

세 가지의 ESBL 유전자를 가지고 있는 *Klebsiella pneumoniae*의 유전자접합체와 형질전환체의 항생제내성분석

김 윤 태*

부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과

Received September 11, 2007 / Accepted October 12, 2007

Analysis of Antibiotic Resistant Patterns in Conjugant and Transformant of Three ESBL gene Harboring *Klebsiella pneumoniae*. Yun Tae Kim*. *Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea* - To investigate the antibiotic resistant patterns of the bacteria producing ESBL, we isolated one organism of *Klebsiella pneumoniae* from a clinical laboratory in Busan. The organism that produces ESBL gene was detected by double disk synergy test and the presence of three ESBL genes (TEM-1, SHV-12, CTX-M-15) was confirmed by polymerase chain reaction and DNA sequencing analysis. To analyse the characteristics of three ESBL genes, we performed transconjugation, transformation and cloning experiment with the organism. The MIC of *Klebsiella pneumoniae* was revealed that ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone were 256 µg/ml, 128 µg/ml and 128 µg/ml respectively. The MIC of conjugant (*E. coli* RG176^{Na^o}) was revealed that ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone were 256 µg/ml, 64 µg/ml and 128 µg/ml respectively. The MIC of transformant (*E. coli* DH5a) was revealed that ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone were 128 µg/ml, 32 µg/ml, and 32 µg/ml respectively. The MIC of cloned organism of SHV-12 gene (*E. coli* DH5a) was revealed that ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone were 128 µg/ml, 8 µg/ml, and 32 µg/ml respectively. The results indicated that MIC of conjugant was higher than MIC of transformant and also SHV-12 gene were not resistant against cefotaxime antibiotic.

Key words – *Klebsiella pneumoniae*, ESBL gene, TEM-1, SHV-12, CTX-M-15

서 론

*Klebsiella pneumoniae*는 장내세균과에 속하는 세균으로서 자연계에 널리 분포하며 사람의 대장내 상재균총을 형성하며 상기도, 구강 등에도 존재한다[1]. ESBL (Extended spectrum β-lactamase)이란, 주로 그람음성세균이 생성하는 효소로서 Extended spectrum β-lactam 항생제를 무력화 시킨다[3]. Extended spectrum β-lactam 항생제는 3세대 cephalosporin 으로서 1980년대 초부터 임상에서 감염증 치료에 흔히 사용되어왔고 지금까지도 병원에서 많이 사용되는 항생제 계열이다. 근래 이들 약제에 대해 내성을 나타내는 ESBL생성 균의 증가가 심각한 문제로 대두되었다[26]. 현재 임상에서 나타나는 ESBL의 종류는 다양한데 주로 TEM형, SHV형, CTX-M형이 나타난다. TEM형은 1960년대 초에 그리스에서 Temoniera라는 패혈증환자의 검체에서 분리된 *E. coli*로 부터 처음으로 검출되어 보고되었다. 그래서 이 환자의 이름을 따서 TEM형이라고 명명하였다[3]. SHV형은 sulphhydryl variable 의 약자로 표시한 것인데 주로 *K. pneumoniae*의 chromosome에 존재한다. 하지만 plasmid에 매개되어 자주 *E. coli*에서 발견된다[3]. SHV형은 1980년대에 독일에서

분리된 *Klebsiella ozaenae* 균주에서 처음 검출되었다[3]. CTX-M형은 1986년에 일본에서 non-TEM, non-SHV형이 처음 발견 되었는데 이때 β-lactam 항생제를 연구하기 위해 사용한 개의 변으로부터 분리한 *E. coli* 균주에서 처음으로 검출되었다[15]. 이 CTX-M형 ESBL은 cefotaxime에 강한 내성을 보였다고 해서 이 cefotaxime 항생제의 이름을 따서 CTX-M이라고 명명하였다[2]. 그리고, 유전자의 표기는 통상적으로 β-lactamase의 약어로 bla를 이탤릭체로 앞에 붙이고 그 뒤에 형질의 이름을 아래첨자로 표기하는 데 예를 들어 TEM형 유전자는 bla_{TEM}, SHV형 유전자는 bla_{SHV}, CTX-M형 유전자는 bla_{CTX-M}으로 표기한다[3].

현재까지 알려진 장내세균이 생성하는 ESBL의 유형은 200가지 이상으로 매우 다양하다[20]. TEM형과 SHV형은 TEM-1, TEM-2, SHV-1의 아미노산 중 1-4개가 유전자의 점변이(point mutation)에 의하여 다른 아미노산으로 치환됨으로써 TEM-1, TEM-2, TEM-3, SHV-1, SHV-2, SHV-3 등으로 새로운 형질이 보고되었다[13,14,24]. ESBL 유전형은 국가에 따라 다른데, 프랑스에는 TEM-3, 미국에는 TEM-10, TEM-12 및 TEM-26, 그리스에는 SHV-5가 많은 것으로 알려졌으며 [3]. 우리나라에서는 TEM-52, SHV-2a, SHV-5, SHV-1등이 많이 보고되었다[7]. 또한 CTX-M형 ESBL은 1989년 독일에서 분리된 *E. coli*에서 처음 발견되었으며, 이후 유럽, 남아메리카, 동아시아, 아프리카 등 전 세계 여러 국가에서 보고되었

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-0820, Fax : +82-51-510-0568

E-mail : ytkim@cup.ac.kr

다[4]. 감수성인 세균은 항균제를 생성하는 미생물이나 근원을 알 수 없는 미생물로부터 내성 유전자를 획득하는 데 그 기전은 내성유전자 DNA가 plasmid에 위치해 있을 때는 plasmid가 전달될 때 함께 다른 세포로 이동하여 내성을 발현한다[11].

