



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

석사학위논문

동물 유래 대장균 및 살모넬라의
extended-spectrum β -lactamase
유형 조사

제주대학교 대학원

수의학과

김 형 준

2016월 2월

동물 유래 대장균 및 살모넬라의
extended-spectrum β -lactamase
유형 조사

지도교수 손 원 근

김 형 준

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2015년 12월

김형준의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2015년 12월

Production of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from animals

Presented by Hyung-Jun Kim
Supervised by Wongeun Son

Department of Veterinary Medicine,
Graduate School,
Jeju National University

Antimicrobial resistance is getting worldwide concern to rapid increase in multi-drug-resistant Gram negative bacteria. The increases of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are the most problem in the fulfillment of infectious disease control. Although the definition of ESBLs is not decided by mutual consent, they are commonly used β -lactamases hydrolyzing first, second and third generation cephalosporins and aztreonam and which are inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid. ESBL-producing enteric bacteria such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are a crucial problem in clinical practices. They are generally resistant to various common antibiotics thus limiting treatment decisions. This thesis presents work done on the ESBL producing *E. coli* and *Salmonella* spp. from various diseased and normal animal in Jeju, including some *Salmonella* spp. obtained outside of Jeju.

Most bacterial isolates were originated from animals such as pigs, chickens, horses etc. and only 8 *Salmonella* spp. from people. Total 119 *Salmonella* spp. and 77 *E. coli* were used in this study. ESBLs were identified by double-disk synergy test, PCR, and gene sequencing. *Salmonella* spp. do not have any ESBL genes but 34 strains have TEM genes of β -lactamase

regarding of the hydrolysis of ampicillin. *E. coli* producing ESBLs were 4 strains and they have TEM (1 strain), both TEM and CTX-M14 (2 strains), and TEM and CTX-M65 (1 strain), respectively. Those *E. coli* strains were originated from diarrheal calves and foal. This study indicates that the prevalence of ESBL-producing *Salmonella* spp. and *E. coli* might be less common in Jeju .

Keyword : *Salmonella* spp. *Escherichia coli*, Extended spectrum β -lactamase, TEM, CTX-M14, CTX-M65

목 차

영 문 초 록

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결 과	9
IV. 고 찰	19
V. 결 론	23
VI. 참고문헌	24
한 글 초 록	36

I. 서 론

β -lactam 항생제는 1929년 플레밍이 penicillin을 발견하면서 개발되기 시작하였다. 천연 penicillin은 그람양성균에 우수한 효과를 나타내지만 ampicillin의 도입 이후 그람 음성 세균의 치료에도 광범위하게 사용되고 있다[3]. 화학 구조에 따라서 β -lactam 항생제는 penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams 의 4가지 그룹으로 나눌 수 있다[34]. 이 항생제들은 공통으로 β -lactam 링을 가지고, 두 번째 고리의 구조에 따라 그룹이 나누어진다[64].

Cephalosporins 계열 항생제의 종류는 1세대가 cefazolin, cephalothin, cephapirin, cephalexin, cefadroxil, cephadrine 2세대가 cefamandole, cefuroxime, cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, cefaclor, cefprozil, cefpodoxime, loracarbef, 3세대가 cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftazidime, cefoperazone, cefixime 4세대가 cefipime, 5세대가 ceftaroline, ceftobiprole 등이다[14,18,23,63].

β -lactam 계열의 항생제는 폐렴, 비뇨기계 감염, 패혈증 등에서 흔히 사용하는 항생제이면서 수술 전 예방적 항생제로도 많이 사용한다[29]. 따라서 이들 항생제에 대한 내성균의 출현이 감염성 질환의 치료에 막대한 어려움을 초래한다. β -lactam 항생제에 대한 내성은 세균이 생성하는 β -lactam 분해효소에 의해 일어나며 첫 β -lactamase는 의료현장에서 penicillin이 사용되기 이전에 이미 *Escherichia (E) coli*에서 동정되었다[10]. 대부분의 그람음성세균은 염색체 매개 β -lactamase 유전자를 선천적으로 보유한다. 이는 환경 속에서 발견되는 토양 미생물에서 생성되는 β -lactam에 의해 가해진 선택적 압박에 기인한다[30]. 현재 까지 그람음성균들이 생성하는 다양한 β -lactamase가 알려져 있으며 내성범위에 따라 broad-spectrum β -lactamase (TEM-, SHV-, OXA-family), extended-spectrum β -lactamase (ESBL; TEM family, SHV family), AmpC (ACC-, ACT-, CFE-, CMY family, DHA-FOX family, LAT family, MIR-, MOX-), Carbapenemase (IMP family, VIM family, GIM-, SPM-, KPC-) 등으로 분류한다. 이 중 ESBL은 더욱 복잡하여 β -lactam 계열 항생제 이외의 계열에

도 다제내성을 나타내어 병원내 감염을 포함한 감염증의 치료의 효율을 저하시켜 사회적인 문제가 커지고 있다. ESBL의 정의를 공식적으로 협의하여 정한 바는 없지만, 일반적으로 penicillin, 1세대에서 3세대 cephalosporin과 aztreonam에 대하여 내성을 일으키는 β -lactamase로 통용된다. 이들은 clavulanic acid와 같은 β -lactamase 억제제에 의해서는 억제되는 특성이 있다[19,37].

첫 plasmid 매개 β -lactamase는 1965년 그리스의 Temoniera라는 환자로부터 분리된 *E. coli*에서 발견되었고 그 때부터 TEM이라고 명명되었다[27]. 이 분리 균주 이후 몇 년 이내에 다양한 plasmid 위에 존재하고 transposon과의 연관성이 있어 다른 세균으로 TEM-1 쉽게 전파되어 왔다. 실제로 TEM-1은 전세계에 퍼져있고 지금은 장내세균과의 여러 균종에서 발견되고[61], 그람음성 세균에서 가장 흔히 볼 수 있는 β -lactamase 이다[37]. ESBL이라 할 수 없는 TEM-1은 oxacillin, carbenicillin, 혹은 cephalothin보다 훨씬 더 강력하게 ampicillin을 가수분해시키면서 ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime 등과 같은 extended spectrum cephalosporins은 가수분해시킬 수 없다[61]. TEM-2는 TEM-1과 동일한 가수분해력을 가지지만 훨씬 능동적 promoter를 가지고 있으며 TEM-1의 등전점(isoelectric point)이 5.4인 것에 비해 TEM-2는 5.6이다[40]. TEM-13은 TEM-1과 TEM-2와 비슷한 가수분해력을 가진다. TEM-1, 2, 13은 모두 ESBL은 아니지만 현재 TEM-1과 TEM-2의 유도체인 TEM type의 ESBL들은 100개 이상인 것으로 알려져 있다[50]. 국내에서도 조 등 [8,9] 과 박 등[56] 이 하천, 도축장, 돼지의 분변 등에서 TEM을 발견하여 보고한 적이 있다.

다른 흔한 plasmid 매개 β -lactamase는 *Klebsiella* (K) spp와 *E. coli*에서 발견되는 SHV-1 (Sulfhydryl-variable active site에서 명명)이다. Extended-spectrum cephalosporins를 가수분해시키는 β -lactamase를 암호화하는 plasmid는 1983년에 처음으로 보고되었다[20]. 독일에서 분리된 *K. ozaenae* 분리주가 β -lactamase SHV-2를 보유하고었는데 이는 cefotaxime을 효과적으로, 정도는 덜하지만 ceftazidime을 효과적으로 가수분해시킬 수 있었다[36]. SHV는 어느 다른 type의 ESBL 보다도 더 자주 임상 분리주에서 발견되곤 하는 데 특히 광범위한 범주의 장내세균과에서 검출되어 왔다. SHV 생성 *Pseudomonas* (P) spp와 *Acinetobacter* spp에 의한 질병이 발생보고된 적도 있다[53]. TEM-type β

-lactamases와 달리 SHV-1 유도체는 50개 이상정도로 알려져 있다[58].

