strains (No. of isolates)	Antimicrobial agent	MIC(mg/L)			Susceptibility %		
		Range	50%	90%	Susceptible	Intermediate	Resistant
PABL positive (20)	Ceftazidime	>=64	>=64	>=64	0	0	100
	Cefotaxime	4- >=64	8	>=64	55	15	30
	Cefoxitin	<=4- >=64	>=64	>=64	5	0	95
	Cefepime	<=1- >=64	<=1	16	85	5	10
	Imipenem	<=1	<=1	<=1	100	0	0
PABL negative (34)	Ceftazidime	2- >=64	>=64	>=64	23.5	2.9	73.5
	Cefotaxime	<=1- >=64	16	>=64	44.1	5.9	50
	Cefoxitin	<=1- >=64	<=4	>=64	64.7	0	35.3
	Cefepime	<=1- >=64	<=1	>=64	91.2	0	8.8
	Imipenem	<=1	<=1	<=1	100	0	0

## V. 참 고 문 헌

1. Ko CS, Sung JY, Koo SH, Kwon GC, Shin SY, Park JW. prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Daejeon. Korea J Lab Med 2007;27:344-350.

(고지선, 성지연, 구선희, 권계철, 신소연, 박종우 등. 대전지역에서 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 현황. 대한진단검사의학회지 2007;27:344-350.)

2. Jacoby GA and Han P. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996;34:908-911.

3. Bouthors, A,-T., N. Dagoueau, s. Blanchard, T. Nass, P. Nordmann, V. Jarlier, and W. Sougakoff. 1998. Role of residues 104, 164, 166, 238, 240 in the substrate profile of PER-1  $\beta$ -lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins. Biochem. J. 330:1443-1449

4. 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.

(박정호, 이상희, 정석훈, 김빛나, 김경보, 윤종득 등. 전국 주요병원에서 분리된 *Escherichia coli* 와 *Klebsiella pneumoniae*의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 현황과 특성. 대한진단검사의학회지 2003;23:18-24

5. Lee JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong GH, Woo GJ, Lee JW, 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;7:111-118.

(이정현, 배일권, 권수봉, 정석훈, 우건조, 이종욱 등. 국내에서 2003년에 분리된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 CTX-M형 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 현황. 대한임상미생물학회지 2004;7:111-118.)

6. Kang JH, Bae IK, Kwon SB, Jeong SH, Lee WG, et al. Prevalence of Ambler Class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. Korean J Clin Microbiol 2005;8:17-25.

(강지혜, 배일권, 권수봉, 정석훈, 이종욱, 이위교등. Ambler Class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 국내 분리현황. 대한임상미생물학회지 2005;8:17-25.)

7. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:53-58.

8. Kolar M, Latal T, Cermak P, Bartonikova N, Chmelarova E, Sauer P, et al. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. Int J Antimicrob A

gents 2006;28:49-53.

9. Pal HJ. The characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Korean isolates of *Enterobacteriaceae*. Yonsei Med J 1998;39:514-519.

10. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT.  
Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J Clin Microbiol 1998;36:1446-1449.

11. Hong SG, Kang MS, Choi JR, Lee KW, Chong YS, Kwon OH.  
Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Korean J Clin Pathol 2001;21:495-504.

(홍성근, 강명서, 최종락, 이경원, 정윤섭, 권오현. 임상검체에서 분리된 *Enterobacteriaceae* 균종의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases 유형 및 분자역학적 특성. 대한임상병리학회지 2001;21:495-504.)

12. Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y, Lee JC, Seol SY, et al.  
CTX-M and SHV-12  $\beta$ -lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. FEMS Microbiol Lett 2005;245:93-98.

13. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum

m  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. J Antimicrob Chemother 2005;56:698-702.

14. Lim YM, Shin KS, Kim JM.

Distinct Antimicrobial Resistance Patterns and Antimicrobial Resistance-Harboring Genes According to Genomic Species of *Acinetobacter* Isolates. J Clin Microbiol 2007;902-905.