ESBL 생성균주들은 주로 plasmid 매개성으로 plasmid를 통하여 내성을 다른 균주로 이동시키는 것으로 알려졌다[1]. 여러 가지 β -lactamase 유전자는 plasmid에 위치하므로써 다른 세포로 전파가 되는데 이 유전자는 plasmid 내의 transposon 또는 integron에 위치함으로 내성인자의 수평 전이가 가능하게 되는 것이다[8]. 근래 plasmid에서 관찰되는 내성유전자의 대부분은 다른 미생물의 염색체에서 유래된 것으로 추정된다. 예를 들면, plasmid성 SHV β -lactamase 유전자는 *K. pneumoniae*의 염색체에서 비롯되었고, CTX-M β -lactamase 유전자는 *Kluyvera spp.*의 염색체에서 유래되었다고 추정된다[3]. 또한 plasmid에는 많은 내성유전자가 포함되어 있는데 과거 1970년대 까지만 해도 2-3가지의 plasmid를 보유한 세균이 드물었으나 근래 분리한 장내세균 중에는 5-6가지의 plasmid를 보유한 것이 흔하다. 뿐만 아니라 한 종류의 plasmid가 각기 다른 종류의 β -lactamase 유전자를 가지고 있기도 한다[12]. 이러한 많은 내성유전자를 가지며 여러 가지의 항생제에 내성을 일으키는 세균의 출현은 지역에 따라서 차이가 많으며, 같은 병원 안에서도 병실에 따라서 다를 수 있고, 중환자실분리 세균 중에는 내성세균이 특히 많다[6].

본 연구에서는 임상에서 분리한 균주가 세 가지의 내성 유전자를 가지고 있는 것을 확인 하였다. 이 세 가지 유전자를 각기 분리하여 PCR과 염기서열분석 등을 이용하여 그 유전적 형질을 규명하고 접합과 형질전환 등을 이용하여 유전자를 재조합하여 균주를 배양시켰다. 이렇게 각기 재조합된 균주들을 3세대 cephalosporin 항생제인 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone으로 항생제 내성 발현 정도를 비교 분석 하였다.

세균의 항균제에 대한 내성조사는 적절한 항균제를 선택하여 세균에 감염된 환자의 치료에 도움이 되고, 내성 세균에 대한 대책을 세우기 위해서 필요한 중요한 일이라고 생각된다. 따라서 세균의 항생제 내성연구와 내성 확산의 방지를 위한 역학조사에 도움이 되고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

대상균주

부산시내 소재 종합병원 내과에서 미생물검사실로 의뢰된 객담 검체에서 분리된 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (Strain No. 60031)를 대상으로 하였다. 균주의 동정은 VITEK (Vitek System, Hazelwood Inc., MO)의 GNI card에 시험균을 접종하여 생화학적 시험을 하고 동정하였다.

이중디스크 확산법(Double disk synergy test)

McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 미리 만든 4 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA) 평판배지에 고르게 도말 하였다. 이 평판배지의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 μ g, Becton Dickinson, USA) 디스크를 얹어 놓고 그 주변 1.5 cm 간격에 cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g) 디스크를 올려놓아 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과 (synergism)를 판정하였다(Fig. 1).

PCR (polymerase chain reaction)

ESBL 효소를 생성하는 유전형의 분석을 위해 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 시험균주를 TS 액체배지(tryptic soy broth)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하여 10,000 rpm에서 10분간 원심한 후 침전물을 AccPrep[®] plasmid extraction kit (BIONEER Co. Ltd. Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 주형으로 사용하였다. 중합효소 연쇄반응에 의한 ESBL형 감별 시험에 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다. TEM형, SHV형, CTX-M형의 β -lactamase 유전자의 염기서열은 GenBank(<http://www.nlm.nih.gov>)에서 찾아서 oligonucleotides를 제작하였다.

PCR에 사용된 시약은 AccuPower[®] PCR Premix Kit (BIONEER Co. Ltd. Korea)를 사용하였는데, 키트의 시약 조성은 Tris-HCl(pH 9.0) 10 mM, dNTP 250 μ M, Taq DNA polymerase 1U, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM, stabilizer and tracking dye 이었으며, 여기에 primer (10 pmol/ μ l)를 각각 1 μ l, template DNA 8 μ l 3차 증류수 10 μ l를 가하여 총량이 20 μ l 되게 맞춘 후 사용하였다. PCR 기기는 Mycycler[™] ThermalCycler (Bio-rad. USA)를 사용하였다. TEM type의 PCR 반응 조건은 predenaturation을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 시행 후 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing은 45 $^{\circ}$ C에서 90

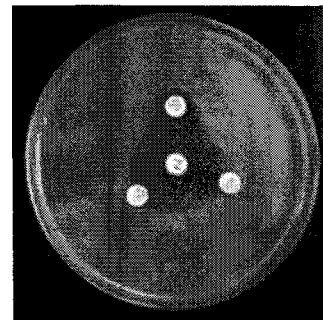


Fig. 1. Double disk synergy test of strain No. 60031. Assessment of antimicrobial synergy of ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone (three disk of the periphery) and clavulanic acid (disk of the center). ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* strain shows positive double disk synergy between disks containing three antibiotics.