CTX-M은 1989년 독일의 Munich 지역의 4개월령 어린이의 비루에서 분리한 *E coli*에서 처음으로 보고되었으며 cefotaximase의 약자 CTX와 Munich의 M을 연결한 용어이다. 이 유형의 ESBL은 ceftazidime보다는 cefotaxime을 더 잘 가수분해시키고 또한 고효율로 cefepime을 가수분해시킨다[11,12]. Tazobactam은 sulbactam과 clavulanate 보다 CTX-M의 억제 효과를 더 잘 나타낸다[59]. 오늘날에는 100개 이상의 CTX-M type의 ESBL이 보고되어 있으며, 이들 ESBL은 장내세균과의 많은 균종 및 *P aeruginosa*에서 전 세계적으로 보고되고 있다[62]. 이들 효소에 대한 유전자는 일반적으로 7-260 kb 크기의 범위에 속하는 plasmids 내에 위치한다[15]. Plasmids는 *Kluyvera* spp의 염색체 유전자로부터 획득되어졌다[35]. 현재까지 113개 이상의 CTX-M type들이 알려져 있고[50] 세계에서 가장 흔한 ESBL type일 것으로 믿고 있다[15]. 국내에서도 애완견, 도축장에서 분리한 세균, 병성감정 의뢰된 닭의 장기, 하천, 사람 등에서 분리한 세균에서 CTX-M이 확인된 바 있다[2,4,8,9,24,43]

이번 연구에서 국내 다양한 동물로부터 분리된 *Salmonella* spp.와 *E coli*의 항생제 내성유형을 분석하고 ESBL을 생성하는 균주의 비율을 조사하였으며, ESBL의 종류 및 유전자 염기서열을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시균주

공시균주는 2002년부터 제주대학교 부속 동물병원, 수의병리학 실험실, 제주도 내 동물병원에서 제주대학교 수의세균학 교실로 의뢰된 돼지, 말, 개, 소의 분변, 화농성 병변, 뇨 등에서 분리되어 초저온 냉동고에 보존되어 있었다. 총 196 균주 중 *Salmonella* spp. 는 119균주로서 돼지의 정상 분변에서 분리한 69 균주, 병성감정 시 돼지의 소장에서 분리한 5균주, 말의 설사분변 9균주와 관절액에서 분리한 1균주가 사용되었으며, 닭의 도체표면 유래 27균주와 사람의 정상분변 유래 8균주는 경상대학교 수의과대학으로부터 분양받았다(Table 1).

Table 1. *Salmonella* spp used in this study

Host	Samples	No. of <i>Salmonella</i> spp.
Chicken	Carcass	27
	Diarrheal feces	9
Equine	Joint fluid	1
Human	Normal feces	8
	Normal feces	69
Pig	Small intestine	5
	Total	119

총 196 균주 중 *E. coli* 는 77균주였으며 송아지 설사변 유래 11균주, 정상돼지 분변유래 46균주, 말의 각종 병변 시료 유래 9균주, 개의 각종병변 유래 11 균주 였다(Table 2).

Table 2. *Escherichia coli* used in this study

Host	Samples	No. of <i>E. coli</i>
Calf	Diarrheal feces	11
Dogs	Genital infections	4
	Uninary infections	4
	Respiratory infections	2
	Asite fluid	1
Equine	Pus of kidney	1
	Pus of lung	2
	Diarrheal feces	4
	Asite fluid	1
	Joint fluid	1
Pig	Normal feces	46
	Total	77

2. 항생제 감수성 검사

공시균주를 대상으로 Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI)의 기준에 따라 디스크 확산법으로 항생제 감수성 검사를 실시하였다[13]. 순수분리하여 초저온 냉동고에 보관 중이던 세균을 Muller-Hinton agar (MHA; Difco,

USA)에 계대배양하고 필요시에는 선택배지에 도말하여 *Salmonella* spp. 인지 *E. coli* 인지를 다시 확인하였다. 세균의 농도는 McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)의 혼탁도와 동일하게 조정된 후, 멸균된 면봉을 이용하여 MHA (Difco, USA)에 도말 접종하였다. 접종 후 10분 이내에 항생제 디스크를 dispenser로 접종하고 37°C에서 16~18시간 배양하였다. 항생제 감수성 유무는 디스크 주위에 형성된 증식 억제대의 크기를 측정하여 확인하였다.

항생제 디스크는 BBL (USA)사와 Oxoid (UK)사에서 구입한 amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, ampicillin, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, norfloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, cefazolin, chloramphenicol, streptomycin 을 사용하였다. 항생제 감수성 여부는 각각의 제조회사에서 제시한 감수성 판정 기준을 따랐다.

3. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성시험

ESBL 생성균주의 표현형 검사는 CLSI의 방법에 준한 Double-disk synergy test (DDST)를 활용하였다. 항생제 감수성 검사법에서와 동일한 방법으로 균주를 접종한 후 MHA 배지의 중간에 amoxicillin-clavulanic acid (AMC ; 20 ug-10ug, Oxoid) 디스크를 놓고 외측으로 20 mm가 되는 곳에 30 μ g의 cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), imipenem (IPM) 디스크 를 놓고 37°C에서 18시간 배양한 후 AMC 디스크 와 각 디스크 사이에 상승작용을 나타내는 억제대의 확장현상 (enhanced zone of inhibition)을 관찰하였다.

4. ESBL typing

ESBL 유전자를 확인하기 위하여 Dalenne 등[26]이 보고한 primer (Table 3)를 이용한 multiplex PCR을 시행하였다. 평판배지에서 배양된 균 집락을 채취하여

증류수에 희석하여 95℃에서 10분간 중탕하여 원심분리한 후 PCR 실험을 위한 DNA 로 사용하였다. PCR은 I-StarTaq Maxime PCR PreMix Kit (Qiagen, Germany)에 temple DNA 2 ul, primer를 넣고 진행하였다. 유전자증폭기 (PC-818, ASTEC)를 이용하여 다음과 같이 증폭하였다. 94℃ 10분간 denaturation ; 94℃ 40초간, 60℃ 40초간, 72℃ 1분간을 30 cycles 실시하였으며 마지막으로 elongation 을 72℃ 7분간 수행했다. PCR product는 2% agarose gel에서 100 V, 30 분간 전기영동 후 ethidium bromide (0.5 ug/mL)로 염색하여 UV light 하에서 확인하였다[28]. 유전자의 염기서열분석을 위하여 PCR 반응 산물을 정제한 후, 솔젠트(Solgent, Korea)에 의뢰하였다.

