

## 부산지역 하천에서 분리된 장내세균 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 광범위 베타 락탐 분해효소 (Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase)에 대한 유형별 분류

이훈구\* · 김혜진 · 김군도  
부경대학교 자연과학대학 미생물학과

본 연구는 부산지역 하천에서 plasmid 매개성 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소(extended spectrum  $\beta$ -lactamase; ESBL)를 생성하는 세균을 분리하여 생성된 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소를 유형별로 분류하기 위함이다. *Escherichia coli* 6균주와 *Klebsiella pneumoniae* 15균주가 피전달균주인 *Escherichia coli* J53 Azid<sup>®</sup>에 plasmid 매개성 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소 생성인자를 전달하였다. PCR 후 얻은 유전인자를 plasmid로 매개된 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소 유전자의 염기서열 분석결과, *E. coli*와 *K. pneumoniae* 유전자를 BCM Search Launcher 및 GenBank nucleotide database를 통하여 검색한 결과 ESBL 유형은 TEM-52형과 SHV-12형이었다. TEM-52는 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 양쪽에서 분리되었다. 그러나 SHV-12는 *K. pneumoniae*에서만 분리되었다. 이상의 결과로부터 plasmid 매개성 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소를 생성하는 세균이 한국에서는 이미 임상범위를 넘어 자연계까지 확산되었음을 알 수 있었다.

**Key words** □ *Escherichia coli*, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), isoelectric focusing (IEF), *Klebsiella pneumoniae*, SHV-12, TEM-52

$\beta$ -lactam 항균제는 amide 결합을 한  $\beta$ -lactam 환상구조로 세균의 세포벽을 형성하는 transcarboxylase와 transpeptidase와 같은 페니실린 결합 단백질과 결합하여 세균의 세포벽 합성을 방해한다(26). 그러나 일부 균에서는  $\beta$ -lactamase (EC 3.5.2.6.)를 생산하여 항균제를 불활성화 시킨다(11, 12). 초기의 cephalosporin 계열 항균제들은 여러 세균들이 생성하는 염색체성 또는 plasmid성  $\beta$ -lactamase에 의해 쉽게 분해되었다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 cephalosporin 계열의 항균제 구조를 변형시켜 만든 시기에 따라 제 2, 제 3세대 등으로 명명하게 되었다(14). 특히 제 3세대 항균제는 그람 음성과 양성균에게 폭 넓게 작용함으로 광범위  $\beta$ -lactam 항균제(extended spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics)로 명명되었다(18).

1983년 독일에서 plasmid에 의해 매개되어진 광범위  $\beta$ -lactam 분해효소(extended spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 생성균주가 출현됨으로서 기존의  $\beta$ -lactam 항균제와 제 3세대 cephalosporin 계열의  $\beta$ -lactam 항균제들이 무력화되어지고 있다(19, 20, 25).

이 기작은 대부분 plasmid 매개성으로  $\beta$ -lactam 항균제의 환상에 있는 carbonyl moiety에 공유결합을 하여, 환상의 amide결합을 가수분해 시킴으로서 항균제를 무력화시키며(20, 24), 한 두 곳의 유전자가 돌연변이(point mutation)되어 기존 아미노산에 변형(mutation)이 일어나 다양한 등전점(pI) 값을 가진다(10, 11,

20). 이 결과 현재 여러 종류의 ESBL이 보고되고 있으며, 초기에는 명명을 하는데 많은 혼란이 있었지만, Bush와 Jacoby에 의해서 체계화된 TEM형과 SHV형이 주종을 이룬다(18). 여러 종류의  $\beta$ -lactamase가 발견됨에 따라 명칭에 혼란을 피하기 위하여 생성물인 단백질에 표준 번호를 부여하고 있다(6).

지금까지 ESBL에 관한 연구는 환자나 임상가검물로부터 분리된 균주들이 대부분으로(20) 한국의 경우 1990년대 초반 이후 환자나 환자 가검물로부터 빈번하게 분리되고 있다(1, 2, 5). 본 연구자는 부산 도축장, 오수처리장으로부터 ESBL 생성균주를 분리하여 보고한 바 있다(3). 이와 같이 인간 생활환경 주변에서 ESBL 생성균주가 분리되는 것은 이 균주들이 임상적인 범주를 벗어나 자연생태계로 확산되고 있음을 의미하고 있다. 특히 축산 분야와 양식분야에서 이미 여러 종류의 항균제를 오래전부터 사용하고 있기 때문에 여러 경로를 통해서 ESBL 생성균주들이 하천수로 유입될 개연성이 크리라 판단된다.

이와 같은 관점에서 부산지역을 관통하고 있는 낙동강, 동천, 수영강, 온천천 및 광안리 오수펌프장 하천수를 검체채취 장소로 하여 ESBL생성균주 분리여부를 조사하였고 분리되었을 경우 이들의 효소 유형을 파악하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 균주의 분리

2005년 4월부터 2006년 2월까지 부산의 낙동강 2곳, 동천 3곳, 온천천 3곳, 수영강 3곳 그리고 광안리 오수펌프장 등 하천수로

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-51-620-6363, Fax: 82-51-611-6358  
E-mail: hunku@pknu.ac.kr

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for PCR amplification

Primer	Name	Sequence (5' to 3')	Function	Reference
1 <sup>a</sup>	bla <sub>TEM</sub>	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC	sense antisense	
2 <sup>b</sup>	bla <sub>TEM</sub> <sup>c</sup>	GGA TAA AGT TGC AGG ACC AC	sense	This study
3 <sup>a</sup>	bla <sub>SHV</sub>	CAC TCA AGG ATG TAT TGT G TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	sense antisense	
4 <sup>b</sup>	bla <sub>SHV</sub> <sup>d</sup>	GTG CTC TGC GGC GCA GT	sense	This study
5 <sup>a</sup>	CMY-1	ATG CAA CAA CGA CAA TCC ATC GTT GGG GTA GIT GCG ATT GG	sense antisense	

<sup>a</sup>Sequence is used as reference, <sup>c</sup>and <sup>d</sup>were designed from TEM-52 and SHV-12 respectively.