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used PCR in this study

Name	Nucleotide sequence	Product size(bp)	GenBank accession
TEM F ¹⁾	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080	A13194682
TEM R ²⁾	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC		
SHV F	5'-TCGTTATGCGTTATATTCGCC	861	AY826416
SHV R	5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT		
CTX-M F	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG	551	X92506
CTX-M R	5'-ACCGCGATATCGTTGGT		
SHV-12 ³⁾	5'-AGAAGCTTATGCGTTATATTCGCTGTG	870	In this study
SHV-12 ⁴⁾	5'-AGGGATCCTTAGCGTTGCCAGTGCTC		

¹⁾Forward ²⁾Reverse

³⁾Forward primer for cloning PCR ⁴⁾Reverse primer for cloning PCR

초, extension은 72℃에서 1분으로 하여 30 cycle을 실시하였다. Final extension은 72℃에서 3분으로 하였다. SHV type의 PCR의 경우 predenaturation을 94℃에서 5분간 시행 후 denaturation은 94℃에서 30초, annealing은 58℃에서 60초, extension은 72℃에서 1분으로 하여 30 cycle을 실시하였다. Final extension은 72℃에서 3분으로 하였다. CTX-M type은 predenaturation을 94℃에서 5분간 시행 후 denaturation은 94℃에서 30초, annealing은 58℃에서 60초, extension은 72℃에서 1분으로 하여 30 cycle을 실시하였다. Final extension은 72℃에서 3분으로 하였다. 반응이 끝난 PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 100 volt로 25분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 생성물을 확인하였다.

염기서열 분석(DNA sequence analysis)

PCR에 의하여 증폭된 산물의 염기서열을 분석하여 유전형을 규명하였다. PCR 산물을 gel에서 분리하여 template로 이용하여 sequencing용 PCR을 실시하였다. Sequencing용 PCR 시 primer는 forward와 reverse를 각각의 tube에 1 µl (5 pmol/µl) 넣고 Big dye terminator II 4 µl, template 5 µl를 넣어 총량이 10 µl가 되도록 하였다. PCR 조건은 96℃에서 5분간 predenaturation을 실시하고, 95℃에서 10초간 denaturation, annealing은 PCR annealing 온도에서 4초간 실시하였으며, 60℃에서 4분간 extension을 실시하여 25 cycle 동안 반응하였다. 최종 incubation은 72℃에서 10분간 실시하였다. Sequencing용 PCR이 끝나면 결과물 10 µl에 3 M sodium acetate(pH 4.6) 1 µl와 100% ethanol 25 µl를 첨가하여 -70℃에서 1시간 이상 침전시킨 다음 원심분리 (22,000 ×g, 15 min, 4℃)하여 상등액을 제거하고 70% ethanol 100 µl로 씻어 준 다음 원심분리 (22,000×g, 20 min 4℃) 하였다. 모아진 pellet을 10분간 vacuum dry 하고 TSR (Template Suppression Reagent) 25 µl에 녹여 96℃에서 1분 30초간 방치한 후 ice에 정치 후 ABI Prism 310 (Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 결정하였다.

교차접합시험(Transconjugation Experiment)

분리된 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주를 전달균주로 하고 *E. coli* RG176^{Na}를 피전달균주로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 시험균주들은 모두 TSB (tryptic soy broth)에서 배양된 대수 증식기 중반의 신선한 균주를 선정하였다. 전달균주와 피전달균주의 균체 수 비율을 1:1이 되게 하여 새로운 TSB에 혼합한 후 37℃에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 멸균된 면봉에 적셔 ceftazidime (30 µg/ml) + nalidixic acid (16 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar에 고르게 도말하고 37℃에서 18시간 배양하여 균 집락 생성 유무를 조사하였다. MacConkey agar에 자란 균 집락을 재동정하여 생화학검사와 항균제 감수성검사를 실시하여 피전달균주인 *E. coli*로 내성이 전달되었는지를 확인하였다.

형질전환시험(Transformation)

대상균주가 가지고 있는 유전자의 형질을 분석하여 TEM-1과 SHV-12 그리고 CTX-M-15 의 세 가지 유전자를 모두 가지고 있는 것을 확인 한 후 형질전환 실험을 하였다. 먼저 시험균주를 TSB (tryptic soy broth) 배지에 접종하고 37℃에서 18시간 배양하였으며, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 AccPrep[®] plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. Competent cell (*E. coli*DH5α) 100 µl에 대상균주 plasmid DNA 10 µl를 첨가한 후 혼합하였다. 얼음 위에 10분 동안 방치한 후 42℃ water bath에 90초 동안 tube를 넣어두었다. Heat shock 직후 2분 동안 얼음에 tube를 보관 한 뒤 LB 액체배지 100 µl 씩 첨가하고, 37℃ shaking incubator에 약 1시간 동안 배양시켰다. Ampicillin 항생제(100 µg/ml)가 함유되어 있는 LB 평판배지에 X-Gal (50 mg/ml) 20 µl를 도말한 후 형질전환 시킨 배양액 20 µl씩 분주하여 도말 하고 37℃에서 18시간 이상 배양하였다.

LB 평판배지에서 자란 백색집락을 선택하여 다시 항생제가 포함된 LB 액체배지에 배양시켜서 plasmid DNA를 추출하여 PCR을 통해 형질전환 되었는지를 확인하였다. 또한 항

생체 감수성 검사와 생화학 검사를 실시하여 균의 특성을 확인하였으며, 특히 double disk synergy test로 ESBL gene의 발현이 되었는지를 확인하였다.