Table 3. PCR primers to detect extended-spectrum β -lactamase*

PCR name	b-Lactamase(s) targeted	Primer name	Sequence (5' - 3')	Length (bases)	Amplicon size(bp)	Primer concentration (pmol/mL)	
Multiplex I TEM,SHVand OXA-1-like	TEM variants including TEM-1 and TEM-2	mTSO-Tf	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	22	800	0.4	
		mTSO-Tr	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	22		0.4	
	SHV variants including SHV-1	mTSO-Sf	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	21	713	0.4	
		mTSO-Sr	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	21		0.4	
	OXA-1, OXA-4 and OXA-30		mTSO-Of	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	22	564	0.4
			mTSO-Or	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	22		0.4
Multiplex II CTX-M group1, group2 and group9	variants of CTX-M group 1 including CTX-M-1,CTX-M-3andCTX-M-15	mCTXMGp1f	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b	20	688	0.4	
		mCTXMGp1-2r	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	21		0.2	
	variants of CTX-M group 2 including CTX-M-2	mCTXGP2f	CGTTAACGGCACGATGAC	18	404	0.2	
		mCTXMGp1-2r	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	21		0.2	
	variants of CTX-M group 9 including CTX-M-9 and CTX-M-14	mCTXMGp9f	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	19	561	0.4	
	mCTXMGp9r	TGATTCTCGCCGCTGAAG	18	0.4			
CTX-M group 8/25	CTX-M-8,CTX-M-25,CTX-M-26 and CTX-M-39 to CTX-M-41	CTXMgf	AACRCRCAGACGCTCTAC ^b	18	326	0.4	
		CTXMGr	TCGAGCCGGAASGTGTYAT ^b	19		0.4	

* Published by Dalenne et al (2010)

Ⅲ. 결 과

1. 항생제 내성 양상

공시한 살모넬라의 119 균주는 대부분의 항생제에 높은 감수성을 나타내었으나 tetracycline에 대하여 69.7%가 내성을 나타내었으며, ampicillin과 nalidixic acid에 대하여 28.6%가 내성을 나타내었다. 3세대 cephalosporins 중 cefotaxime에 대하여 2균주가 내성을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Antimicrobial resistance rate of 119 *Salmonella* spp. isolated from livestock and human

Antimicrobials	No. of <i>Salmonella</i> spp.(%)		
	R	I	S
Amoxillin/clavulanic acid (AMC)	3 (2.5)	3 (2.5)	113 (95.0)
Cefotaxime (CTX)	2 (1.7)	7 (5.9)	110 (92.4)
Ceftazidime (CAZ)	0 (0.0)	0 (0.0)	119 (100.0)
Ceftriaxone (CRO)	0 (0.0)	1 (0.0)	118 (99.2)
Imipenem (IPM)	0 (0.0)	0 (0.0)	119 (100.0)
Ampicillin (AMP)	34 (28.6)	16 (13.4)	69 (56.0)
Ciprofloxacin (CIP)	0 (0.0)	1 (0.8)	118 (99.2)
Gentamycin (GM)	19 (16.0)	4 (3.4)	96 (80.8)
Nalidixic acid (NA)	34 (28.6)	11 (9.2)	74 (62.2)
Norfloxacin (NOR)	1 (0.8)	0 (0.0)	118 (99.2)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	27 (22.7)	2 (1.7)	90 (75.6)
Tetracycline (TE)	83 (69.7)	4 (3.4)	32 (26.9)

R, Resistant; I, intermediate; S, Susceptible

공시한 *E. coli* 77 균주는 전반적으로 살모넬라에 비하여 높은 내성을 나타내었으며, 특히 tetracycline에 대하여 76.6%, ampicillin에 대하여 72.7%의 균이 내성을 나타내었고, streptomycin, chloramphenicol, gentamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해서도 50% 이상의 균이 내성을 보였다. 또한 3세대 cephalosporin 중 cefotaxime, ceftriaxone에 대해서도 각각 2균주 및 3균주가 내성을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Antimicrobial resistance rate of 77 *E. coli* isolated from livestock

Antimicrobials	Number of isolates of <i>E.coli</i> (%)		
	R	I	S
Amoxillin/clavulanic acid (AMC)	2 (2.6)	12 (15.6)	63 (81.8)
Cefotaxime (CTX)	2 (2.6)	2 (2.6)	73 (94.8)
Ceftazidime (CAZ)	0 (0.0)	2 (2.6)	75 (97.4)
Ceftriaxone (CRO)	3 (3.9)	1 (1.3)	73 (94.8)
Ampicillin (AMP)	56 (72.7)	6 (7.8)	15 (19.5)
Ciprofloxacin (CIP)	12 (15.6)	5 (6.5)	60 (77.9)
Gentamycin (GM)	39 (50.6)	2 (2.6)	36 (46.8)
Nalidixic acid (NA)	33 (42.9)	4 (5.2)	40 (51.9)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	39 (50.6)	0 (0.0)	38 (49.4)
Cifazolin (CZ)	28 (36.4)	1 (1.3)	48 (62.3)
Chloramphenicol (C)	40 (51.9)	3 (3.9)	34 (44.2)
Streptomycin (S)	51 (66.2)	10 (13.0)	16 (20.8)
Tetracycline (TE)	59 (76.6)	7 (9.1)	11 (14.3)

R : Resistant, I : intermediate, S : Susceptible

2. ESBL 생성균주의 검출

ESBL 생성균주의 표현형을 DDST로 검사한 결과 119 살모넬라 균주에서는 ESBL로 보이는 균이 없었으며 *E. coli*의 경우 4균주가 AMC 디스크와 CTX, CAZ 또는 CRO 디스크 사이에 억제대가 증가하는 양상을 나타내었다. 송아지 설사에서 분리한 *E. coli* B12G3에서는 CTX, CAZ, CRO와 AMC 사이에서 모두 억제대의 확장 현상을 관찰할 수 있었고(Fig 1A), 말의 분변에서 분리한 *E. coli* B32A9에서는 CTX, CRO와 AMC 사이에서 억제대의 확장현상을 관찰할 수 있었다(Fig 1B). 송아지 설사변에서 분리한 또 다른 *E. coli* B1H6i와 B1H6o는 한 개체에서 분리하였으나 B1H6i는 MacConkey agar 상에서 점액성이 강하였으며, B1H6o는 상대적으로 건조한 집락을 형성하였다. *E. coli* B1H6i는 CTX 및 CAZ와 AMC 사이에 확장현상이 있었고, CRO에는 내성을 나타내었으나 확장현상은 없었다(Fig 1C). 이에 비하여 *E. coli* B1H6o는 CTX와 CRO에 내성은 보였으나 어떠한 확장현상은 관찰되지 않았다(Fig 1D).