부터 매월 1회씩 멸균된 채수병으로 물을 채취한 후, 시료 0.1 ml를 취하여 BHI (brain heart infusion, Difco, USA) 5 ml에 접종하고 증균 과정을 거친 후, 증균액 0.1 ml를 제 3세대 cephalosporin계열 항균제인 ceftazidime (2 µg/ml, 영진약품, Korea)을 첨가한 장내세균 선택배지인 MacConkey 평판배지 (Difco)에 고르게 도말한 다음 37°C에서 17시간 배양하여 성장된 균 집락체를 얻었다(24). 이를 다시 BHI-평판배지 상에서 순수 분리 후 생화학 검사를 실시하여 균주를 동정하였다. 장내세균 분리배지조제와 생화학 시험, 균주의 동정은 일반 장내세균 동정법을 따랐다(13). 기초배지로 MacConkey agar 평판, Brain-Heart Infusion (BHI)가 사용되었고 항균제 시험 기초배지로는 Mueller-Hinton agar 평판배지와 Mueller-Hinton 액체배지가 사용되었다 (Difco). 그람 염색, oxidase, catalase 시험이 이루어졌고, 장내세균 동정 일반 생화학 검사인 indole, methyl-red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate, lysine ornithine decarboxylase, arginine dihydrolase 시험과 glucose, lactose, sucrose, mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, arabinose, raffinose, rhamnose, maltose, xylos, trehalose, cellobios 등 16개 당에 대한 발효시험 및 0.4% agar가 첨가된 BHI 배지에서 운동성 시험과 Durham 팽관을 통한 glucose 배지 내에서 gas 생성 유무 등이 조사되었다.

β-lactamase 생성균주 분리방법과 이중디스크 확산시험(double disk synergy test)은 선행연구의 방법에 따라 수행하였다(3).

#### 항균제 감수성 검사

일반 항균제 감수성 검사는 ampicillin (Ap, 10 µg), gentamicin (Gm, 10 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), tetracycline (Te, 30 µg), cephalothin (Cf, 30 µg), amikacin (An, 30 µg), kanamycin (K, 30 µg)과 nalidixic acid (Na, 30 µg) 등 8종을 사용하여 disk법 (Becton Dickinson, France)으로 행하였고, 판독은 항균제 제작회사(Becton Dickinson, France)와 NCCLS (22) 기준을 따랐다. 판독 결과는 내성(Resistant)일 경우만 산정하였고 중등도 내성 (Intermediate)으로 판독될 경우 내성으로 산정하지 않았다.

#### 접합(Conjugation)에 의한 내성전달

접합시험은 선행연구의 방법을 따랐다(3). 실험과정의 중요한

부분을 요약하면 다음과 같다. ESBL생성이 확인된 균주(일련번호 H, Table 2)를 전달균주(donor)로 하고 sodium azide에 내성을 가진 *Escherichia coli* J53 (sodium azide<sup>b</sup>)를 피전달균주(recipient)로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 모균주들에 대한 교차 항균제의 내성을 확인하기 위하여 ceftazidime (영진약품)과 sodium azide (Shinyo Pure Chemicals, Japan)에 대한 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)시험을 실시하였다 (22). 내성전달 균주의 sodium azide에 대한 내성과 피전달균주인 *Escherichia coli* J53에 대한 ceftazidime 내성검사결과는 대조균주 *Escherichia coli* ATCC 25922을 사용하였다. Ceftazidime 내성전달 확인용 선택배지는 sodium azide (100 µg/ml)와 ceftazidime (32 µg/ml)이 첨가된 MacConkey 평판배지를 이용하였다. 전달균주 배양액과 피전달균주 배양액을 1:10의 비율로 새로운 BHI에 혼합하여 37°C에서 17시간 정치 배양시켰다. 이 배양액을 앞서의 선택배지에 도말하여, 37°C에서 17시간 배양하여 균집락 생성유무를 조사하였다(3, 4). 이때 역접합이나 위접합체를 배제하기위하여 생화학 검사를 실시한 다음 피전달 모균인 *E. coli*를 확인하였다. 접합이 이루어진 접합자(transconjugant)균주는 공여균주 번호 앞에 "C"를 붙였다. 형별 분류를 위하여 agarose gel에 전기영동을 하였을 때, 대조기준으로 TEM형은 PUD-18 (SHV-3), SHV형은 PUD-16 (TEM-4)를 사용하였다.