클로닝(Cloning of SHV-12 gene)

대상균주의 plsmid DNA에 존재하는 SHV-12 gene만을 Teasy Vector System I(Promega, USA)를 사용하여 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켜서 내성유전자발현을 조사하였다. Cloning insert 준비를 위한 PCR primer는 Bioneer (Korea) 사에 의뢰하여 제작하였으며 각각의 primer는 Table 1에 나타내었다. PCR amplification은 Mycycler^{PM}ThermalCycler (Bio-rad, USA)를 사용하였다. PCR의 생성물을 전기영동 후 band를 확인하였고, gel로부터 원하는 DNA band를 잘라내어 QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 DNA를 정제하였다. Teasy vector 0.5 μl를 넣은 E-tube에 상기에서 정제한 DNA 1.5 μl를 넣고 10×ligation buffer [500 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 200 mM DTT (dithiothreitol), 10 mM ATP] 2.5 μl와 ligase 0.5 μl (5U)를 넣은 후 22°C water bath에 30분 동안 반응시켰다. 이렇게 제작한 ligation mixture DNA 5 μl를 competent cell (*E. coli* DH5α) 100 μl에 첨가한 후 vortexing하였다. 이것을 얼음 위에 30분 동안 보관한 후 42°C water bath에 30초 동안 tube를 넣어두었다. Heat shock 직후 2분 동안 얼음에 tube를 보관 한 뒤 LB 액체배지 900 μl씩 첨가하고, 37°C shaking incubator에 약 1시간 동안 배양시켰다. Ampicillin 항생제 (100 μg/ml)가 함유되어 있는 LB 평판배지에 X-Gal (50 mg/ml) 20 μl를 도말한 후 배양액 20 μl씩 분주하여 도말 하고 37°C에서 18시간 이상 배양하였다.

LB 평판배지에서 자란 백색 집락을 선택하여 LB 액체배지에 배양시켜서 plasmid DNA를 추출하여 제한효소 *Pst*I로 처리한 후 전기영동을 실시하여 insert DNA의 염기서열이 T-vector promoter 발현방향으로 insertion 되었는지를 확인하였다(Fig. 2). 또한 항생제 감수성 검사와 생화학 검사를 실시하여 균의 특성을 확인하였으며, 특히 double disk synergy test로 ESBL gene의 발현이 되었는지를 확인하였다.

한천 평판희석법을 이용한 항생제 최소억제농도의 측정

대상균주를 교차접합을 통하여 발현 시킨 균주와 플라스미드를 추출하여서 Heat shock을 통하여 형질전환 시킨 균주와 클로닝을 통하여 SHV-12 gene만을 재조합 시켜 발현된 균주들을 한천희석 방법으로 세 가지 항균제(cefazidime, cefotaxime, ceftriaxone)의 최소억제농도를 측정하여 비교하였다. 항생제농도의 측정은 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) guide[16]를 참고 하였다.

증류수를 담은 시험관 13개를 멸균 해 놓고 그 시험관에서 항생제를 녹였다. 항생제는 역가를 계산하고 난 후 5120

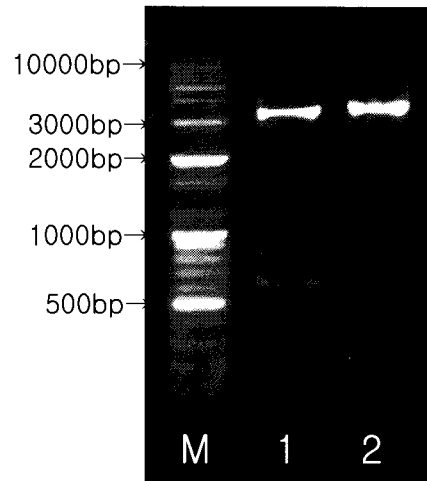


Fig. 2. Electrophoresis of the plasmid DNA from cloned strain on 1.5% agarose gel. Lanes 1; The plasmid DNA from cloned strain was restricted by *pst*I. Two band revealed at 637bp and 3261bp. Confirmed the DNA sequence of SHV-12 gene insert into T-vector as correct direction. Lanes 2; Unrestricted plasmid DNA from cloned strain, only one band revealed at 3898bp. M; size marker.

μg/ml 되게 농도를 계산하여 멸균 해 놓은 시험관에서 녹인 후 이것을 2배씩 희석하여 13 단계를 제조 해 놓았다. Mueller Hinton 배지를 만들어 plate 당 위의 항생제 희석액 1 ml 와 Mueller Hinton 배지 19 ml를 잘 섞어 제조하였다. 배지의 온도는 최대한 낮추어 항생제의 역가가 떨어지지 않도록 하였다.

이렇게 해서 최고농도가 256 μg/ml되고 총 농도가 0.06-256 μg/ml까지 13단계 되게 희석하였다. 실험 할 대상균을 tryptic soy broth (TSB) 또는 LB broth에 접종한 후, 두 시간 지나서 MacFaland 농도 0.5가 되게 맞추고 여기에 멸균 saline을 균액과 10:1 비율로 희석하여 위에서 항생제를 첨가하여 만들어 놓은 Mueller Hinton 배지에 100 μl씩 분주하여 삼각 유리병으로 골고루 퍼서 접종하였다. 접종한 배지는 균액이 스며들 때까지 기다렸다가 37°C 배양기에서 하룻밤 배양한 후, MIC를 측정 하였다.