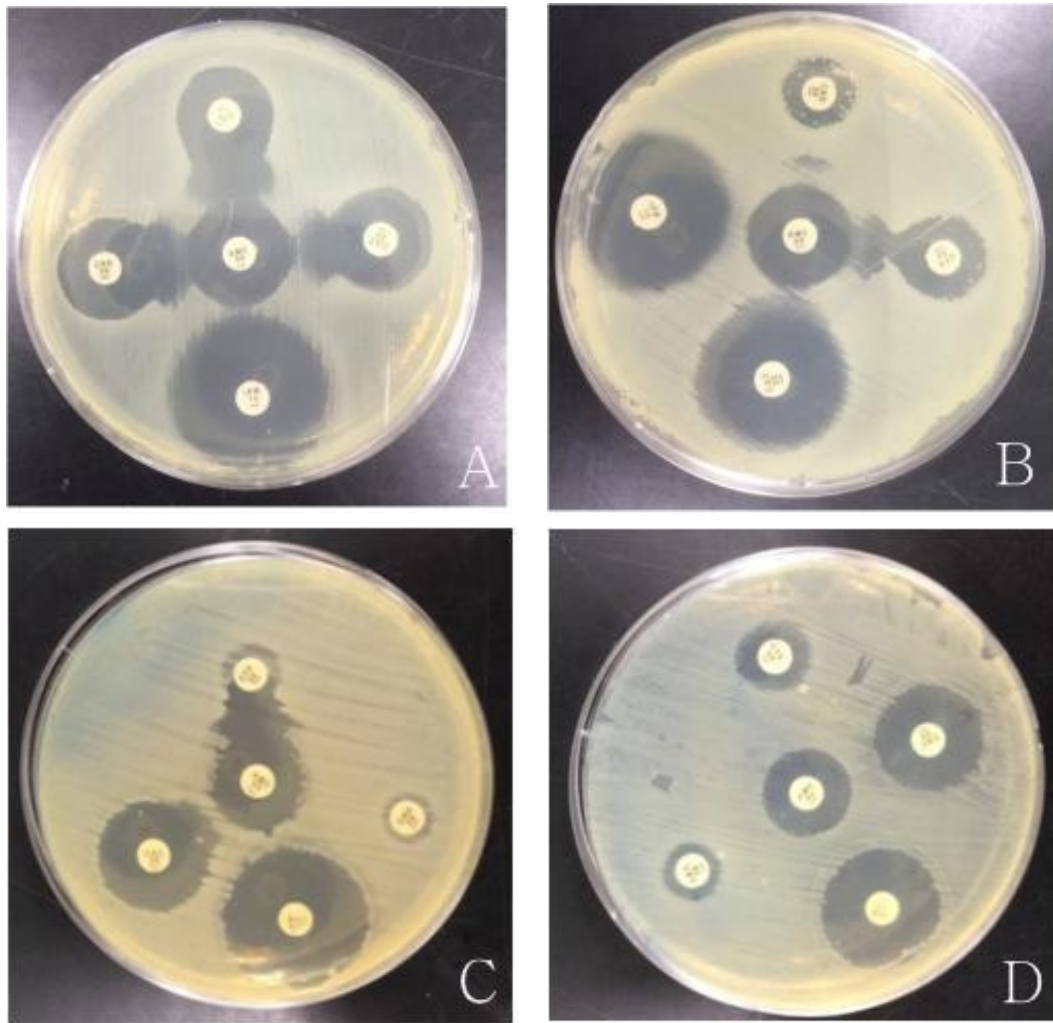


Fig. 1. ESBL phenotypes in double disk diffusion test using amoxicillin/clavulanic acid disk and 3rd generation cephalosporins such as cefoxitin, cefotaxime, and ceftriaxone. A, *E. coli* B12G3 from calf diarrhea; B, *E. coli* B32A9 from foal diarrhea; C, *E. coli* B1H6i from calf diarrhea; D, *E. coli* B1H6o from calf diarrhea

3. ESBL 유전자 검출

ESBL 표현형 검사인 DDST에서 양성을 보인 *Salmonella* spp.가 전혀 검출되지 않았다. 항생제 감수성 검사에서 ampicillin에 내성을 보인 34 균주는 모두 800 bp 크기의 PCR 산물이 증폭되어 TEM 계열의 β -lactamase를 생성하는 것으로 판단하였다(Fig 2)

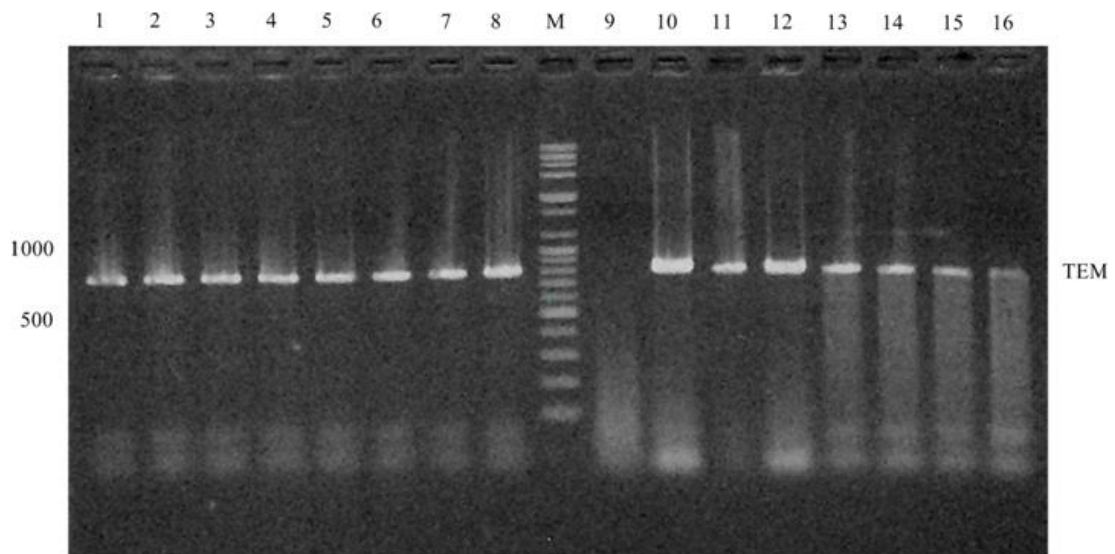


Fig. 2. Representative PCR products of 34 ampicillin-resistant *Salmonella* spp. by multiplex PCR assay for the *bla*TEM/*bla*SHV/*bla*OXA-like genes. Lanes 1, *Salmonella* C2; 2, *Salmonella* C76; 3, *Salmonella* C121; 4, *Salmonella* B6A1; 5, *Salmonella* B6A2; 6, *Salmonella* B6C2; 7, *Salmonella* B2F3; 8, positive control *E. coli* B12G3; 9, negative control (no template DNA); 10, *Salmonella* B2G3; 11, *Salmonella* B2G4 ; 12, *Salmonella* B2G5 ; 13, *Salmonella* B22G2 ; 14, *Salmonella* B22G3 ; 15, *Salmonella* B22G4 ; 16, *Salmonella* B22G5.

DDST에서 양성을 나타내었거나 3세대 cephalosporins에 대해 내성을 나타낸 *E. coli* 균주를 대상으로 ESBL 유전자를 검출하였다. *E. coli* B12G3에서 800 bp에서 분획이 확인되어 TEM 유전자가 검출되었고, *E. coli* B32A9에서는 800 bp와 561 bp에서 분획이 확인되어 TEM 유전자와 CTX-M 유전자를 확인할 수 있

었다. *E. coli* B1H6i 와 B1H6o 에서도 800 bp 와 561 bp에서 분획이 확인되어 TEM 유전자와 CTX-M 유전자를 확인할 수 있었다(Fig 3).

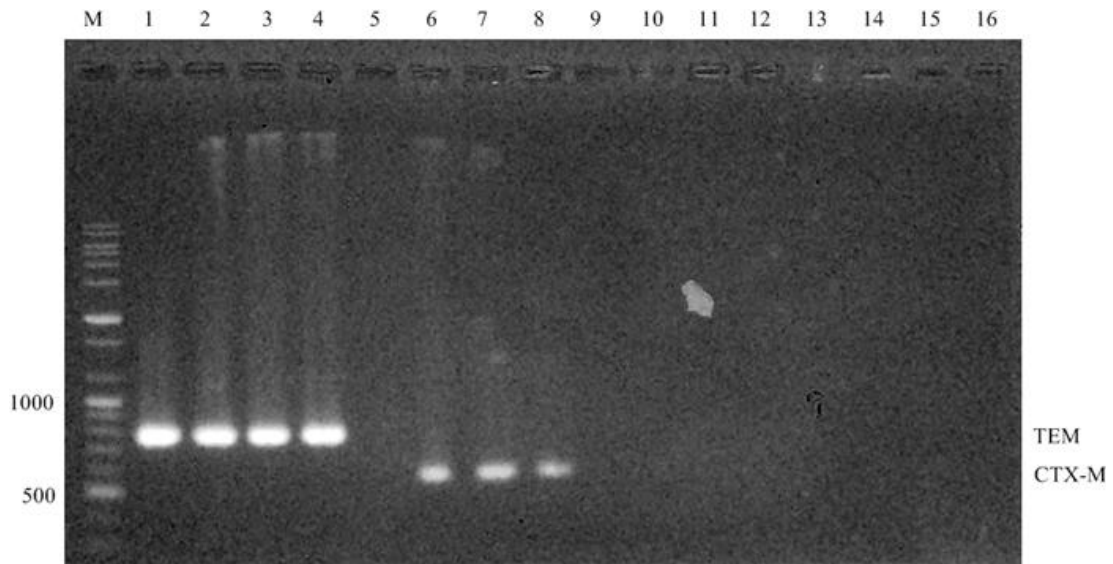


Fig 3. Multiplex PCR assay for the *bla*TEM/*bla*SHV/*bla*OXA-like genes, including phylogenetic group 1, group 2 and group 9, amplification from *Escherichia coli* strains: Lanes: 1 and 5, *E. coli* B12G3 ; 2 and 6, *E. coli* B32A9 ; 3 and 7, *E. coli* B1H6i; 4 and 8, *E. coli* B1H6o. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel.

