

## 광안리 오수처리장에서 분리된 *Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase (ESBL)* *Klebsiella*와 *Enterobacter*의 유형

이훈구

부경대학교 자연과학대학 미생물학과

본 논문은 임상검체 이외의 자연계내에서 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성균주의 분리 여부를 확인하고, 분리되었을 경우 이들의 유형을 조사하기 위함이었다. 하수종말처리장, 가물치양식장, 부경대학교 담수어양식장, 공중목욕탕으로부터 분리된 균주를 double disk synergy 검사, 교차접합시험, 등전점 조사 등을 실시하여 하수종말처리장 방류수로부터 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성균주가 26 균주 분리되었다. 균종은 *Enterobacter cloacae*와 *E. sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 및 *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*였다. 이들은 모두 PCR결과 TEM+SHV 복합형이었고 등전점 결과 *Klebsiella*속의 균들은 pI 5.9, 5.9+5.4 *E. cloacae*는 pI  $\geq$  8.5, 8.0+5.4, *E. sakazakii*는 8.0+5.4, 8.0+5.9+5.4였다. 교차접합시험(transconjugation) 결과 피전달 균주인 *E. coli* RG176 *nal<sup>r</sup>*에게 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (1 균주) *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (5 균주) 및 *E. cloacae* (1 균주)의  $\beta$ -lactamase 생성유전자가 전달되었다. 이 결과는 국내에서 임상검체 이외의 자연계에서 분리된 ESBL생성 장내세균의 첫 번째 보고이다.

**Key words** □ *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, Extended spectrum beta-lactamase (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

$\beta$ -lactamase (EC 3.5.2.6)는 amide, amidine, 기타 C-N결합을 가수 분해시키는 효소로서 특히 환상의 amide를 분해시킨다(5, 6). 그 결과 penicillin류나 cephalosporin류 또는 이와 관련이 되는  $\beta$ -lactam 항균제에서 amide 결합, 즉  $\beta$ -lactam ring을 가수분해시킴으로써 불활성화 시킨다(4,6). 이들은 크게 Bush의 DNA의 분자구조 차이에 의한 분류와 Ambler의  $\beta$ -lactamase 구조에서 아미노산 서열을 기준으로 분류하는 두 가지의 분류 체계를 가지고 있다. 일반적으로 Bush 분류가 널리 사용되어지고 있는데 크게 TEM형과 SHV형의 두 계열로 나뉘어지며 이들은 대부분 TEM이나 SHV  $\beta$ -lactamase 구조에서 1~4개의 아미노산 치환이 일어난 변이형으로서 구조 유전자의 point mutation이 일어난 것이다(6,7). 초기의 명명은 기질 반응성, 억제제에 대한 반응, pI, 내성표현형, 발견장소, 발견자 등에 따라 이루어졌기 때문에 매우 혼란스러웠으며 이러한 명명 체계의 혼란을 바로잡기 위하여 숫자를 붙일 것을 제안하고 있다(6,7). Bush-Jacoby-Medeiros (5,6)의 기능적인 특성에 중점을 둔 분류에 따르면 기질과 억제제의 성상에 따라 크게 4개의 군으로 나뉜다. 제 1군은 cephalosporin을 분해하는 효소로 clavulanic acid에는 저해가 일어나지 않으며, 제 2군은  $\beta$ -lactamase 저해제에 의해서 저해가 잘 일어나며 제 3군은 metallo- $\beta$ -lactamase로서 EDTA와 p-

chloromercuri-benzoate를 제외한 알려진 모든  $\beta$ -lactamase에 대하여 저해되지 않으며 제 4군은 clavulanic acid에 저해되지 않는 penicillin 분해효소들을 말한다(6).

병원에서 치료제로서 이 3세대 cephalosporin 항균제들을 집중적으로 사용하게 되자 곧이어 이에 대한 내성균주들이 출현하게 되었다(3,18). 현재 임상에서 빈번하게 분리되고 있는 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성균주는 주로 장내세균과 (Enterobacteriaceae) 세균에서 생성되며 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam과 같은 소위 제 3세대 항균제들에 대해서 내성을 가지고 있다. 일부는 염색체성 DNA에 의해서 매개되기도 하지만 plasmid에 의해서 대부분이 매개되고 있다(12,13,15).

1980년대 초 유럽에서 *Klebsiella*와 *Escherichia coli*를 비롯한 수종의 장내세균에서 plasmid 매개성 ESBL생성 균주가 출현한 이후 우리나라를 포함한 전 세계적으로 임상 가검물로부터 빈번하게 분리됨으로 질병치료에 중요한 문제로 대두되고 있다(1,4,17). 일단 제 3세대 억제내성을 획득한 균주가 분변이나 생활하수, 양식장이나 축산 폐기물들을 통하여 자연계로 확산될 경우, 자연계내의 여러 종류의 세균군에 내성을 전달시킬 수 있는 위험성을 가지고 있다. 그러나 ESBL 생성균주의 연구는 대부분 임상단계에서 머물고 있으며 자연계로부터 이들의 분리나, 이들의 생물학적 성상에 대한 연구보고는 거의 이루어진 바가 없다. 본 연구자는 이러한 문제의 중요성을 감안하여 명지지역의 가물치양식장, 부경대학교 담수어 양식장, 공중목욕탕 2 곳의 남탕과 여탕의 목욕물, 부산소재 광안동 오수펌프장 등 자연환경으로부터