#### β-lactamase의 등전점 검사 (Isoelectric focusing, IEF)

등전점 검사는 선행연구를 따랐다(3). 배양액을 원심분리하여 증류수로 세척 후 초음파 파쇄기(ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument, USA)를 이용하여 분쇄하였다. 이를 원심분리하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후 시험 전까지 -20°C에 보관하였다. 등전점검사를 위하여 ampholine polyacrylamide gel (Bio-Rad, USA)을 사용하였고 gel제작과 전기영동방법 등은 선행연구와 같았다(3, 4). 전기영동이 끝난 glass plate로부터 gel support film을 분리하여 nitrocefing용액(Glaxo, USA)으로 적신 여과지를 gel 위에 덮어서 생성물인 band를 관찰하였다(3, 4). pI값 판독을 위한 marker로는 IEF marker 3-10 (Serva liquid mix, Germany)을 사용하였다. Marker 단백질 염색과 탈색은 Sambrook (30)를 따랐다.

**Table 2.** Characterization of ESBL isolates from rivers in Busan.

Species	Strain no.	Isolated area	ESBL type	CMY-1	Transconjugant pI value	Transconjugant ESBL type
<i>Escherichia coli</i>	H1	Nakdong-river		-		
	H2	Onchunchun	TEM		6.0	
	H3	Dongchun	TEM			
	H4	Kwangan Beach		-		
	H5	Kwangan Beach	TEM		6.0	
	H6	Kwangan Beach		-		
	H7	Kwangan Beach		-		
	H8	Dongchun	TEM			
	H9	Onchunchun		-		
	H10	Onchunchun		-		
	H11	Onchunchun	TEM			
	H12	Kwangan Beach	TEM		6.0	TEM-52
	H13	Onchunchun	TEM		6.0	TEM-52
	H14	Onchunchun	TEM			
	H15	Dongchun		-		
	H16	Dongchun		-		
	H17	Dongchun		-		
	H18	Kwangan Beach		-		
	H19	Kwangan Beach	TEM		6.0	
H20	Dongchun		-			
H21	Dongchun	TEM,SHV		8.3	SHV-12	
H22	Dongchun	TEM,SHV		8.3		
H23	Onchunchun	TEM		5.4, 6.0		
H24	Onchunchun	SHV		8.3		
H25	Onchunchun	SHV		8.3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	H26	Onchunchun		-		
	H27	Kwangan Beach		-		
	H28	Kwangan Beach		-		
	H29	Dongchun	TEM,SHV			
	H30	Dongchun	TEM		5.4, 6.0	
	H31	Dongchun		-		
	H32	Onchunchun		-		
	H33	Onchunchun		-		
	H34	Onchunchun	TEM,SHV		8.3	SHV-12
	H35	Onchunchun		-		
	H36	Onchunchun		-		
	H37	Dongchun		-		
	H38	Dongchun	TEM			
	H39	Onchunchun		-		
	H40	Suyungchun		-		
	H41	Dongchun	TEM		5.4, 6.0	TEM-52

### PCR (Polymer chain reaction)을 이용한 ESBL 유전자의 형질분류

Plasmid 분리는 alkaline 방법(30)을 따랐다. ESBL 유전자의

형질분류를 위하여 사용된 특이 primer는 각각 TEM형(1080 bp), SHV형(780 bp) 및 CMY-1형(1097 bp)이었고 Bioneer (Korea)에서 제작하였다(4). TEM형과 SHV형의 개시코돈 및 종

결코돈 확인을 위하여 사용한 primer는 각 유형별로 형별 내에 공통부분이 가장 많이 있는 부분을 선택하여 제노텍(Korea)에서 제작하였다(Table 1).

PCR은 Pre-mix (Bioneer)를 사용하였고, template 0.3 µl, primer (10 pmol) 각각 1 µl, 증류수 7.3 µl를 넣어서, total volume 20 µl로 반응시켰다. TEM형, SHV형, CMY-1형의 확인은 선행연구를 따랐다(4). PCR 생성물은 1% agarose gel을 이용하여 0.5×TBE Buffer에서 100 V로 30분간 전기영동 하였으며, DNA 염색은 독성이 강한 ethidiumbromide 대신 DMF gel stain (Komabio-technology, Korea) 용액을 1/100로 희석하여 이중 3 µl을 취하여 DNA와 함께 섞은 다음 loading하였다. 이후 gel extraction kit (DyneBionic, Korea)를 사용하여 제시된 kit protocol을 따라 plasmid를 정제하고 전기영동 하여 해당 밴드의 생성물을 확인하였다. 염기서열분석은 제노텍(Korea)에 의뢰하여 결정되었다. 염기서열 결정은 Single-pass sequencing 방법으로 ABI (Applied Biosystems, USA) BigDye terminator Kit (Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit)를 이용하였다. Cycle sequencing 방법으로 염기 서열을 해독한 다음 sequencing 반응에 참여하지 않은 형광물질로 lable된 ddNTP를 EtOH down 방법으로 제거하였다. 정제가 끝난 후 멸균 증류수나 HDF (Hi-Di Formamide)에 녹여 기기에 장착하여 전기 영동하였다. 사용한 기기의 기종은 ABI 3730xl DNA analyzer capillary였다.

염기서열 결정 후, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>)를 이용하여 Multiple Sequence Alignment, Sequence Utility에서 개시코돈을 확인하고 해당 아미노산 결정과 유사도 등을 비교하고 ESBL유형을 분류하였다. 형별 분류동정 기준은 Bush와 Jacoby에 의해서 운영되고 있는 lahey clinical study (<http://www.lahey.org/temtable.asp>)를 따랐다. 이와 병행하여 최종적인 유형 결정은 아미노산 서열분석을 따랐다(6).