4. ESBL 의 염기서열분석

Salmonella spp에서는 표현형적으로 ESBL이 아닌 일반 β -lactamase로 보이는 TEM만이 PCR에서 증폭되었기 때문에 염기서열을 분석하지는 않았다. 표현형적으로 ESBL로 확인된 *E. coli* 4균주에서 증폭된 TEM과 CTX-family에 해당하는 PCR 산물을 염기서열 분석한 결과 *E. coli* B12G3, B32A9, B1H6i 및 B1H6o의 TEM은 모두 *Klebsiella* sp. (gbKR676527), *E. coli* (gbKR024806), *Serratia marcescens* (gbCP012686), *Acinetobacter* sp. (gbKP890824), *Enterobacter cloacae* (gbCP012169), *Citrobacter freundii* (gbCP011656), *Kluyvera intermedia* (gbCP011601) 등의 균이 보유하고 있는 염기서열과 99%이상의 상동성을 나타내어 *bla*TEM 유전자인 것으로 확인되었다(Fig. 4).

```

Query 11  ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA 70
          |
          |
Sbjct 985  ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA 926

Query 71  CGCTCACYGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA 130
          |
          |
Sbjct 925  CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA 866

Query 131  AGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA 190
          |
          |
Sbjct 865  AGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA 806

Query 191  GTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCRCTCGTG 250
          |
          |
Sbjct 805  GTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCACTCGTG 746

Query 251  GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTGAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGA 310
          |
          |
Sbjct 745  GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTGAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGA 686

Query 311  GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT 370
          |
          |
Sbjct 685  GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT 626

Query 371  GTCAGAAGTAAGTTGGCMCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCT 430
          |
          |
Sbjct 625  GTCAGAAGTAAGTTGGCAGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCT 566

Query 431  CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTYAACCAAGTCA 490
          |
          |
Sbjct 565  CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTYAACCAAGTCA 506

Query 491  TTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCACCAGTGTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAT 550
          |
          |
Sbjct 505  TTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCACCAGTGTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAT 446

Query 551  ACCGCACCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGA 610
          |
          |
Sbjct 445  ACCGCACCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGA 386

Query 611  AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCC 670
          |
          |
Sbjct 385  AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCC 326

Query 671  AACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG 730
          |
          |
Sbjct 325  AACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG 266

Query 731  CAAAATGCCGCAAAAA-GGGAATAAGG 756
          |
          |
Sbjct 265  CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG 239

```

Fig 4. Nucleotide sequences of PCR products of *Escherichia coli* B12G3, B32A9, B1H6i and BiH6o amplified by Multiplex I TEM, SHV and OXA-1-like. All 4 *Escherichia coli* strains were harboring TEM gene sequence with 99% homology of Gene Bank Accetion number KR024806, *Escherichia coli* strain FSEC817 plasmid beta-lactamase (*bla*TEM).

E. coli B32A9 와 B1H6o의 CTX family 산물은 *E. coli* (gbLC091534) *Citrobacter freundii* (gbKP987215), *K. pneumoniae* (gbKP698223) *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Indiana (gbKF840373), *Proteus mirabilis* (gbKC121029) 에서 보고된 염기서열과 99%이상의 상동성을 나타내어 *bla*CTX-14 gene으로 확인되었다(Fig 5).

```

Query 11  AAAC-CGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGC 69
      |||  |||
Sbjct 4913 AAACACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGC 4972

Query 70  GACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCT 129
      |||
Sbjct 4973 GACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCT 5032

Query 130 TTTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAAT 189
      |||
Sbjct 5033 TTTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAAT 5092

Query 190  ACCGCCATTCGCGGCGACCCGAGAGACACCACCAGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTG 249
      |||
Sbjct 5093 ACCGCCATTCGCGGCGACCCGAGAGACACCACCAGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTG 5152

Query 250  CGTCAGCTTACGCTGGGTGATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGG 309
      |||
Sbjct 5153 CGTCAGCTTACGCTGGGTGATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGG 5212

Query 310  CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTGGGCGCGCTTACCGACGTCGTGGACT 369
      |||
Sbjct 5213 CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTGGGCGCGCTTACCGACGTCGTGGACT 5272

Query 370  GTGGGTGATAAGACCGGCGAGCGGCGACTACGGCACCAACCAATGATATTGCGGTGATCTGG 429
      |||
Sbjct 5273 GTGGGTGATAAGACCGGCGAGCGGCGACTACGGCACCAACCAATGATATTGCGGTGATCTGG 5332

Query 430  CCGCAGGGTTCGTGCGCCGCTGGTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCA 489
      |||
Sbjct 5333 CCGCAGGGTTCGTGCGCCGCTGGTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCA 5392

Query 490  GAGAGCCGCGCGATGTGCTGGCTTCA 516
      |||
Sbjct 5393 GAGAGCCGCGCGATGTGCTGGCTTCA 5419

```

Fig 5. Nucleotide sequences of PCR products of *Escherichia coli* B32A9 and B1H6o amplified by Multiplex II CTX-M group1, group2 and group9. Those *Escherichia coli* strains were harboring *bla*CTX-14 gene sequence with 99% homology of Gene Bank Accetion number LC091534, *Escherichia coli* DNA, ISEcp1, *bla*CTX-M-14 gene, IS903D, strain: BRG-62.

E. coli B1H6i 분리주의 염기서열은 *K. pneumoniae* (gbKP893385), *E. coli* (gbKR338945), *P. mirabilis* (gbKC121030), *Shigella sonnei* (gbJX418365), *C. freundii* (gbKP987215) *S. enterica* (gbKF840373) 에서 보고된 염기서열과 99% 이상의 상동성을 나타내어 *bla*CTX-65 gene으로 확인되었다(Fig 6).

```

Query 11  AAAC-CGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGA AACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGC 69
         ||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 340  AAACACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGA AACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGC 399

Query 70  GACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACBGCT 129
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 400  GACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACBGCT 459

Query 130  TTTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAAT 189
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 460  TTTGCCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAAT 519

Query 190  ACCGCCATTCCCGGGCAGCCGAGAGACACCACCAGCCGCGGGGCGATGGCGCAGACGTTG 249
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 520  ACCGCCATTCCCGGGCAGCCGAGAGACACCACCAGCCGCGGGGCGATGGCGCAGACGTTG 579

Query 250  CGTCAGCTTACGCTGGGTGATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGGCGCAGTTGGTGACGTGG 309
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 580  CGTCAGCTTACGCTGGGTGATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGGCGCAGTTGGTGACGTGG 639

Query 310  CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTGCGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACT 369
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 640  CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTGCGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACT 699

Query 370  GTGGGTGATAAGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCAACCAATGATATTGCGGTGATCTGG 429
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 700  GTGGGTGATAAGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCAACCAATGATATTGCGGTGATCTGG 759

Query 430  CCGCAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCA 489
         |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 760  CCGCAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCA 819

Query 490  GAGCGCCGCGCGATGTGCTGGCTTCA 516
         |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 820  GAGCGCCGCGCGATGTGCTGGCTTCA 846

```

Fig 6. Nucleotide sequences of PCR products of *Escherichia coli* B1H6i amplified by Multiplex II CTX-M group1, group2 and group9. Those *Escherichia coli* strains were harboring *bla*CTX-65 gene sequence with 99% homology of Gene Bank Accetion number KR338945, *Escherichia coli* strain HG111 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-65 (*bla*CTX-M-65) gene.