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 051-620-6363, Fax: 051-611-6358  
E-mail: hunku@pku.ac.kr

터 ESBL 생성 장내세균 균을 분리하여, 이중 디스크 확산법으로 약제감수성을 검사하고 접합시험을 통하여 이들이 plasmid에 기인된 것인가 또는 염색체성에 의해서 획득된 것인지를 확인하고,  $\beta$ -lactamase의 등전점과 PCR유형을 분류함으로써 ESBL생성 장내세균의 생물학적 기초성상을 조사하고자 본 연구를 실시하였다.

## 실험재료 및 방법

### 균주분리

목욕탕, 양식장 및 평안리오수 펌프장 등 환경 검체로부터 균주분리는 다음과 같이 하였다. 2000년 1월부터 6월까지 매월 1회씩 멸균된 채수병에 물을 받은 후 실험실로 옮겨 각각 1 ml을 취하여 9 ml trypticase soy broth (TSB) 첨가한 다음 37°C에서 17시간 증균하였다. 이 증균액 0.1 ml을 취하여 제 3세대 cephalosporin계열 항균제인 ceftazidime (32  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 만든 장내세균 선택배지인 McConkey agar에 고르게 도말한 다음 37°C에서 17시간 배양하여 성장된 균집락을 얻었다. 이로부터 얻어진 단일 집락을 취하여 2회에 걸쳐 trypticase soy agar (TSA)상에서 순수분리하였다. 이렇게 분리된 균주를 생화학 검사를 실시하여 종 수준까지 최종 동정하였다. 배지제조와 균주의 동정은 Grimont 등(10), Holt 등(11), Ewing (8)을 따랐다. 항균제 내성검사는 시판되는 항균제감수성검사 디스크(BBL, Becton Dickinson, Microbiology System, Cokeysville, Md.)를 구입하여 디스크 확산법으로 하였고 판정기준은 NCCLS를 따랐다(19). 사용된 항균제는 ampicillin, cefotetan, ceftazidime, ceftriaxone, cephalothin, imipenem, nalidixic acid 등 7 종이였다.

### 이중디스크 확산법(Double disk synergy test)

항균제 검사방법과 같이 McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 미리 만든 3 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA, Difco, laboratory, Michigan, USA) 평판 배지에 고르게 도말 하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10  $\mu$ g, BBL, Becton Dickinson, Microbiology System, Cokeysville, Md.) disk를 놓고 *Klebsiella*의 경우 그 주변에 15 mm, *Enterobacter*의 경우 10 mm 간격으로 cefotaxime (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), ceftriaxone (30  $\mu$ g) disk를 올려놓아 37°C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과(synergism)를 판정하였다(2,16,20).

### 등전점(Isoelectric focusing, IEF)

등전점 측정을 위하여 균주로부터 crude  $\beta$ -lactamase 추출, polyacrylamide gel 제조 및 전기영동을 실시하였고 단계별 방법은 다음과 같았다(16,17,20).

혈액한천배지에서 자란 균을 Brain Heart Infusion (BHI) broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 후 1,000 $\times$ g에서 15분간 원심하여 침전된 세균을 모아 3차 증류수 750  $\mu$ l에 재부유 시켰다. 이를 초음파 파쇄기(Ultrasonic homogenizer 4710,

Cole-Palmer Instrument Co., Chicago IL, USA)를 이용하여 30초간 4회 분쇄하였다. 5,000 $\times$ g에 5분간 원심하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후 검사 실시 전까지 -20°C에서 보관하였다(1).

등전점 검사는 유리판 위에 pipette 을 이용하여 증류수 몇 방울을 떨어뜨리고 gel support film의 소수성 부분을 유리판에 기포가 생기지 않도록 하여 부착시켰다. Polyacrylamide gel을 적당량(3~4 ml)을 분주하고, 분주된 gel위에 gel support film의 친수성 부분을 기포가 생기지 않도록 주의하면서 부착시켰다. 이렇게 준비한 유리 gel판을 형광등 불빛 아래에서 중합시켰다. 유리 gel판 위에 sample template를 놓고 sample 2  $\mu$ l를 loading한 후 5분간 상온에서 방치한 다음 조심스럽게 sample template를 제거하였다. Isoelectrofocusing Chamber (Mine IEF Cell 111., Bio-Rad Co., California, USA)의 흑연전극에 증류수로 적당히 습윤한 상태를 유지시키고 유리 gel판의 gel이 흑연전극에 닿도록 하여 100 V에 30분, 200 V에 30분, 450 V에 60분간 전기영동 시켰다.