## 결 과

### ESBL 생성 균주의 분리 및 형별 분류

부산 5개 지역을 관통하는 낙동강을 비롯하여 온천천, 광안동 오수처리장 부근, 동천, 수영천 등으로부터 시료를 채취하였다. 가장 긴 강인 낙동강은 부산 북부를 지나 김해 쪽으로 흘러 남해로 빠지고 나머지 4개의 하천은 소규모로서 부산 도심을 통과하여 해운대쪽의 동해나 남해 바다로 직접 흘러간다. 각 하천으로부터 분리된 ESBL 생성 균주들을 수용균주인 *E. coli* J53에 접합시키기 전 공여체 균주들로부터 plasmid를 추출하여 PCR 증폭을 한 후 각각 형별로 특이 primer를 대조균으로 하여 전기영동 한 결과는 다음과 같았다.

낙동강(*E. coli*, H1)과 수영천(*K. pneumoniae*, H40)에서 분리된 2균주는 이중 디스크 확산시험 결과 모두 양성을 나타냈지만 plasmid를 추출하여 TEM과 SHV ESBL형 특이 primer를 이용하여 전기영동을 실시한 결과, 각 해당 band에서 생성물을 형성하지 못하였다. 온천천에서 분리된 균주는 모두 8균주로서 TEM

형 5균주(*E. coli* 2균주, *K. pneumoniae* 3균주) SHV형 2균주(*K. pneumoniae*) 및 TEM과 SHV형을 동시에 가지는 균주가 1균주(*K. pneumoniae*)였다. 동천에서도 역시 8 균주가 분리되었으며 TEM형 5 균주(*E. coli* 2 균주, *K. pneumoniae* 3균주) TEM과 SHV형을 동시에 가지는 균주가 3균주(*K. pneumoniae*)였다. 광안리 오수처리장에서는 3균주가 분리되었고, 모두 TEM형(*E. coli* 2균주, *K. pneumoniae* 1 균주)이었다(Table 2).

### 분리균주의 동정

제 3세대 cephalosporin계 항균제인 ceftazidime (2 µg/ml)이 첨가된 MacConkey 평판배지에서 집락체를 형성한 균주에 대해 β-lactamase 추적시약인 nitrocefin 용액을 떨어뜨린 다음 5분 이내에 진한 붉은색으로 발색되는 균주를 1차로 선별하였다.

생화학 검사를 통한 일반 장내세균 동정법에 따라 균을 동정한 결과 이들은 *E. coli*와 *K. pneumoniae*로 동정되었고 그 성상은 다음과 같았다. BHI 액체배지에서 24시간 배양 후 그람 염색 및 oxidase 시험 결과 2종 모두 음성을 나타내었고, catalase 시험은 양성을 나타내었다. 전 균주가 Kligler iron agar (KIA) 배지상에서 A/A, gas를 생성하였으나 H<sub>2</sub>S를 생성하지 않았다. 그 밖의 *E. coli*의 주요 생화학적 성상은 반고체 배지에서 운동성을 나타내었고 catalase, indole, methyl-red (MR), lysine decarboxylase 시험에서 전 균주가 양성반응을, 당발효 시험 결과 glucose, lactose, manitol, sorbitol, arabinose rhamnose, maltose, xylose, trehalose를 발효시켰다. 그러나 arginine dihydrolase (75%)와 ornithine dicarboxylase (66%) 시험의 경우는 균주에 따라 양성반응이 다소 차이가 있었고 sucrose, dulcitol, raffinose 등 3종의 당 발효시험 결과는 58-60% 정도의 균주가 양성을 나타내었다. Simmon's citrate agar 배지 상에서 단독 탄소원으로 citrate를 이용하지 못하였고. Voges-Proskauer (VP) 시험 음성, adontol, inositol, cellobiose 3개 당을 전 균주가 발효시키지 못하였다. *K. pneumoniae*는 MacConkey 평판배지에서 중앙이 적색, 주변부가 투명한 동심원으로 집락 표면에 점성을 띄는 매끄러운 convex 형태였고, 운동성이 없었다. VP 시험 양성, citrate를 이용하였다. Lysine dearboxylase 시험은 양성(96.2%)이었고 시험된 대부분의 당을 전 균주가 발효시켰으며 dulcitol 하나를 발효시키지 못하였다.

### 이중 디스크 확산시험 및 ESBL 생성균주의 확인

이중 디스크 확산시험(double disk synergy test) 결과, 평판 중앙에 있는 ticarcillin/ clavulanate (TIM)과 디스크 간격이 25 mm 이상 떨어진 거리에서 ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO) 및 cefotaxime (CTX)에 대한 상승(synergy)효과가 강력하게 나타난 41 균주(*E. coli* 12균주, *K. pneumoniae* 29균주)가 최종 시험균주로 선별 되었다(Table 2).

이중 디스크 확산시험 결과 선별된 41균주를 모주균주로 하여 이들에 대한 ESBL 생성확인 결과는 다음과 같았다. Plasmid를 추출하여 TEM형 SHV형 및 CMY-1에 대한 특이 primer로 PCR 후 전기영동을 실시한 결과 *E. coli*는 6균주가 TEM형인 1080

bp에서 생성물을 만들었고, *K. pneumoniae*에서는 7균주가 TEM형, 2균주는 SHV형을 단독으로 생성하였다. 4균주는 TEM형과 SHV형을 중복으로 생성하였다. 전 균주가 CMY-1을 생성하지 않았다(Table 2).