ESBL 생성 *E. coli*는 4균주 중 1균주가 망아지 설사변에서 분리된 균주였고 나머지는 모두 송아지 설사변에서 유래한 균이었다. *E. coli* B1H6i는 AM,C,CZ,N,Na,P의 5 종류의 항생제에 내성을 나타내었으며, *E. coli* B1H6o는 AM,C,CRO,CZ,N,Na,P의 7 종류, *E. coli* B12G3는 AM,C,CRO,CZ,GM,N,NB,P,SXT,T의 10종류, *E. coli* B32A9는 AM,C,CRO,CZ,P,SXT,T의 7종류에 내성을 보이는 다제내성균이었다(Table 6).

Table 6. Origin and multiple antibiotic resistance of 4 *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases enumerated in this study

ESBL-producing	origin	ESBL gene	antibiotics resistant
<i>E. coli</i> B1H6i	calf diarrhea	TEM, CTX-M65	AM,C,CZ,N,Na,P (R), CAZ (I)
<i>E. coli</i> B1H6o	calf diarrhea	TEM, CTX-M14	AM,C,CRO,CZ,N,Na,P (R), CAZ (I)
<i>E. coli</i> B12G3	calf diarrhea	TEM	AM,C,CRO,CZ,GM,N,NB,P,SXT, T(R), CTX (I)
<i>E. coli</i> B32A9	foal diarrhea	TEM, CTX-M14	AM,C,CRO,CZ,P,SXT,T (R), CTX (I)

IV. 고 찰

최근까지 우리나라를 포함한 아시아[38], 유럽[22,25], 남아메리카[20], 등에서 ESBL과 다른 다제내성균에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 1999년부터 2008년까지 유럽은 병원과 사회 시설에서 3세대 세파계열 항생제에 내성을 가지는 *K. pneumoniae*와 *E. coli*의 증가를 맞이했다[62]. 그리고 병원 내 감염에서 ESBL 생성 장내세균의 중요성이 유럽, 미국, 극동지역에서 점차 증가되고 있다 [60]. ESBL의 종류는 지역에 따라 다양하게 나타나는데, 스웨덴, 일본, 싱가포르에서는 3-8% 정도인 반면 포르투갈(34%), 라틴아메리카(30-60%), 터키(58%) 등에서는 높은 비율로 나타난다[32,46,57]. 또한 SMART 연구의 결과를 보면 2009-2010년 사이의 유럽의 ESBL 생성 *K. pneumoniae*와 *E. coli*의 비율이 각각 38.9% 와 17.6 %였다. 북아메리카에서 같은 연구를 했을 때 결과는 각각 8.8% 와 8.5% 였다[33]. 반면에 중국에서는 61-67%로 나타났다. 뉴질랜드의 경우는 0-5%로 나타났다[49]. ESBL 중 보다 최근에 감염병의 치료를 어렵게 만드는 CTX-M은 1980년대에 처음 발견되었지만 1995년부터 전체 대륙에 빠른 속도로 퍼져 나가고 있다[15]. 그중에서 CTM-M15가 가장 많이 발견된다[21]. 하지만 지역마다 많은 차이가 난다. 스웨덴에서는 ESBL 생성 *E. coli*의 50-60%가 CTX-M15를 가지고, 그 다음으로는 CTX-M14가 10-15%를 차지했다[17]. 노르웨이와 덴마크에서는 50%가 CTX-M15였고, 20%가 CTX-M14였다[52,54]. 또 다른 보고를 보면 CTX-M15 유전자는 유럽과 북아메리카에서 가장 많이 발견되며, *E. coli*에서 90% 이상 발견되고, *K. pneumoniae*에서는 35%-65.5% 정도 발견되었다. SHV와 TEM 유전자는 또한 유럽과 북아메리카에서 많이 발견되는데 1.7-42.9%의 분포율을 보였으며, 대부분 *K. pneumoniae*에서 발견되어 왔다[33]. 이와같은 plasmid 매개에 의한 ESBL 생성균주가 1983년 독일에서 최초로 분리된 이후, *K. pneumoniae*와 *E. coli*가 대표적인 ESBL 생성균주로 전 세계에서 보고되고 있다[7]. 그러나 *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter* 같은 다른 *Enterobacteriaceae* family에서도 발견된다[16,57]. 게다가

가 장내세균이 아닌 *Pseudomonas* spp.와 *Acinetobacter baumannii* 에서도 보고되고 있다[16].

이번 연구에서는 총 196균주중 4균주(2.0%)에서 ESBL 생성을 확인하였는데, 이는 예전의 국내의 결과와 비슷하였다[3,43,48]. 이 결과는 유럽, 북아메리카, 중국[33]에 비해서는 낮았지만, 뉴질랜드[49]의 보고에 비하면 높게 나타났다. 그러나 Lim[47]의 2014년 연구를 보면 도축장의 닭 도체와, 분변 시료에서 분리한 균주 156개 중 62 균주(39.7%)에서 ESBL을 확인하였다. 이는 지금까지 국내의 다른 연구들에 비해 높은 숫자의 ESBL이 확인된 것이고, 그 종류는 TEM, CTX-M1이었다. 소[4]의 연구에서도 높은 수치의 ESBL 이 확인되었는데, 국내 대학 동물병원의 입원한 강아지와, 유기견 등의 분변에서 분리한 *E. coli*을 대상으로 검사한 결과 총 63균주의 *E. coli* 중 24균주(38.09%)에서 ESBL을 확인하였고, 그 종류는 CTX-M1, CTX-M9, CMY-2, CTX-M14, CTX-M15, CTX-M57, CTX-M24, CTX-M27, CTX-M65, TEM-1이었다.

국내에서의 ESBL 연구는 대부분 사람 유래의 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii* 및 *Serratia marcescens* 등의 장내세균에서 이루어졌으며, TEM-52, SHV-12 와 SHV-2a 가 많이 검출되었으나, 최근에는 CTX-M 및 CMY-2 등이 보고되고 있다[3,45]. Pai 등[55]이 2001년에 사람유래의 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella sonnei*에서 CTX-M14를 보고하였고, Jeong 등[39]은 국내 대학병원 환자에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 509주에서 *E. coli*는 9.2%, *K. pneumoniae* 에서는 30%에서 ESBL 생성을 확인하였고, TEM, CTX-M, SHV, CMY 의 유전자가 있는 것을 확인하였다. Kim 등[41,42]은 대학병원에서 분리한 *K. pneumoniae*와 *E. coli*에서 CTX-M3, CTX-M9, CTX-M14, SHV-12 를 분리한 바 있다. 국내 동물에서의 ESBL 연구 상황은, 조 등[9]은 대구의 도축장에서 분리한 *E. coli* 227주과 질병검사 의뢰된 환축에서 분리한 *E. coli* 150주 등 총 377에 대하여 검사한 결과 2주에서 ESBL 생성을 확인할 수 있어서 검출율은 0.6%를 나타내었고, 이 중 한주는 TEM-1과 CTX-M15를 동시에 가지고 있었고, 나머지 한 주는 TEM-116과 CTM-M15를 동시에 가지고 있었다. ESBL을 생성하는 세균은 모두 질병검사 의뢰된 환축에서 발견되었다. Kim 등[43]은 고기 소매점에서 소, 돼지, 닭의 66균주의 *E. coli*와 *Salmonella* spp.를 분

리하여 검사한 결과 3균주에서 CTX-M1을 확인하여 보고하였고, 4%의 검출율을 보였다. Lim 등[48]은 개,소에서 분리된 *E. coli*에서 CTX-M14와 돼지에서 분리된 *E. coli*에서 CTX-M15를 보고하였고, 성 등[3]은 국내 가금유래 병원성 *E. coli*에서 CTX-M15, CMY-2를 분리하였다. 공시균 203주 중 4주 (육계유래 3주, 산란계유래 1주)가 ESBL 생성균주로 확인되어서 2%의 검출율을 보였다. 국내 환경에서의 ESBL 연구 현황을 보면, 이[6]가 국내 자연계에서 최초로 ESBL 장내세균에 대하여 보고하였다. 국내 오수처리장에서 *Enterobacter cloacae*와 *E. sakazakii*, *K. pneumoniae*에서 ESBL 생성균주 26균주를 분리하였으며, TEM+SHV 복합형 ESBL 을 검출하였다. 김 등[1]은 2010년에 부산 공공하수처리시설에서 분리한 *K. pneumoniae* 와 *E. coli* 14균주에서 TEM-1, SHV-12를 검출하였다.