15. Machado E, Canton R, Baquero F, Galan JC, Rollan A, Peixe L, Coque TM. Integron content of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1823-1829

16. De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, Plaidy A, Boyer M, Carroy E, Gbadamassi MC, Laluque S, Oules O, Poupard MC, Villemain M, Sitor J. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. J Antimicrob Chemother. 2004 Sep;54(3):634-639. Epub 2004 Jul 28.

17. Pastern F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, Vazquez M, Procopio A, Tokumoto M, Cagnoni V. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep;50(9):3222-3224.

18. Perez-Perez FJ, Hanson ND.

Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):2153-2162.

19. Lee K, Lee M, Shin JH, Lee MH, Kang SH, Park AJ, Yong D, Chong Y. Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. Microb Drug Resist. 2006 Spring;12(1):44-49

20. Yum JH, Kim SY, Lee HM, Yong DE, Lee KW, Cho SN, Chong YS. Emergence and Wide Dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2- and DHA-1-type AmpC  $\beta$ -lactamases in Korea Respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Korea J Med 2005;20:961-965.

## 감사의 글

언제나 끝은 새로운 시작을 의미합니다. 석사과정 2년이란 시간이 너무나 빨리 흘러갔습니다. 짧지만 의의 있는 시간에 많은 것을 배울 수 있고, 연구할 수 있게 무한한 사랑, 도움과 배려를 주신 많은 분들께 감사의 인사를 올리려고 이 글을 쓰게 됩니다.

석사과정 2년 동안 연구와 생활 방방면면에서 여러모로 사랑과 배려, 그리고 가르침을 아낌없이 주신 장숙진 교수님께 진심으로 되는 감사를 드립니다. 평소에도 항상 옆에서 지켜봐주신 바이오신약개발학과의 최철희 교수님, 임성철 교수님, 신성희 교수님, 연구 활동에 크나큰 도움을 주신 치과대학 생화학교실의 국중기 교수님, 유소영 박사님, 박숙낭 박사님, 김민정 박사님, 더욱 좋은 논문이 되시라고 열심히 심사해주시고 좋은 조언을 많이 해주신 주신 박영진 교수님, 문대수 교수님께 감사의 인사 올립니다. 하루의 스승은 평생의 스승으로 스승님들의 건강과 행복을 항상 기원하겠습니다.

이국타향에서 2년 동안 지냈지만 외롭지 않았습니니다. 만나면 항상 해맑은 미소를 지어주시면서 도움을 주신 조선대병원 조춘배 선생님, 조성식 선생님, 이병설 선생님, 박건 교수님, 오혜룡 선생님, 한 실험실에서 매일 웃음으로 지겨운 실험을 달래주었던 가네스 박사님, 김형선씨, 이유미씨, 한다미씨, 박미선씨, 떠나면 곳에서 만난 김동춘 박사님을 비롯한 연변대학 의학대학의 여러 선후배들, 같이 뛰면서 땀 흘리고 웃으면서 지내왔던 화광축구팀의 여러 친구들, 앞으로 무한한 발전이 있기를 기원합니다.

저를 오늘까지 사랑해주시고 키워주시고 믿어주었던 부모님, 할아버지, 할머니, . 다 큰 자식이 아직도 효도하기는 커녕 근심 걱정만 남긴 것을 항상 부끄럽게 생각하고 있습니다. 항상 건강하시고 좋은 일만 있기를 기원합니다.

학위논문을 마무리 지으면서

2008. 12. 05



## 저작물 이용 허락서

학 과	바이오신약개발 학과	학 번	20077720	과 정	석사
성 명	한글: 이학민                      한문 :李學民    영문 : Li Xue Min				
주 소	광주 광역시 동구 서석동 375번지 조선대학교 의과대학 1101실험실				
연락처	E-MAIL : lixuemin11@hanmail.net				
논문 제목	<b>한글:</b> 광주의 한 대학병원에서 3년간 수집된 <i>E. coli</i> 및 <i>K. pneumoniae</i> 임상 분리주가 함유한 Extended-Spectrum β-Lactamases 및 AmpC β-lactamases 유전자의 빈도와 분포				
	<b>영문:</b> Prevalence and distribution of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC β-lactamases genes in clinical isolates of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> collected from an university hospital in GwangJu for three years				

본인이 저작권 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다                      음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(  )    반대(  )

2009년    2    월                      일

저작자:    이   학   민                      (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하