**항균제 감수성 검사**

내성전달 시험을 위하여 공여 모균주로 사용된 시험균주들은 모두 ceftazidime 30 µg disk에 NCCLS기준 이하의 억제대를 형성하였으며, sodium azide가 100 µg/ml이 첨가된 Mueller-Hinton 배지에서는 성장이 되지 못하였다. 피전달균주 *E. coli* J53은 ceftazidime 4 µg/ml이 첨가된 Mueller-Hinton 평판배지에서 자라지 못하였고 sodium azide가 100 µg/ml이 첨가된 배지에서는 성장이 잘 이루어졌다.

시험균주에 대한 8종의 항균제 감수성 결과는 Table 3과 같았다. 대부분의 시험균주는 최소 2종류부터 7종의 항균제에 대하여 다약제 내성을 나타내었다. 균종별로 보면 다음과 같았다. 12균주의 *E. coli* 중 6균주가 3종의 항균제에 다약제 내성을 나타내었고, 3균주는 7종의 항균제에 다약제 내성을 나타내었다. *K. pneumoniae*는 다약제 내성의 변이 폭이 넓었다. 3종의 항균제에 내성을 나타낸 균주가 12균주로 가장 많았고 4종의 항균제에 7균주, 5종과 6종의 항균제에 각각 5균주가 내성을 나타내었다. 검사된 항균제 중 ampicilline에 대해 전 균주가 내성을 나타내었고, amikacin은 대부분의 균주가 감수성을 나타내었다.

**Table 3.** Drug resistance pattern of the isolates

Species	Antimicrobial resistance	Strain no.
<i>Escherichia coli</i>	ApCfK	H1,H2,H3,H4,H5,H12
	ApCfKNaTe	H8
	ApCfGmKNaTe	H9,H10
	ApCfGmKNaTe	H6,H7
	AnApCfGmKNaTe	H11
	ApCf	H39
	ApCfGm	H16,H17,H18,H19,H27,H40
	ApCCf	H37
	ApCfGm,K	H21,H22,H23,H29,H30
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ApCCfK
ApCfKNa		H34
ApCfGmTe		H41
ApCCfGmK		H13,H14,H15,H26
ApCfGmNaTe		H20
ApCCfGmKTe,		H35,H36,H37,H38
AnApCCfGmK		H36

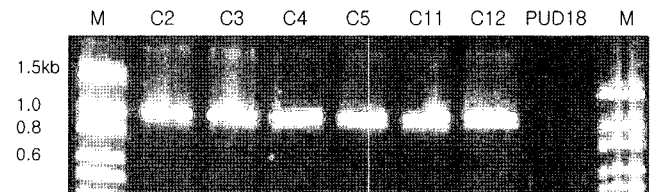
Abbreviations: An (amikacin 10 µg); Ap (ampicillin 10 µg); C (chloramphenicol 30 µg); Cf(cephalothin 30 µg); Gm (gentamicin 10 µg); K (kanamycin 30 µg); Na (nalidixic acid 30 µg); Te (tetracycline 30 µg)

**접합(conjugation)에 의한 내성전달 시험**

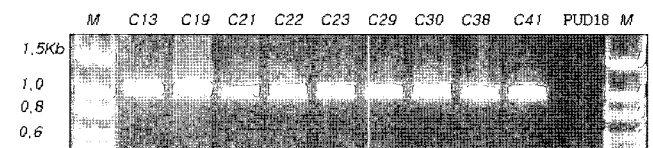
ESBL 생성 균주의 제 3세대 항균제 획득 원인이 plasmid 매개에 의한 것임을 확인하기 위하여 ceftazidime과 sodium azide가 함께 첨가된 Mueller-Hinton 배지상에서 배양 시험을 수행한 결과 *E. coli* 6균주와, *K. pneumoniae* 12균주가 *E. coli* J53에게 접합자(transconjugant)를 형성하였다. 이들에 대한 생화학 검사를 실시하여 이들이 모두 피전달 균주인 *E. coli*임을 확인하였다.

접합자 집락체로부터 plasmid를 추출하여 PCR로 증폭한 다음 전기영동을 하여 이들의 ESBL 유형을 조사한 결과는 다음과 같았다. *E. coli*를 공여(doner) 모균주로 하여 얻어진 6균주는 ESBL TEM형 지표생성물 크기인 1080 bp에서 단일 band를 형성하였다(Fig. 1). 그러나 *K. pneumoniae*의 경우 9균주가 TEM형을, 6균주가 SHV형(780 bp)의 band를 단독으로 형성하였다. 이 중 3균주(C21, C22, C29)는 TEM 형과 SHV 형의 생성물을 동시에 만들었다(Fig. 2, Fig. 3). 1균주(H 14)는 *E. coli* J53과 접합이 이루어지지 않았다.

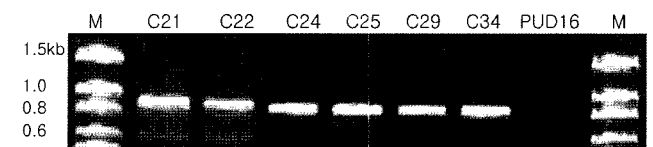
TEM 형의 접합자들에서 ESBL 조효소(crude enzyme)를 추출하여 polyacrylamide gel상에서 등전점을 확인한 결과 *E. coli* 접합자는 6균주 중 4균주가 단일한 등전점(pI) 6.0 값을 가졌고 2균주(C3, C11)가 등전점을 형성하지 않았다(Fig. 4). *K. pneumoniae*는 agarose gel상에서 생성물을 형성한 15균주 중 11균주에 대하