이번 연구에서 검출한 TEM-1 유전자의 경우 과거 국내의 많은 연구에서 검출된 바 있고[43,46] CTX-M14, CTX-M65의 경우에도 소[4]가 2008년부터 2009년 사이에 애완전에서 분리된 *E. coli*에서 생성을 확인한 바 있다. 본 연구에서 분리한 ESBL 양성 *E. coli*가 2006년과 2008년에 분리한 것이기 때문에 보고는 늦게 되었지만 소[4]의 보고 이전부터 국내에 CTX-M14, CTX-M65가 있었다고 볼 수 있다.

ESBL 유전자를 보유한 plasmid 가 큰 크기여서 대부분 다른 여러 항생제 다제내성을 가지는 경우가 많아서 치료가 쉽지 않은데[39], 이번 연구결과에서도 aminoglycoside, quinolone 등 다른 약제에도 동시에 내성을 보였다. ESBL의 표현형을 검사하는 방법은 다양하며[2,5,31], 본 실험에서의 *E. coli* B1H60의 경우 DDST 검사에서는 확장현상을 보이지 않았지만 디스크 간의 거리를 더 좁히거나 다른 검사방법을 적용할 경우 표현형적으로 양성을 나타낼 가능성이 있을 것이다.

이번 실험에서는 질병이 있는 송아지, 망아지에서만 ESBL이 검출되었지만, 다른 연구들을 보면 폐수 처리장의 하수, 도축장의 도체, 사람 병원에서 분리한 세균, 질병이 있는 동물 등 다양한 곳에서 ESBL 이 검출되고 있는 실정이다. 이렇게 ESBL이 우리 생활 곳곳에서 발견되고 있으므로, 지속적으로 다양한 장소, 다양한 동물에서의 ESBL 검출 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 동물의

감염증 치료의 효율성을 높이고 환경이나 사람 및 다른 동물에게 항생제 내성유전자의 전파를 차단하거나 느리게 하기 위해서는 반드시 감수성 검사 후 치료를 하고 항생제의 사용수칙을 지키는 노력이 필요할 것으로 보인다.

V. 결 론

2002년에서 2008년까지 제주지역을 포함한 국내의 돼지, 닭, 말, 사람, 개, 소로부터 분리한 *E. coli*, *Salmonella* spp.를 대상으로 ESBL 생성균주를 파악하고 ESBL 유전자의 특성을 조사하고자 본 연구를 실시하였다.

Double disk synergy test, Polymerase chain reaction 및 유전자 염기서열분석을 이용하여 실험한 결과 119 *Salmonella* spp. 에 대한 검사에서는 ESBL을 확인할 수 없었지만, Ampicillin에 내성을 가지는 34 균주에서 PCR을 한 결과 모두 TEM 유전자를 확인할 수 있었다. 77 *E. coli* 에서는 4 균주에서 ESBL을 확인할 수 있었고, 4균주 모두 TEM 유전자를 가지고 있었으며, 2균주는 CTX-M14, 나머지 1균주는 CTX-M65를 보유하고 있었다.

주요어 : 살모넬라, *E. coli*, ESBL, TEM, CTX-M14, CTX-M65

VI. 참고문헌

1. 김군도, 이훈구. 부산 수영공공하수처리시설에서 분리된 광범위 항균제 베타 락탐 분해효소(Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) 유형. The Korean Journal of Microbiology 2010, **46**, 38-45.
2. 김윤태, 이훈구. 부산시내 종합병원에서의 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 의 형별분류. 한국 미생물학회지 2000, **36**, 221-227.
3. 성명숙, 김진현, 조재근, 설성용, 김기석. 국내 가금유래 병원성 대장균의 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 특성 조사. Korean J Vet res 2008, **48**, 259-265.
4. 소정화. 국내 애완동물에서 분리된 extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) 및 AmlC β -lactamases 생성 *E. coli* 의 분자역학적 특성에 대한 분석. 2010, 서울대학교 대학원 석사학위 논문.
5. 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현. Extended broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherihia coli* 와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 1994, **26**, 341-348.
6. 이훈구. 광안리 오수처리장에서 분리된 Extended-spectrum β -lactamase

(ESBL) *Klebsiella* 와 *Enterobacter* 의 유형. The Korean Journal of Microbiology 2001, **37**, 277-283.

7. **이훈구**. 부산 도축장에서 분리된 광범위 베타 락탐 분해효소 (Extended-Spectrum β -lactamase, ESBL) 생성 장내세균의 형별분류. 한국미생물 학회지 2006, **42**, 125-130.

8. **조재근, 김환득, 권순효, 김진현, 장성일, 박최규, 김기석**. 낙동강과 금호강에서 분리된 광범위 베타 락탐 분해효소 생성 *Escherichia coli* 내 항균제 내성 및 integrons의 분포. 한국가축위생학회지 2014, **37**, 19-27.

9. **조재근, 성명숙, 김진현, 김기석**. 국내 가축 유래 대장균에서 CTX-M 및 TEM 형 extended-spectrum β -lactamases 의 검출. 한국가축위생학회지 2011, **34**, 37-43.

10. **Abraham EP and Chain**. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940, **146**, 837.

11. **Alobwede I, Mzali FH, Livermore DM, Hentige J, Todd N, Hawkey PM**. CTX-M extended -spectrum beta -lactamase arrives in UK. J. Antimicrob Chemother 2003, **51**, 470-471.

12. **Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M.** Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase(ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002, **50**, 393-396.
13. **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC.** Antibiotic susceptibility testing by a standized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966, **45**, 493-496.
14. **Beers MH.** The Merck Manual of Medical Information 2nd Home Edition. Whitehouse Station, NJ, Merck, 2003.
15. **Bonnet R.** Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother* 2004, **48**, 1-14.
16. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**, 933–951.
17. **Brolund A, Edquist PJ, Makitalo B, Olsson-Liljequist B, Soderblom T, Wisell KT.** Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clin Microbiol Infect* 2014, **20**, 344-352.
18. **Brunton LL, Parker K, Blumenthal D.** The goodman and gilman's manual of pharmacological therapeutics. McGraw-Hill Professional, 2007.

19. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995, **39**, 1211-1233.
20. **Bush K.** Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987–2006. *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**, 134–143.
21. **Canton R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**, 466-475.
22. **Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F.** Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**, 144–153.
23. **Chambers HF.** Beta-Lactam & Other Cell Wall- & Membrane-Active Antibiotics. *Basic & Clinical Pharmacology* McGraw Hill, USA, 2007.
24. **Choi MJ, Lim SK, Jung SC, Ko KS.** Comparisons of CTX-M-producing *Escherichia coli* Isolates from Humans and Animals South Korea. *Journal of Bacteriology and Virology* 2014, **44**, 44-51.
25. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008, **13**, 19-51.