전기영동이 끝난 유리 gel판으로부터 gel support film을 분리하여 nitrocefin (0.5 mg/ml in phosphate buffer pH 7.0)을 1~2 ml정도를 gel 표면 위에 뿌려 준 후 적색 band가 나타나면 Wattman No. 2 여과지를 gel위에 덮어 착색시킨 후 band를 단백질 표준 marker와 비교하면서 판독하였다(1-4).

### PCR를 이용한 ESBL 유전자의 형별 분류

실험균주를 TSB에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양한 후 배양액 2 ml을 3,000 $\times$ g로 원심하여 얻은 침전된 세균을 같은 양의 생리식염수로 재부유시켜 3회 세척하였다. 이를 plasmid의 분리 kit인 plasmid Minipreps DNA Purification kit (Injae Science Co. Kr.)를 사용하여 분리하였다. ESBL균주의 형별 확인을 위하여 사용된 primer는 각각 TEM type과 SHV type의 보존적 염기서열을 이용하여 제작하였다.

TEM형 primer는

F: 5'-ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA-3'

R: 5'-GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC-3' 였고(1,4,20)

SHV형 primer는

F: 5'-TGG TTAT TGC GTT ATA TTC GCC-3'

R: 5'-GGT TAG CGT TGC CAG TGC T -3'로 120번에서 140번, 990번에서 972의 서열이었다(1,4,20)

TEM형 확인을 위한 PCR조건은 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 50°C에서 90초, extension은 72°C에서 60초로 하여 30 cycle을 반복하였고, SHV형 확인을 위해서는 denaturation은 96°C에서 30초, annealing은 50°C에서 15초, extension 72°C에서 120초로 하여 24 cycle을 반복하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 사용하였으며 방법은 AccuPower<sup>R</sup> PCR PreMix (Bioneer, Co. Kr.)에 Template DNA 1  $\mu$ l와 primer를 각각 1  $\mu$ l넣어 사용하였으며 PreMix구성성분은 Taq DNA polymerase 1U, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 250  $\mu$ M, TrisHCl (pH 9.0) 10 mM,

KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 증류수 17.7  $\mu$ l였다. 이와 같이 하여 얻어진 PCR 생성물을 2.0% agarose gel에 TBE buffer 속에서 100 V로 10분간, 50 V에서 20분간 전기영동 하여 각각의 전형적인 TEM과 SHV 형의 band가 생성되는지를 UV 형광등 아래에서 확인하였다(1).

**교차접합시험(Transconjugation)에 의한 내성 전달**

ESBL생성이 확인된 균주를 전달균주로 하고 각 약제에는 감수성이나 nalidixic acid에 내성인 *E. coli* RG176 nal<sup>r</sup>를 피전달균주로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 시험균주들은 모두 TSB에서 배양된 대수 증식기 중반의 신선한 균주를 선정하였다. 전달균주와 피전달균주의 균체수 비율을 1:4가 되게 하여 새로운 TSB에 혼합한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 멸균된 면봉에 적서 ceftazidime (30  $\mu$ g/ml)+nalidixic acid (50  $\mu$ g/ml)가 첨가된 MacConkey agar에 고르게 도말하고 37°C에서 18시간 배양하여 균집락 생성 유무를 조사하였다(3,4,20).

**결 과**

**ESBL 생성 장내세균의 분리동정**

2000년 1월부터 6월까지 부산 소재 공중목욕탕 2곳, 부경대학교 구내 담수어양식장, 명지 지역 가물치양식장 4곳, 광안리해수욕장 입구에 있는 오수처리장의 방류수를 월 1회씩 채취하여 ESBL생성 균주를 분리한 결과 광안리 오수처리장의 검체에서만 균이 분리되었고 다른 장소에서는 균이 분리되지 않았다. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (8 주), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (6 주), *Enterobacter cloacae* (4 주), *E. sakazakii* (8 주) 등 총 26 균주가 분리되었다.

**항균제 감수성 검사**

동정된 ESBL 생성 26 균주에 대해 7 가지의 항균제로 감수성 시험을 실시한 결과 ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, cephalothin등의 4 종류의 항균제에 대하여 모두 내성을 나타내었고 cefotetan,에서는 *Klebsiella*속의 균주는 모두 감수성을 *Enterobacter*속의 균주는 내성을 나타내었고, imipenem에 모두 감수성을 나타내었다. Nalidixic acid에 대해서는 내성 추이가 다양하여 NCCLS 기준(30  $\mu$ g/ml)에서는 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 6 주 내성, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* 전균주 내성, *E. cloacae* 1 주 내성, *E. sakazakii*전 균주 감수성을 나타내었다. 그러나 내성전달을 조사하기 위하여 50  $\mu$ g/ml nalidixic acid을 첨가한 배지에서는 전 분리균주가 감수성을 나타내었다.

**ESBL 생성균주의 확인**

균체를 초음파로 파쇄한 여액과 nitrocefin용액 한 방울을 잘 섞은 혼합체가 5 분 안에 붉은 색으로 변화됨으로서 실험된 전 균주가 모두  $\beta$ -lactamase를 생성하는 것이 확인되었다.