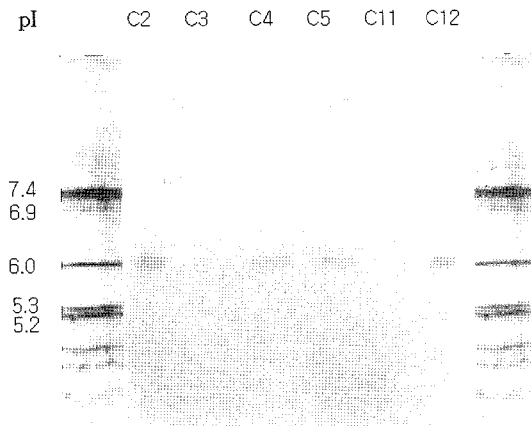
**Fig. 1.** Plasmid on agarose gel electrophoresis. Lanes: M; plasmid size standards. C2 to C12 *E. coli* J53 sodium azide<sup>r</sup>/*E. coli* transconjugants. PUD18: SHV-3.



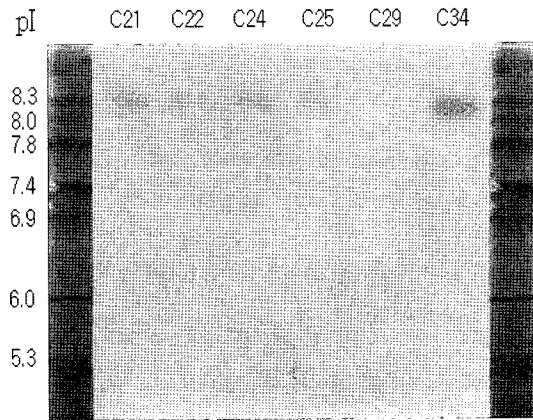
**Fig. 2.** TEM type of plasmid on agarose gel electrophoresis. Lanes: M, plasmid size standards, C13 to C41 *E. coli* J53 sodium azide<sup>r</sup>/*K. pneumoniae* transconjugants, PUD18: SHV-3.



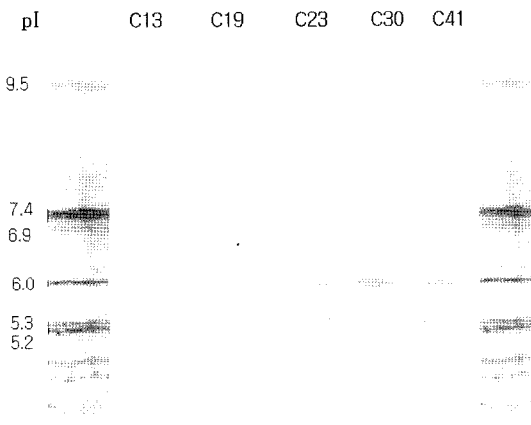
**Fig. 3.** SHV type of plasmid on agarose gel electrophoresis. Lane: M, plasmid size standards, C21 to C34 *E. coli* J53 sodium azide<sup>r</sup>/*K. pneumoniae* transconjugants, PUD16: TEM-4



**Fig. 4.** IEF of  $\beta$ -lactamases on polyacrylamide gel with nitrocefim and detection of ESBL producing *E. coli* transconjugants. Lane M, Standard protein markers staining by Coomassie Blue.



**Fig. 6.** SHV type of  $\beta$ -lactamases on polyacrylamide gel with nitrocefim and detection of ESBL producing *K. pneumoniae* transconjugants. Lane M, Standard protein markers staining by Coomassie Blue.



**Fig. 5.** TEM type of  $\beta$ -lactamases on polyacrylamide gel with nitrocefim and detection of ESBL producing *K. pneumoniae* transconjugants. Lane M, Standard protein markers staining by Coomassie Blue.

여 등전점 시험을 실시한 결과 2균주(C13, C19)가 pI 6.0 부근에서 단일 생성물을, 3균주(C23, C30, C41)가 pI 6.0과 pI 5.4 부근에서 2개의 생성물을 형성하였다(Fig. 5).

*K. pneumoniae*에서 분리된 SHV형 접합자 6균주 중 5균주는 pI 8.3에서 단일한 등전점을 형성하였지만 1균주(C29)는 등전점을 형성하지 못하였다(Fig. 6).

등전점과 elution kit를 사용하여 정제한 PCR 결과를 바탕으로 *E. coli*에서 얻어진 접합자 TEM형 1균주(C12)와 *K. pneumoniae* 접합자중 등전점을 1개(pI 6.0) 형성한 1균주(C13), 등전점을 2개 형성(pI 5.4, pI 6.0)한 1균주, *K. pneumoniae* 접합자중 SHV형 1균주(C34)를 선별하여 유전자 분석을 한 결과 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 접합자들의 TEM형은 모두 단일한 TEM-52형으로 NCBI 등록번호 AF027199와 완전히 일치되었다. *K. pneumoniae* 접합자에서 분리된 SHV형 역시 단일형인 SHV-12로 NCBI 등록

번호 AY008838과 완전히 일치되었다.

### 고 찰

부산지역을 관통하는 여러 소하천들에서 분리된 장내세균 *K. pneumoniae*와 *E. coli*는 인간의 장내에서 서식하는 대표적인 정상세균종일 뿐 아니라 이들 중 일부는 인체에 병원균으로서, 적어도 기회감염균으로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 세균이다. 조사된 5개의 하천 중 부산지역의 도심을 흐르는 3개 소하천에서 ESBL 생성균주들이 어떤 경로를 통하여 수계에 유입되었는지는 정확하게 알 수 없지만 이미 이들은 여러 종류의 항균제에 내성을 획득한 상태였다. 특히 ampicillin은 시험된 모든 균주가 내성을 가지고 있었다.