26. **Dallenne C, Costa AD, Decre D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010, **65**, 490-495.
27. **Datta N, Kontomichalou P.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factor in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965, **208**, 239-244.
28. **ECDC.** EARSS annual report 2008. Bilthoven, the Netherlands: European Center for Disease Prevention and Control 2008, 64–82.
29. **Geroulanos S, Marathias K, Kriaras J, Kadas B.** Cephalosporins in surgical prophylaxis. *J Chemother* 2001, **1**, 23-26.
30. **Ghuysen JM.** Serine β -Lactamases and penicillin binding proteins *Annu Rev Microbiol* 1991, **45**, 37-67.
31. **Giakkoupe P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E.** IBC-1, a nouvel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**, 2247-2253.
32. **Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson**

LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* 1999, **281**, 67–71.

33. **Hoban DJ, Lascols C, Nicolle LE, Badal R, Bouchillon S, Hackel M.** Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, including molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing species, in urinary tract isolates from hospitalized patients in North America and Europe: results from the SMART study 2009–2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, **74**, 62–67.

34. **Holten KB, Onuko EM.** Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *Am Fam Physician* 2000, **62**, 611-620.

35. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, and Philippon A.** Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**, 3045-3049.

36. **Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imago S, Ishiguru M, Matsuzwa H.** Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A, β -Lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent Chemother* 1995,

39, 2269-2275.

37. **Jacoby GA and Medeiros AA.** More extended- spectrum β -Lactamase. Antimicrob. Agent Chemother 1991, **35**, 1697-1704.

38. **Jean SS, Hsueh PR.** High burden of antimicrobial resistance in Asia. Int J Antimicrob Agents 2011, **37**, 291–295.

39. **Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Jung HI, Song JS, Jeong BC, Kim SJ, Lee SH.** Investigation of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. Lett Microbiol 2004, **39**, 41-47.

40. **Jouvenot M, Deschaseaux ML, Royez M, Mouglin C, Cooksey RC, Michel-Briand Y, and Adessi GL.** Molecular hybridization versus isoelectric focusing to determine TEM type β -lactamases in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1987, **31**, 300-305.

41. **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 β -lactamases in enterobacteriae clinical isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005, **49**, 1572-1575.

42. **Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y, Lee JC, Seol SY, Lee YC, Cho DT.**

CTX-M and SHV-12 B-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.

43. Kim YH, Joo IS, Kim YJ, Oh MH, Cho JI, Han MK, Kim SH, Moon TW, P KS. Detection of CTX-M type ESBL producing *Salmonella* in Retail Meat in Korea. J Fd Hyg Safety 2014, **29**, 47-52.

44. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofuran, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983, **11**, 315-317.

45. Lee SH, Kim MN, Choi SJ, Chung WS. Characteristics of extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens. Korean J Clin Pathol 2000, **20**, 404-409.

46. Lewis MT, Yamaguchi K, Biedenbach DJ, Jones RN. In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum beta-lactams in 22 medical centers in Japan: a phase II trial comparing two annual organism samples. The Japan Antimicrobial Resistance Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1999, **35**,

307-315.

47. **Lim JS.** The Characterization of *E. coli* Producing Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) Isolated from Chicken Slaughterhouses in South Korea. 2014, A Thesis Submitted in Fulfillment for the Requirement of the Award of Master (MsC) of the Keonguk National University of Korea.

48. **Lim SK, Lee HS, Nam HM, Jung SC, Bae YC.** CTX-M-type beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from sick animals in Korea. *Microb Drug Resist* 2009, **15**, 139-142.

49. **Lu PL, Liu YC, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM.** Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009–2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents* 2012, **40**, 37–43.

50. **Mshana SE.** Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum beta-Lactamases (ESBL) Producing Enterobacteriaceae from the Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania and the University of Giessen Medical Hospital, Germany. 2011, A Thesis Submitted in Fulfillment for the Requirement of the Award of Doctor of Philosophy (PhD) of the St. Augustine

University of Tanzania.

51. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 2008, **14**, 42-52.

52. Naseer U, Haldorsen B, Tofte S, Hegstad K, Scheutz F, Simonsen GS. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. APMIS 2009, **117**, 526-536.

53. Nuesch-IMT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother 1997, **41**, 943-949.

54. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt MJ, Leihof RF, Struve C. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. J Clin Microbiol 2013, **51**, 177985.

55. 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*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Clin Microbiol 2001, **39**, 3747-3749.

56. **Park NY, Na SH, Cho HS.** Detection of beta-lactam antibiotics resistant genes in *Escherichia coli* from porcine fecal samples using DNA chip. Kor J Vet serv 2007, **30**, 505-510.
57. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinicalupdate. Clin Microbiol Rev 2005, **18**, 657-686.
58. **Ramos UG, Romero EM, Sánchez JS.** SHV-type Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. Salud Publica Mex 2007, **49**, 415-421.
59. **Reynaud A, Péduzzi J, Barthélémy M, Labia R.** Cefotaxime hydrolyzing activity of the β -lactamase of *Klebsiella oxytoca* D488 could be related to a threonine residue at position 140. FEMS Microbiol Lett 1991, **81**, 185-192.
60. **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 1988, **56**, 343-348.
61. **Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G.** Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type

penicillinase genes. *Rev Infect Dis* 1988, **10**, 879-884.

62. **Storberg V.** ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa—a non-systematic literature review of research published 2008–2012. *Infect Ecol Epidemiol* 2014, **4**, 1-16

63. **Tumah H.** Fourth-generation cephalosporins: in vitro activity against nosocomial gram-negative bacilli. *Chemotherapy*. 2005, **51**, 80-85.

64. **Yu WL, Chuang YC, Rasmussen JW.** Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan : epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect* 2006, **39**, 264-277.

초 록

동물 유래 대장균 및 살모넬라의 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 유형 조사 항생제 감수성

지도교수 : 손 원 근

김 형 준

제주대학교 대학원 수의학과

다약제내성 그람음성균의 급격한 증가로 항생제 내성이 전 세계적인 관심사가 되고 있다. 임상 검체에서 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성균 분리의 증가는 전염성 질병 관리에서 가장 큰 문제이다. ESBL에 대한 정확한 정의가 합의된 적은 없으나, penicillin, 1,2,3 세대 cephalosporin과 aztreonam을 가수분해 함으로써 저항성을 가지는 β -lactamase 라고 볼 수 있다. 그리고 이 ESBL은 clavulanic acid 와 같은 β -lactamase inhibitor에 의해서 불활화되는 특성이 있다. 세계적으로 병원에서 병원 또는 집단에서 감염된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae* 생성 ESBL이 문제가 되고 있다. 대부분의 ESBL들은 다제내성을 가지므로 치료를 힘들게 한다. 이 논문은 제주도내에서 질병을 가지거나 건강한 동물에서 분리한 대장균과 살모넬라균에서 ESBL의 생성 정도에 관하여 연구하였다. 대부분의 공시세균은 돼지, 닭, 말 등에서 분리된 세균이고, 사람 유래의 균주는 8개였다. 총

119균주의 살모넬라와 77 균주의 대장균이 이번 연구에 사용되었다. ESBL은 디스크확산법, PCR, 염기서열분석을 통해서 확인하였다. 살모넬라에 대한 검사에서는 ESBL을 확인할 수 없었지만, ampicillin에 내성을 가지는 34 균주에서 TEM 유전자를 확인할 수 있었다. 대장균에서는 4 균주에서 ESBL을 확인할 수 있었다. 1균주에서는 TEM 유전자를 확인할 수 있었고, 2 균주에서는 TEM과 CTX-M14 유전자를 확인했다. 그리고 나머지 1균주에서는 TEM과 CTX-M65 유전자를 확인했다. 검출 ESBL은 송아지 설사, 망아지 설사 유래의 세균에서 확인할 수 있었다. 이 연구에서 보면 제주도에서는 ESBL 생성 대장균, 살모넬라균이 흔하지 않다는 것을 알 수 있었다.

주요어: 살모넬라, 대장균, Extended-spectrum- β -lactamase, TEM, CTX-M14, CTX-M65