이중디스크(Double disk synergy) 확산시험 결과, ticarcillin/clavulanate와 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 등 4 약제들의 거리 간격이 *Klebsiella*의 경우 15 mm, *Enterobacter*의 경우 10 mm 간격에서 전 균주가 synergy현상이 확인되었다(Fig. 1).

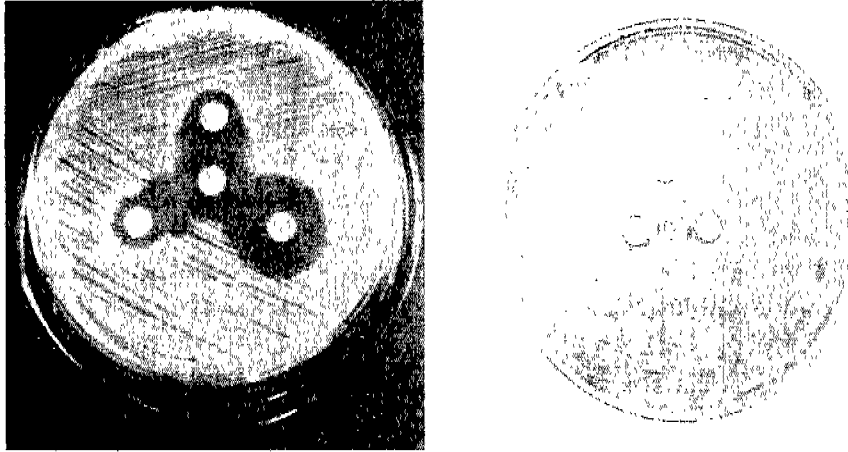
**$\beta$ -lactamase 등전점**

분리균주들에 대한 등전점 형성결과는 다음과 같았다. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 8 균주 중 3 균주는 pI 5.4, 4 균주는 pI 5.9에서 각각 하나의 등전점을 형성하였다. 그러나 2 균주가 pI 5.4와 5.9에서 동시의 등전점을 형성하였다.

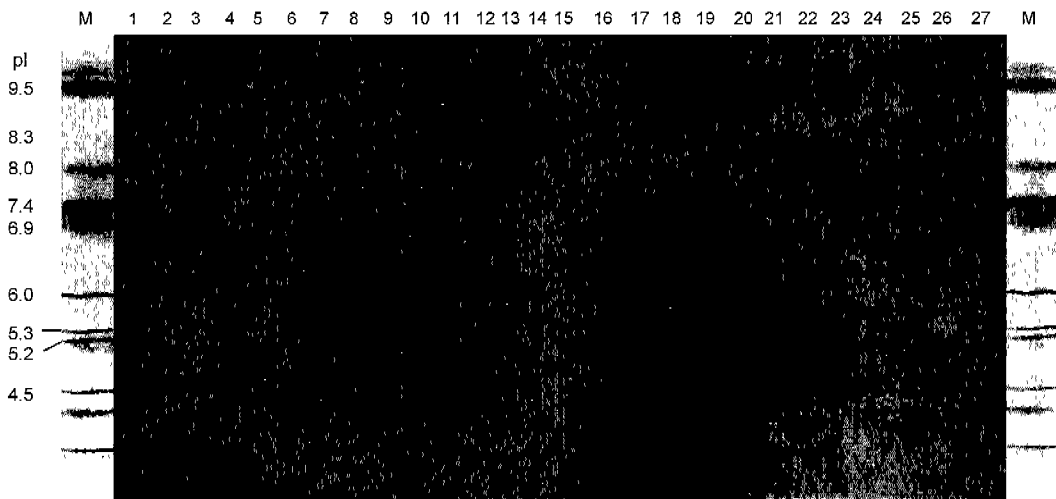
*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*는 3 균주가 pI 5.9에서 하나의 등전점을 형성하였고 나머지 3 균주는 pI 5.9와 5.4에서 두 개의 등전점을 형성하였다. *E. cloacae*는 pI 생성물의 유형은 2 개 균으로 나뉘어졌는데 1 균은 pI 8.3 이상에서 한 개의 등전점을