결과 및 고찰

ESBL 생성균주 확인

cefotaxime (30 μg), ceftazidime (30 μg), ceftriaxone (30 μg) 세 가지의 디스크주위에 억제대가 나타나서 synergy 시험 양성으로 ESBL효소의 생성이 확인 되었다(Fig. 1).

본 실험에서 사용 한 이중디스크 확산법은 ESBL 생성균주의 확인을 위해 임상실험실에서 가장 많이 사용되는 방법이다. 이중디스크 확산법으로 ESBL 생성균주를 확인하는 방법의 원리는 다음과 같다. ESBL효소는 clavulanic acid, sul-

bactam, tazobactam 등의 inhibitor에 억제되는 특징이 있다 [3]. 이러한 억제제에 효소의 활동이 저해 되는 동안 3 세대 cephalosporin의 약제 주위에 synergy 현상이 일어나는 것이다. 즉, 다시 말해서 synergy 현상이 일어나지 않는다는 것은 억제제에 반응 하지 않는다는 것이고 이는 ESBL효소를 가지지 않은 세균이라고 추정할 수 있는 것이다. 본 실험에서는 억제제로서 clavulanic acid를 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 3 세대 cephalosporin 약제와 clavulanic acid 사이에서 뚜렷한 synergy 현상(Fig. 1)을 나타내어 ESBL효소의 생성균주임이 증명되었다.

ESBL 균주를 검출하는 방법으로는 이중 디스크 확산법 이외에 E-test, 분자생물학적 방법, 자동화기기를 이용한 방법 등이 있다[25]. 이중에서 최근에 개발된 자동화기기를 이용한 ESBL 검출법(Vitek system)은 기존의 검출법과 비교 시 매우 일치율이 높으며[23], 또한 빠르고 간편하게 ESBL 생성균을 검출할 수 있는 장점이 있다 [5]. 본 연구에서의 실험대상 균주는 이중 디스크 확산법과 자동화기기인 Vitek system (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO, USA)의 GNS 433 card 를 이용하여 동시에 ESBL 생성균주임을 확인 하였다.

TEM,SHV,CTX-M의 유전자 검출 및 각각의 유전적 형질 규명

본 실험의 대상균주인 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* (No. 60031)는 PCR을 시행한 결과 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 의 세 가지 유전자가 모두 검출되었다. *bla*_{TEM}은 1080bp에서 band가 확인 되었고, *bla*_{SHV}은 861bp에서 band가 확인 되었고, *bla*_{CTX-M}은 551bp에서 band가 확인 되었다(Fig. 3). 이렇게 한 균주가 plasmid상에 세 가지 내성유전자를 동시에 가지

는 경우는 흔치 않은 일이다. 염기서열 분석을 통하여 확인된 결과 *bla*_{TEM}은 TEM-1이었고, *bla*_{SHV}은 SHV-12이었고, *bla*_{CTX-M}은 CTX-M-15로 분석 되었다.

본 실험에서 나타난 TEM-1 형은 1965년 그리스 환자에서 분리한 *E. coli*에서 처음 발견되었는데 대부분의 그람음성세균에서 발견되는 β-lactamase 유전형이다. 그리고 SHV-12는 스위스에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 에서 처음 검출되었다[18]. 이 효소는 SHV-1의 아미노산 3개가 치환된 (Leu35Gln, Gly238Ser, Glu240Lys) 것이며, 국내에서 분리되는 장내세균에서도 흔히 생성하는 것으로 알려져 있다[10]. CTX-M-15 ESBL은 2001년 인도에서 처음 분리된 것으로 아시아와 유럽을 중심으로 보고되고 있다[17]. 이 효소는 CTX-M-1의 다섯 군데의 아미노산(Asp114Asn, Ser140Ala, Val177Ala, Asn240Gly, Asn288Asp)이 치환된 것[22]으로 국내에서도 여러 번 발견된 바 있다[19]. 또한 CTX-M-15유전자는 최근에 국내에서도 급증하고 있다는 보고가 있다[9].

내성유전자의 전달

본 연구에서는 접합(transconjugation)과 형질전환(transformation)으로 내성 전달 시험을 시행하였다. 내성 획득의 원인이 염색체성인가 혹은 plasmid 매개에 의한 것인가를 확인하기 위하여 먼저 교차접합시험을 실시하였다. 공시 균주인 *Klebsiella pneumoniae*에서 피전달균주인 *E. coli* RG176^{Na} ①로 내성이 전달된 것을 확인하기 위하여 전달균주와 피전달균주의 균체수 비율을 1:1이 되게 하여 새로운 TSB에 혼합한 후 37℃에서 24시간 이상 배양하였다. 그런 후 항생제가 첨가된 MacConkey 배지에 균주가 아주 미약하게 나타났다. 이 균주를 다시 위의 교차약제가 첨가된 배지에 접종하여 하룻밤 더 균의 성장을 재확인 한 결과 균주가 성장하였다. 이렇게 성장한 균주로 생화학적 시험으로 *E. coli*임을 확인 하였고 이중디스크 확산법으로 ESBL효소 생성균임을 확인 하였으며 disk 확산법으로 항생제내성 시험을 시행하여 내성 전달을 확인 하였다. 그리고 PCR을 이용하여 세 가지 유전자가 모두 이동 한 것을 확인 하였다(Fig. 4). 그리고 인위적인 형질전환으로도 plasmid에 존재하는 세 가지 유전자가 전이될 수 있음을 확인하기 위해 먼저 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (NO. 60031)의 plasmid DNA를 추출하여 heat shock으로 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켰다. 이 transformant로부터 다시 plasmid DNA를 추출한 후 PCR을 실시한 결과 TEM gene, SHV gene, CTX-M gene 등 세 가지 유전자를 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 또한 항생제 감수성 검사와 생화학적 검사를 실시하여 균의 특성을 확인하였으며, 특히 double disk synergy test로 ESBL gene의 발현이 되었는지를 확인하였다. 또한 균주가 가지고 있는 세 가지의 내성유전자 중에서 SHV-12 유전자가 항생제에 작용하는 내성발현의 차이점을 확인하기 위해 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (NO. 60031)에 존