1983년 plasmid 매개에 의해서 ESBL 생성균주가 처음 독일에서 분리된 이후(20), *K. pneumoniae*와 *E. coli*는 대표적인 ESBL 생성균주로 세계 도처에서 분리 보고되고 있으며, 중환자실과 장기입원환자의 치료에 많은 어려움을 주고 있다(16, 17, 21, 25, 29). 국내에서도 1990년대 이후 여러 지역의 대학병원과 종합병원의 장기 입원환자들에서도 ESBL 생성 *E. coli*가 많이 보고된 바가 있으며, 이들의 유형도 TEM, SHV형 등 매우 다양하다(1, 2, 5). ESBL 유형연구는 대부분이 병원에서 환자나 임상가검물로부터 분리된 균주들에게서 기원된 것이었으며 도축물이거나 음식 혹은 하수구나 강물과 같은 자연계에서 분리된 균들로부터 연구된 예는 상대적으로 적었다(4, 9, 31, 32).

현재까지 ESBL은 종류가 많이 밝혀져 있고, 또 계속해서 새롭게 등재될 것이지만 기본적으로는 TEM-1과 TEM-2 또는 SHV-1에서 유전자가 1개 또는 여러 개의 돌연변이가 만들어짐으로서 활성부위의 구조가 바뀌어져 항균제가 세균에게 작용할 수 없게 되는 현상이다(17, 25, 27).

본 연구에서 *E. coli*와 *K. pneumoniae*로부터 분리된 TEM-52형은 조 등이 1997년 *K. pneumoniae* plasmid pKK50-2로부터

분리하여 GenBank nucleotide database 등록번호 AF027199로 등록되었으나 공식문헌은 아직 발표되지 않은 상태이다. Poyrat 등은 1998년 *K. pneumoniae*로부터 이를 새로운 유형의 ESBL TEM-52로 명명하고 GenBank nucleotide database 등록번호 Y13612로 등록하였고 모두 286개의 아미노산으로 구성된 것으로 보고하였다(28). TEM-52형은 *Klebsiella*에서 주로 생성되지만 일부 *Salmonella* 속, *Shigella* 속 세균에서도 분리되어 GenBank nucleotide database에 등록되어 있다(15, 28). 생물학적 주요 특징은 등전점(pI) 6.0이고, TEM-1형과 비교하였을 때 Ambler 등(6)의 아미노산 분류법에 따라 3곳의 아미노산(104Glu→Lys, 182Met→Thr, 238Gly→Ser)이 치환된 것으로, 이미 국내 환자에서 우점종으로 보고되었다(24). 본 연구에서 얻어진 결과는 상응하는 해당 염기서열 뿐 아니라 단백질 순서 및 개수에서도 완전히 일치되었다.

SHV-12는 1997년 *Klebsiella*에서 분리되었고 Ambler (6) 분류법에 따라 기준이 되는 SHV-1 35Leu→Gln, 238Gly→Ser, 240Glu→Lys로 치환된 것이다(23). 본 연구 결과와 대조하여 염기서열 및 아미노산 서열 분석은 GenBank nucleotide database에 등록된 AY008838이었다. 이 균 역시 조 등이 2002년 2월 *K. pneumoniae* plasmid PK7746에서 분리하여 NCBI에 등록한 것으로 286개의 아미노산으로 이루어졌다. 역사적으로 이 형은 SHV-5.2a로 분류되던 것으로 pI 8.2로 GenBank에 등록된 이들의 아미노산 서열이나 염기서열은 SHV-5와 거의 같아서 대단히 혼동된다. SHV-5는 1990년 *K. pneumoniae*에서 분리되어 명명되었고, SHV-1과는 35번에서 동일하고 238과 240번에서 SHV-12와 같이 치환됨으로서 결국 SHV-5와 SHV-12는 35번 1개의 아미노산만 다른 것이다(8).

대부분의 ESBL 생성균주들은 지역이나 국가에 따라 나타나는 양상이 다소 정형화 되어 있는 경향이 많이 있지만(7, 8) 특히 SHV-5는 신생아실의 집단 감염을 일으키는 임상적으로 매우 중요한 균이다(7).

부산지역 도심을 관통하는 주요 하천과 강의 지류로부터 ESBL 생성균주의 존재가 확인된 것은 본 연구가 처음이다. 그간 연구자는 부산지역의 도축물과 광안리 오수처리장의 오수 등, 환자나 임상가검물 이외의 주변 생활환경으로부터 얻어지는 가검물로부터 ESBL 생성균주를 분리하고 이들의 유형을 조사해오고 있다. 부산지역 도축장에서 분리된 결과들과 본 연구에서 얻어진 결과들을 비교해 보면, 도축물과 그 주변 환경으로부터 분리된 ESBL 유형은 TEM-52와 SHV-12로 하천에서 분리된 본 연구와 같았다. 그러나 도축물에서 얻어진 유형은 SHV-12의 경우 균종이 뒤따라 *Klebsiella*에서만 분리되었고 *E. coli*에서는 분리되지 않았다. TEM-52의 경우는 *Klebsiella*와 *E. coli* 양쪽에서 모두 분리되었다(3).