**Table 1.** ESBL typing of isolates in this study

Species	pI	PCR	Most probable $\beta$ -lactamase type	Strain No
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	pI 5.9	TEM+SHV	TEM-4, TEM-15, TEM-17, TEM-52	EL000405, EL000407, EL000408
	pI 5.9 pI 5.4	TEM+SHV	TEM-1, TEM-4 TEM-7 TEM-15, TEM-17, TEM-19 TEM-52	EL00304, EL000406
	pI 5.4	TEM+SHV	TEM-1, TEM-7, TEM-19	EL000301, EL000302, EL000303
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	pI 5.9	TEM+SHV	TEM-4, TEM-15, TEM-17, TEM-52	EL000523, EL000626, EL000627
	pI 5.9 pI 5.4	TEM+SHV	TEM-1, TEM-4 TEM-7 TEM-15, TEM-17, TEM-19 TEM-52	EL000524, EL000625, EL000628,
	pI>8.5	TEM+SHV	UNKNOWN	EL000519
<i>Enterobacter cloacae</i>	pI 8.0 pI 5.9	TEM+SHV	TEM-4, TEM-15, TEM-17, TEM-52 and SHV-5, SHV-12	EL000411, EL00412, EL00416
	pI 8.0 pI 5.9	TEM+SHV	TEM-4, TEM-15, TEM-17, TEM-52 and SHV-5, SHV-12	EL000409, EL000410,EL000413, EL000414, EL000417, EL000418,EL000421
<i>E. sakazakii</i>	pI 8.0 pI 5.9 pI 5.4	TEM+SHV	TEM-1, TEM-4, TEM-7 TEM-15, TEM-17, TEM-19 TEM-52, and SHV-5, SHV-12.	EL000422



**Fig. 1.** Double disk synergy test. Left; *Klebsiella pneumonia* subsp. *pneumoniae* EL000304 Center, clavulanic acid, Left, Cefotetan, Upper, Ceftriaxone Right, Ceftazidime, and the distance between antibiotics, 15 mm. Right; *Enterobacter cloacae* EL000411. The distance between antibiotics, 10 mm



**Fig. 2.** Isoelectric focusing points of ESBL-producing strains in this study. Lane M, standard marker; lane 1, EL000301; lane 2, EL000302; lane 3, EL000303; lane 4, EL000304; lane 5, EL000405; lane 6, EL000406; lane 7, EL000407; lane 8, EL000408; lane 9, EL 000523; lane 10, EL 000524; lane 11, EL 000625; lane 12, EL 000626; lane 13, EL000627; lane 14, EL 000628; lane 15, EL 000409; lane 16, 000410; lane 17, EL 000413; lane 18, EL 000414; lane 19, EL 000417; lane 20, EL 000418; lane 21, EL 000421; lane 22, EL 000422; lane 23, EL 000411; lane 24, EL000412; lane 25, EL 000416; lane 26, EL 000419 and lane 27, Reference SHV strain PUD 18 (SHV-3, pI 7.0). Lane number 1-8, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; lane number 9-14, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; lane number 15-22, *Enterobacter sakazakii*; lane number 23-26, *E. cloacae*.

형성하였으며 나머지 3 균주는 pI 5.4와 8.0에서 등전점을 형성하였다. *E. sakazakii* 역시 2 개의 균으로 나뉘었는데 1 균은 pI 8.0, 5.9 및 5.4에서 등전점을 형성하였고 나머지 균주는 pI 5.4와 8.0에서 등전점을 형성하였다(Table 1, Fig. 2).

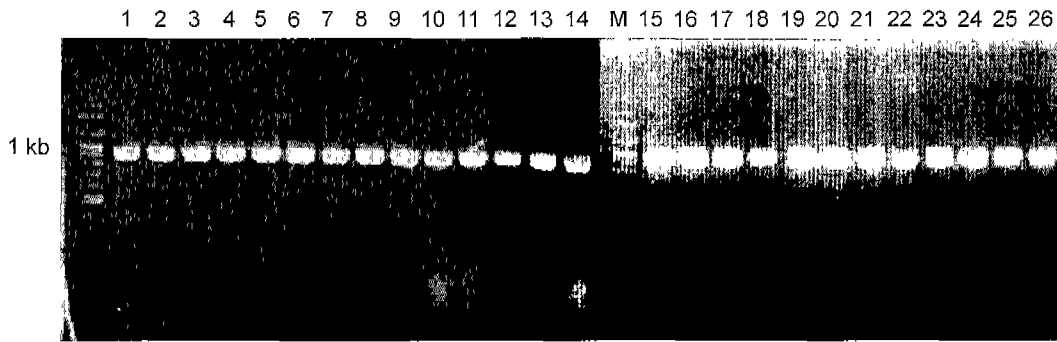
**PCR를 이용한 균주들의 형별분류**

PCR검사결과 시험된 전 균주들이 TEM+SHV형으로 TEM형 생성물인 1080 bp와 SHV형인 870 bp에서 생성물을 형성하였다 (Fig. 3, 4).

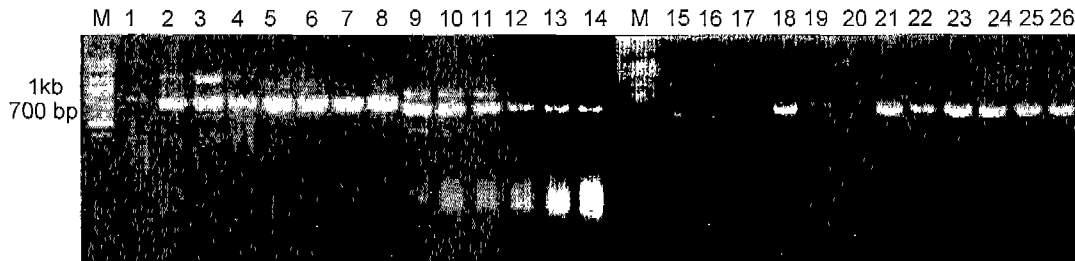
**교차접합시험(Transconjugation)에 의한 내성 전달 검사.**