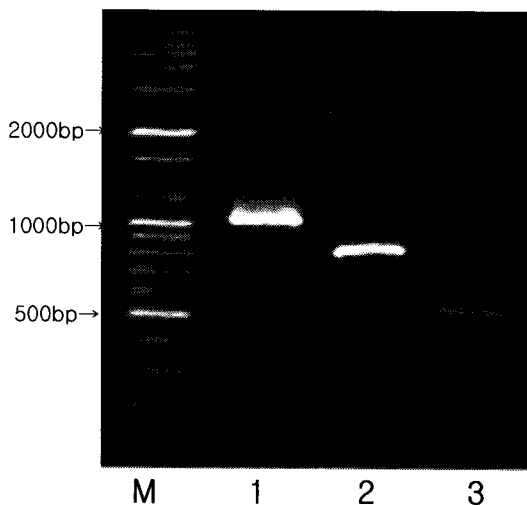


Fig. 3. Detection of amplified products of *bla*_{TEM} gene, *bla*_{SHV} gene and *bla*_{CTX-M} gene. Lanes 1; *bla*_{TEM} band of 1080 bp, Lanes 2; *bla*_{SHV} band of 861 bp, Lanes 3; *bla*_{CTX-M} band of 551 bp. M; size marker.

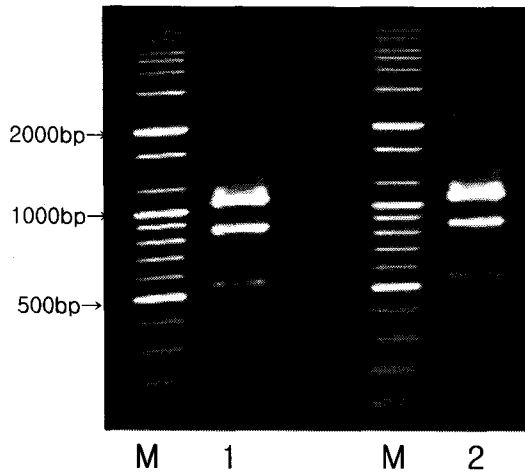


Fig. 4. Detection of multi amplified products of *bla_{TEM}* gene, *bla_{SHV}* gene and *bla_{CTX-M}* gene. Lanes 1; three gene(*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*) harboring conjugant's products, Lanes 2; three gene(*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*) harboring transformant's products, M; size marker.

재하는 SHV-12 gene만을 제한하여 vector를 이용하여 *E. coli* DH5 α 에 재조합하였다. 재조합이 성공한 균주(*E. coli* DH5 α)로 double disk synergy test를 실시하였고 plasmid DNA를 추출하여 PCR과 전기영동을 실시하고 염기서열분석을 시행하여 SHV-12 gene이 내재되어 있는 것을 확인 하였다.

Result of MIC (minimum inhibitory concentration) by agar dilution method

Ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 세 가지 항생제를 한천희석법으로 최소억제농도를 측정 한 결과는 임상에서 분리되어 TEM, SHV, CTX-M의 세 가지 유전자를 갖고 있던 원균주인 *Klebsiella pneumoniae* (NO. 60031)의 MIC는 ceftazidime (30 μ g/ml), cefotaxime (30 μ g/ml), ceftriaxone (30 μ g/ml)이 각각 ≥ 256 μ g/ml, 128 μ g/ml, 128 μ g/ml이었고, 교차접합시험을 위해 수여균주로 사용되었던 *E. coli* RG176^{Na}의 MIC는 0.25 μ g/ml 0.12 μ g/ml, 0.12 μ g/ml이었고, 형질전환을 위해 competent cell로 사용되었던 *E. coli* DH5 α 의 MIC는 0.25 μ g/ml 0.06 μ g/ml, 0.12 μ g/ml이었다(Table 2). 그리고 세 가지 유전자를 갖고 있던 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (NO. 60031)를 공여균주로 하여 *E. coli* RG176^{Na}에 교차접합시킨 conjugant 균주의 MIC는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone이 각각 ≥ 256 μ g/ml 64 μ g/ml, 128 μ g/ml이었다. 세 가지 유전자를 갖고 있던 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (NO. 60031)로부터 plasmid DNA를 분리하여 *E. coli* DH5 α 에 heat shock 방법으로 형질전환 시킨 transformant 균주의 MIC는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone이 각각 128 μ g/ml, 32 μ g/ml, 32 μ g/ml를 나타내었고, 또한 *Klebsiella pneumoniae* 균주 (NO. 60031)로부터 SHV-12 gene 만을 분리하여 vector

Table 2. Result of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) by agar dilution method for *Klebsiella pneumoniae* from clinical isolates, conjugated cell with donor cell, transformed strain and cloned strains with SHV-12 gene