시험균주에서 피전달균주인 *E. coli* RG 176 nal<sup>r</sup>로 plasmid 배

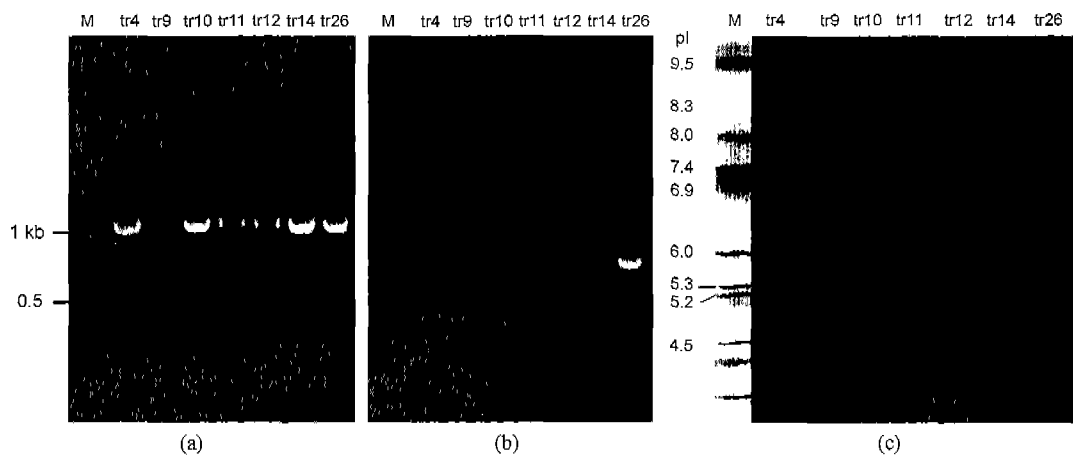
개에 의해서 내성이 전달된 것을 확인하기 위하여 ceftazidime (32 µg/ml)과 nalidixic acid (50 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar 배지에 균을 접종하여 얻어진 결과는 다음과 같았다. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 1 균주와 *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* 5 균주가 내성이 전달되었다. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*의 transconjugant는 pI 5.9에서 생성물을 형성하였고 *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*의 transconjugant 경우 1 균주는 pI 5.9와 5.4에서, 나머지 균주들은 pI 5.9에서 하나의 생성물을 형성하였다(Fig. 5c). PCR결과 이들은 모두 TEM형이 전달되었다. *Enterobacter*속의 균주들의 경우 *E. sakazakii*에서는 모두 내성이 전달되지 않았지만 *E. cloacae* 1 균주에서 내성이 전달되었다. *E. cloacae*의 transconjugant는 등전점을 형성하지 못하였지만



**Fig. 3.** TEM type products by PCR. Lane M, standard marker; lane 1, EL000301; lane 2, EL000302; lane 3, EL000303; lane 4, EL000304; lane, 5 EL000405; lane, 6 EL000406; lane 7 EL000407; lane 8, EL000408; lane 9, EL 000523; lane 10, EL 000524; lane 11, EL 000625; lane 12, EL 000626; lane 13, EL000627; lane 14, EL 000628; lane 15, EL 000409; lane 16, 000410; lane 17, EL 000413; lane 18, EL 000414; lane 19, EL 000417; lane 20, EL 000418; lane 21, EL 000421; lane 22, EL 000422; lane 23, EL 000411; lane 24, EL000412; lane 25, EL 000416; lane 26, EL 000419 and lane 27. Lane number 1-8, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; lane number 9-14, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; lane number 15-22, *Enterobacter sakazakii*; and lane number 23-26, *E. cloacae*.



**Fig. 4.** SHV-type products by PCR. Lane M, standard marker; lane 1, EL000301; lane 2, EL000302; lane 3, EL000303; lane 4, EL000304; lane, 5 EL000405; lane, 6 EL000406; lane 7 EL000407; lane 8, EL000408; lane 9, EL 000523; lane 10, EL 000524; lane 11, EL 000625; lane 12, EL 000626; lane 13, EL000627; lane 14, EL 000628; lane 15, EL 000409; lane 16, 000410; lane 17, EL 000413; lane 18, EL 000414; lane 19, EL 000417; lane 20, EL 000418; lane 21, EL 000421; lane 22, EL 000422; lane 23, EL 000411; lane 24, EL000412; lane 25, EL 000416; lane 26, EL 000419 and lane 27. Lane number 1-8, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; lane number 9-14, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; lane number 15-22, *Enterobacter sakazakii*; and lane number 23-26, *E. cloacae*.