Antibiotics	MIC(μ g/ml)					
	60031 ¹⁾	<i>E. coli</i> RG176 ²⁾	<i>E. coli</i> RG176 ³⁾	<i>E. coli</i> DH5 α ⁴⁾	<i>E. coli</i> DH5 α ⁵⁾	<i>E. coli</i> DH5 α ⁶⁾
ceftazidime	≥ 256	0.25	≥ 256	0.25	128	128
cefotaxime	128	0.12	64	0.06	32	8
ceftriaxone	128	0.12	128	0.12	32	32

- *1)*K. pneumoniae* clinical isolates harboring three genes (TEM, SHV, CTX-M).
- 2)Recipient cell of unconjugated. only resistant to nalidixic acid and susceptible to all antibiotics
- 3)Conjugated cell with donor cell (*K. pneumoniae* of strain No. 60031)
- 4)Competent cell of uncloned strain. Susceptible to all antibiotics
- 5)Transformed strain with plasmid DNA from *K. pneumoniae*.
- 6)Cloned strain with SHV-12 gene from *K. pneumoniae*.

를 이용하여 *E. coli* DH5 α 에 클로닝 시킨 균주는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone이 각각 128 μ g/ml, 8 μ g/ml, 32 μ g/ml을 나타내었다(Table 2). 본 연구에서는 동일 균주 내에 존재하는 내성유전자들을 접합과 열처리에 의한 형질전환을 실시하였다. 또한 이렇게 유전자가 재조합 된 균주들의 항생제 내성 결과를 비교하였다. 접합에 의해 재조합 된 conjugant 균주의 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone의 MIC는 cefotaxime을 제외하고는 원 균주(*Klebsiella pneumoniae*, NO. 60031)의 MIC와 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 형질전환 시킨 transformant 균주(*E. coli* DH5 α)의 MIC는 원 균주(*Klebsiella pneumoniae*, NO. 60031)보다 낮았고, *E. coli* RG176^{Na}에 교차접합 시킨 conjugant 균주의 MIC 보다도 낮았다. 이는 접합의 방법으로 플라스미드에 있는 내성유전자가 다른 세포로 이동 할 때는 염색체에 존재하는 내성유전자도 함께 다른 세포로 넘어갈 수가 있는 반면 인위적인 열처리에 의해 형질전환 시킨 transformant 균주는 환형 플라스미드에 존재하는 내성 유전자만이 수여균주로 옮겨 간 결과가 아닌 가 생각된다[21]. 원 균주(*Klebsiella pneumoniae*, NO. 60031)로부터 SHV-12 gene 만을 분리하여 *E. coli* DH5 α 에 클로닝 시킨 균주는 ceftazidime과 ceftriaxone에는 내성을 나타내었으나 cefotaxime에는 내성을 나타내지 않았다. 이는 SHV-12 gene이 주로 ceftazidime에 내성을 일으키며 ceftriaxone에도 어느 정도 영향을 일으키는 것을 나타내었다. TEM-1 유전자는 ampicillin은 잘 분해하지만 제 3세대 cephalosporin은 잘 분해하지 못하므로 엄밀하게 이야기하면 ESBL효소를 생산한다고 보기는 어렵다[8]. 그러므로 TEM-1 유전자가 존재한다고 해도 제 3세대 cephalosporin의 대표적

인 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 항생제의 MIC에는 별 영향이 없을 것 같다. 다만 원 균주에 존재하는 CTX-M-15 유전자는 cefotaxime항생제에 특이한 내성을 일으킨다[17]고 하였는데 SHV-12 gene 만을 cloning 한 균주가 cefotaxime항생제에 대해서 다른 항생제보다 상대적으로 낮은 MIC를 나타내는 것은 이러한 이론을 잘 증명해 주는 것 같다. 즉, 다시 말해서 SHV-12 gene만을 가지고 있는 균주는 ceftazidime과 ceftriaxone에는 가수분해 능력을 가지고 있지만 cefotaxime 항생제에 대한 가수분해 능력은 가지고 있지 않다는 것이다. 그리고 근래에 우리나라에서 가장 많이 나타났던 ESBL 유전자는 SHV-12 형이다[10]. 또한 최근에는 CTX-M형 ESBL을 가지고 있는 균주의 등장이 급증한다는 보고가 있다[9]. 특히 CTX-M-15형을 가진 균주가 많이 검출된다[9]고 하였는데 본 연구의 균주도 CTX-M-15형을 가지고 있었다. 그래서 CTX-M-15 유전자만을 클론하여 형질전환을 몇 차례 시도하였으나 실패하였다. 다만 CTX-M-15 유전자를 배제한 형질전환체가 cefotaxime항생제에 대한 가수분해능력을 나타내지 않은 것으로 보아서 CTX-M-15 유전자가 cefotaxime항생제에 대한 가수분해에 큰 영향을 주지 않을까하고 생각된다. 이러한 것은 향후 추가실험에서 밝혀내어야 할 과제로 남겨져 있다.