**Fig. 5.** PCR and IEF patterns of  $\beta$ -lactamases produced by transconjugation in *E. coli* RG488 Rif<sup>r</sup>. (a), (b) is TEM, SHV type products by PCR, respectively and (c) is IEF products. Lane M, Standard marker lane tr4, tr000304; lane tr9, tr000523; lane tr10, tr000524; lane tr11, tr000625; lane tr12, tr000626; lane tr14, tr000628 and lane tr26, tr000419. Abbr. tr, transconjugant.

PCR 결과 SHV형이 전달되어진 것이 확인되었다(Fig. 5). 각각의 모균주인 전달균주와 피전달균주 *E. coli* RG 176 nal<sup>r</sup>는 위 배지에서 성장하지 못하였다.

## 고 찰

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase를 생성하는 장내세균은 국내외를 막론하고 임상 가검물로부터 얻어진 것들이었다. 이 논문은 국내에서 처음으로 임상 가검물 이외의 종말하수처리수에서 장내세균을 분리하고 교차접합시험을 통하여 그들 중 일부가 plasmid 매개에 의해서  $\beta$ -lactamase 생성 유전인자를 피전달균주인 *E. coli* RG 176 nal<sup>r</sup>에게 전달시키는 것을 확인함으로써, ESBL 생성 균주들이 임상 가검물뿐 아니라 자연계까지 확산되어 있음을 확인한 연구이다. ESBL생성 유전인자는 plasmid를 통하여 쉽게 다른 세균으로 전파될 수 있으며(6,12,13) 자연계에서 이 능력을 획득한 세균이 인체로 재유입의 위험성을 가지고 있기 때문에 차후 자연계내에서 분리되는 ESBL 생성 균종에 대한 현황파악과 분리원에 대한 보다 체계적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaena*, *Enterobacter cloacae*, 및 *E. sakazakii*는 모두 인체에 기회 감염을 일으키는 병원성 세균들이다. *Enterobacter*속의 세균들은 장관계에 기회감염의 원인균일 뿐만 아니라 병원성 감염균으로 중요하여, 장기 입원환자들에게 폐렴이나 요로감염, 패혈증 등 전신감염도 일으키며 특히 중환자실이나 외과수술환자의 환부로부터 우점종으로 분리되는 중요한 병원성 균주들이다(9,16,21).

임상에서 분리된 ESBL 생성균주에 대한 연구는 기회감염균과 원내감염균으로 매우 중요한 *Escherichia coli*와 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*에 대하여 집중적으로 연구되고 있으며 이에 대한 형별분류도 매우 다양한 것으로 보고되고 있다(6,7,12,13). 우리나라에서는 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*의 경우 TEM-52형이 유행되는 것으로 보고되었고(4,20) *K. pneumoniae* subsp. *ozaena*에 대한 ESBL연구는 우리나라를 비롯한 세계 각 국에서도 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*에 비하여 상대적으로 연구가 덜된 상태이다.

Synergy 현상을 확인하는 약제간의 거리는 다소 변화가 있어 15-30 mm까지 다양하며(1,3,9), 본 실험 결과 *Klebsiella*속의 균주들은 모두 15 mm거리에서 전형적인 synergy 현상이 나타났지만, *Enterobacter*속의 균주들은 이 거리에서 모두 음성으로 나타났고 10 mm로 거리를 좁혔을 때 synergy 현상이 확인되었다. 이 거리는 기존에 알려진 결과들보다 짧았다(9,21).

본 연구에서 분리된 *Klebsiella*속의 균주들은 PCR 상에서 TEM형 생성물을 형성하였고, pI 수치가 5.4부근과 6.0부근에서 생성되었으며 교차접합시험결과 transconjugant에 내성인자를 전달시킨 균주들은, 전형적인 TEM형의 ESBL 생성 균주로 생각된다. Transconjugant *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* tr000304는 pI 5.9와 5.4중 5.9 1개만 전달받았지만, transconjugant *K.*

*pneumoniae* subsp. *ozaena* tr000524는 두 개 모두 전달 받았다.

*Enterobacter*속의 균주들은 PCR 결과에서는 SHV와 TEM형을 동시에 가지고 있었고, 얻어진 pI값도 이와 잘 일치되었다. 그러나 이들은 대부분 교차접합이 일어나지 않았다. 유일한 transconjugant *Enterobacter cloacae* tr000419는 모균주가 기존에 밝혀진 SHV형의 등전점 수치들 보다 훨씬 높았으며( $\geq 8.5$ ), 비록 등전점을 형성하지 못하였지만, PCR 결과, SHV형의 유전인자를 plasmid에 의해서 전달받았기 때문에 새로운 형태의 SHV형 ESBL 생성 균주일 가능성도 배제할 수 없다(Fig. 2, Fig. 5).