요 약

우리는 ESBL 유전자를 포함하는 세균의 항생제 내성 패턴을 조사하기 위해서 부산에 있는 임상실험실로부터 *Klebsiella pneumoniae* 한 균주를 수집하였다. 그 세균은 이중 디스크 확산법에 의해 ESBL을 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*라는 것이 밝혀졌고 PCR과 DNA 염기서열분석을 통하여 세 가지의 ESBL gene (TEM-1, SHV-12, CTX-M-15)이 포함되어 있다는 것이 확인 되었다. 그리고 그 세 가지 유전자의 특징을 알아내기 위해서 우리는 이 균주로부터 교차접합 시험, 형질전환시험, 클로닝(SHV-12 gene)등을 이용하여 재조합균주를 배양하였다. 이렇게 각기 재조합된 균주들을 한천평판회색법을 이용하여 3세대 cephalosporin 항생제 (ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone)에 대한 최소억제농도의 측정하고 비교 분석 하였다. *Klebsiella pneumoniae* (NO. 60031)의 MIC는 ceftazidime (30 µg/ml), cefotaxime (30 µg/ml), ceftriaxone (30 µg/ml)이 각각 ≥ 256 µg/ml, 128 µg/ml, 128 µg/ml이었고, *E. coli* RG176^{Na}에 교차접합 시킨 conjugant 균주의 MIC는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone이 각각 ≥ 256 µg/ml 64 µg/ml, 128 µg/ml이었다. *E. coli* DH5α에 형질전환 시킨 transformant 균주의 MIC는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone이 각각 128 µg/ml, 32 µg/ml, 32 µg/ml를 나타내었고, SHV-12 gene 만을 분리하여 *E. coli* DH5α에 클로닝 시킨 균주는 ceftazidime, cefotaxime,

ceftriaxone이 각각 128 µg/ml, 8 µg/ml, 32 µg/ml을 나타내었다. 결국 conjugant 균주와 transformant 균주는 세 가지의 내성유전자를 가졌다는 공통점은 있으나 conjugant 균주의 MIC가 transformant 균주의 MIC보다 높게 나타나는 차이점을 보였다. 또한 SHV-12 gene 만을 분리하여 *E. coli* DH5α에 클로닝 시킨 균주는 ceftazidime, ceftriaxone에 내성을 발현하였지만 cefotaxime에 대해서는 내성을 발현하지 않았다.

참 고 문 헌

1. Arlet, G. M., M. Rouveau, I. Casin, J. M. Bouveau, P. H. Lagrange and A. Philippon. 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2553-2558.
2. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases. the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1-14.
3. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 933-951.
4. Chanawong, A., F. H. M'Zali, J. Heritage, J. H. Xiong and P. M. Hawkey. 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 630-637.
5. Davin-Regli, A., D. Monnet, P. Saux, C. Bosi, R. Charrel and A. Barthelemy. 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: One-year prospective study in two intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1474-1480.
6. Fluit, A. C., J. T. van der Bruggen, F. M. Aarestrup, J. Verhoef, and T. M. Jansen. 2006. Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe. *Clin. Micro. Infect.* **12**, 410-417.
7. Hong, S. G., S. J. Kim, S. H. Jeong, C. H. Chang, S. R. Cho, J. Y. Ahn, J. H. Shin, H. S. Lee, W. K. Song, Y. Uh, J. H. Yum, D. E. Wong, K. W. Lee and Y. S. Chong. 2003. Prevalence and diversity of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. *Korea J. Clin. Microbiol.* **6**, 149-155.
8. Jacoby, G. A., and L. S. Munoz-Price. 2005. The new β -lactamases. *New Engl. Med.* **352**, 380-391.
9. Kim, Y. T. and T. U. Kim. 2006. Prevalence of CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in General Hospitals in 2005. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 342-351.
10. Lee, S. H., J. Y. Kim, S. H. Shin, Y. J. An, Y. W. Choi and Y. C. Jung. 2003. Dissemination of SHV-12 and characterization of New AmpC-type β -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2477-2482.
11. Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins epi-

- demology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* **36**, S11-23.
12. Lee, K., Y. Chong, D. Yong, J. H. Yum and S. Chong. 2007. Evolution of Resistance and Spread of Multidrug-Resistant Bacteria. pp. 9-22, 4th eds., Sohung publisher, Seoul
 13. Mammeri, H., G. Laurans, M. Eveillard, S. Castelain and F. Eb. 2001. Coexistence of SHV-4 and TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2184-2190.
 14. Mabilat, C. and P. Courvalin. 1990. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2210-2216.
 15. Moland, E. S., J. A. Black, A. Hossain, N. D. Hanson, K. S. Thomson and S. Pottumarthy. 2003. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2382-2383.
 16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 5th informational supplement. NCCLS document M100-S5. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085.
 17. Nordmann, P. 2002. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis.* **27**, S100-123.
 18. Nuesch-Inderbinen, M. T., F. H. Kayser and H. Hachler. 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 943-949.
 19. Pai, H., H. J. Lee, E. H. Choi, J. Kim and G. A. Jacoby. 2001. Evolution of TEM-related extended-spectrum β -lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3651-3653.
 20. Paterson, D. L. and R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamase: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657-686.
 21. Provedi, R., I. Chen and D. Dubnau. 2001. NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 634-644.
 22. Sabate, M., R. Tarrago, F. Navarro, E. Miro, C. Verges and J. Barbe. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1970-1973.
 23. Sanders, C. C., A. L. Barry, J. A. Washington, C. Shubert, E. S. Moland and M. Traczewski. 1996. Detection of extended spectrum β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2997-3001.
 24. Sougakoff, W., S. Goussard and P. Courvalin. 1988. 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.* **56**, 343-348.
 25. Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney and G. J. Anderson. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2864-2872.
 26. Tzelepi, E., P. Giakkoupi, D. Sofianou, V. Loukova, A. Kemeroglou and A. Tsakris. 2000. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 542-546.