본실험에서 얻어진 균주들의 ESBL 유형은 유전자의 서열분석이 이루어지지 않아서 정확하게 확정지을 수는 없다. pI 값과 PCR 결과를 고찰하였을 때 등전점을 기준으로 같은 pI 수치를 가지더라도 다양한 형들이 존재할 수 있고, pI수치 자체도 명확한 변별력을 가지고 있지 않기 때문이다. 그러나 기존에 국내에서 이루어진 보고들을 감안한다면, pI 5.4의 경우는 TEM-1형, pI 5.9(또는 6.0)의 경우 적합한 유형은 TEM-4, TEM-15형과 TEM-52형 등 다양한 유형으로 나뉘어질 수 있지만 TEM-52형으로(4,20)으로 보는 것이 타당할 것으로 생각된다. pI 8.0의 유형은 이와 매우 근접하게 가까운 SHV-5형(pI 8.2)과 SHV-12형(pI 8.2) 2 가지를 고려해 볼 수 있다. 그러나 우리나라에서는 이미 *K. pneumoniae*로부터 SHV-12가 분리되어 보고되었기 때문에(14) SHV-12일 가능성이 보다 높은 형별로 생각되어진다(Table 1).

## 감사의 말

본 논문은 1999년 동원학술재단의 학술연구비 지원으로 수행되었습니다. 참조균주 SHV-3를 제공해 주신 단국대학교 배현주 교수님께 심심한 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. 김운태, 이훈구. 2000. 부산시내 종합병원의 임상검체에서 분리된 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae*의 형별분류. 한국미생물학회지 36, 221-227.
2. 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정운섭, 김의종, 조동택. 1997. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase의 유형 및 특징. 감염 29, 93-103.
3. 이경원, 조성란, 이창숙, 정운섭, 권오현. 1994. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 26, 341-348.
4. 이선화, 김미나, 최수진, 정화순. 2000. 임상 검체에서 분리된 *Escherichia coli*의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성. 대한임상병리학회지 20, 400-409.
5. Bush, K. 1989. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 259-263.
6. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
7. Bush, K. and G. Jacoby. 1997. Nomenclature of TEM  $\beta$ -lacta-

- mases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1-3.
8. Ewing, W.H. 1986. The genus *Klebsiella*. In W.H. Ewing, Edwards and Ewings Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier, N.Y.
  9. Giakkoupe, P., L.S. Tzouveleki, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou, and E. Tzelepi. 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A  $\beta$ -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2247-2253.
  10. Grimont, F., P.A.D. Grimont, and C. Richard. 1991. The genus *Klebsiella*, p. 2775-2796. In A. Balows (eds.), *The prokaryotes Vol III*, 2nd ed. Springer-Verlag, N.Y.
  11. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Genus *Enterobacter*. p.178. In *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland.
  12. Jacoby, G.A. 1994. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 2-11.
  13. Jacoby, G.A. and I. Carreras. 1990. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. 1990. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 859-862.
  14. Kim, J., Y. Kwon, H. Pai, J.W. Kim, and D.T. Cho. 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1446-1449.
  15. Kirby, R. 1992. Evolutionary origin of the class A and class C  $\beta$ -lactamases. *J. Mol. Evol.* 34, 345-350.
  16. Matsumoto, Y. and M. Inoue. 1995. Characterization of SFO-1 a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 307-313
  17. Matthew, M., A.M. Harris, M.J. Marshall, and G.W. Ross. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *General Microbiol.* 88, 169-178.
  18. Medeiros, A.A. 1993. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann. Intern. Med.* 119, 428-430.
  19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS document M2-A6. NCCLS, Wayne, Pa.
  20. Pai, H.J, S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim, and Y. Kwon. 1999. Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.
  21. Pitout, J.D., K.S. Thomson, N.D. Hanson, A.F. Ehrhardt, P. Coudron, and C.C. Sanders. 1998. Plasmid-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 596-600.

(Received September 5, 2001/Accepted October 18, 2001)

**ABSTRACT: Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) Producing *Klebsiella* and *Enterobacter* Isolated from Sewerage Plant Drain Water at Kwang-An in Pusan**  
**Hun-Ku Lee** (Department of Microbiology, Pukyong National Univ., Pusan 608-737, Korea)

The emergence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria is causing very serious problems in Korea. Although there have been many reports about these bacteria isolated from patients and clinical specimens, there is no report of ESBL-producing organisms isolated from natural environment in Korea. This is the first study on the ESBL producing bacteria out of the medical system in Korea. Twenty-six ESBL producing bacteria were isolated only from sewerage plant drain water at Kwang-an beach among the sampling collected sites including snakehead fish plants in Myungi, Aquaculture Engineering Lab. in Pukyong National University and two public-bathrooms in Pusan, Korea. ESBL producing bacteria were identified by double-disk synergy test, conjugation, isoelectric focusing values and PCR. The species of ESBL producing bacteria were *Enterobacter cloacae* (4 strains), *E. sakazakii* (8 strains) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (8 strains) and *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. (6 strains). TEM and SHV specific PCR products were detected from all the ESBL strains produced TEM+SHV products on the PCR plates. The pI values of ESBL produced by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, and *E. sakazakii* were 5.9, 5.9+5.4; 5.9, 5.9+5.4;  $\geq 8.5$ , 8.0+5.4, and 8.0+5.4, respectively on the IEF. Seven strains of the isolates were transferred their genes to *E. coli* RG488 Rif<sup>r</sup> by conjugation.