얻어진 연구 결과로 볼 때, 부산지역에서는 ESBL 생성균주가 병원이나 임상 가검물로 국한되어 있지 않고, 생활하수나 축산 분뇨 등 여러 경로를 통하여 수계에까지 서식처가 다양화되어지고 있음을 증명하는 것이다. 따라서 시간이 경과 될수록 다양해질 ESBL 종류와 분리되는 균종 사이의 내성전이 비율 등을 지

속적으로 조사해야 될 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 이경원, 조성란, 이창숙, 정운섭, 권오현. 1994. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 26, 341-348.
2. 이선화, 김미나, 최수진, 정화순. 2000. 임상 검체에서 분리된 *Escherichia coli*의 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 성상. 대한임상병리학회지 20, 400-409.
3. 이훈구. 2006. 부산 도축장에서 분리된 광범위 베타 락탐 분해효소(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 생성 장내세균의 형질분류. 한국미생물학회지 42, 125-130.
4. 이훈구. 2001. 광안리 오수처리장에서 분리된 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) *Klebsiella*와 *Enterobacter*의 유형. 한국미생물학회지 37, 277-283.
5. 정운섭, 이경원, 오카모도료이찌, 이노우에 마쓰히사. 1997. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 성상. 감염 29, 477-485.
6. Ambler, R.P., A.F.W. Coulson, N.M. Frere, J.M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R.C. Leebversque, G. Tiraby, and S.G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.* 276, 269-272.
7. Bagattini, M., V. Crivaro, A.D. Popolo, F. Gentile, A. Scarcella, M. Triassi, P. Villari, and R. Zarilli. 2006. Molecular epidemiology of extended-spectrum (beta)-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 979-982.
8. Billot-Klein, D., L. Gutmann, and E. Collatz. 1990. Nucleotide sequence of the SHV-5  $\beta$ -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2439-2441.
9. Brinas, L., M. Zarazaga, Y. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002.  $\beta$ -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3156-3163.
10. Bush, K. 1989. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 259-263.
11. 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.
12. Bush, K. and G. Jacoby. 1997. Nomenclature of TEM  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 1-3.
13. Ewing, W.H. 1986. Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, N.Y., USA.
14. Goussard, S. and P. Courvalin. 1999. Update sequence information for TEM  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 367-370.
15. Jeong, Y.S., J.C. Lee, H.Y. Kang, H.S. Yu, E.Y. Lee, C.H. Choi, S.H. Tae, Y.C. Lee, D.T. Cho, and S.Y. Sul. 2003. Epidemiology of nalidixic acid resistance and TEM-1- and TEM-52-mediated ampicillin resistance of *Shigella sonnei* isolated obtained in Korea between 1980 and 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3719-3723.
16. Jacoby, G.A. and P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 908-911.
17. Jacoby, G.A. and I. Carreras. 1990. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum

- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 858-862.
18. Karen, B. and J. George. 1997. Nomenclature of TEM  $\beta$ , lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1-3.
  19. Matthew, M., R.W. Hedges, and J.T. Smith. 1979. Types of  $\beta$ -lactamase determined by plasmid in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 138, 657-662.
  20. Meideiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 245, 19-45.
  21. Miranda, G, N. Castro, and B. Leanos. 2004. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 30-35.
  22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS: M7-A4.
  23. Nueesch-Inderbinnen, M.T., F.H. Kayser, and H. Haechler. 1997. Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 943-949.
  24. Pai, H.J., S. Lyu, J.H. Lee, J.M. Kim, Y.M. Kwon, J.W. Kim, and K.W. Choe. 1999. Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.
  25. Philippon, A., R. Labia, and G. Jacobi. 1989. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131-1136.
  26. Pitout, J.D.D., K.S. Thomason, N.D. Hanson, A.F. Ehrhardt, P. Cudron, and C. Sanders. 1998. Plasmid-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aeru-* genes strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 596-600.
  27. Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E.B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann. 1999. Molecular and Biochemical characterization of VEB-1 a novel class a extended spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 573-581.
  28. Poyart, C., P. Mugnier, G. Quesum, P. Berche, and P. Trieu-Cout. 1998. A novel extended-spectrum TEM-type  $\beta$ -lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 108-113.
  29. Rasheed, J.K., C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Wiegel, J. Crellin, C. Steward, B. Hill, A.A. Meideiros and F.C. Tenover. 1997. Evolution of extended spectrum  $\beta$ -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 647-653.
  30. Sambrook, J., F.E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. I. 1.25-1.28.
  31. Teshager, T., L. Dominguez, and M.A. Moreno. 2000. Isolation of an SHV-12  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3483-3484.
  32. Winokur, P.L., A. Brueggemann, D.L. Desalvo, L. Hoffmann, M.D. A.E.K. Uhlenhopp, M.A. Pfaller, and G.V. Doern. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2777-2783.

(Received March 6, 2007/Accepted June 4, 2007)

#### ABSTRACT : Typing of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Rivers in Busan, Korea

Hun-Ku Lee\*, Hye-Jin Kim, and Gun-Do Kim (Department of Microbiology, Pukyong National Univ., Busan, Korea)

The purpose of this study was typing the plasmid mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamases produced by enteric bacteria isolated from rivers in Pusan. Six strains of *Escherichia coli* and fifteen strains of *Klebsiella pneumoniae* transferred their plasmid mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes to the recipient strain *Escherichia coli* J53 Azid<sup>R</sup>. The plasmid mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes were sequenced directly after PCR and the types were determined by the BCM Search Launcher and GenBank nucleotide database. Determined types of the plasmid mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamases were TEM-52 and SHV-12. TEM-52 was isolated from both *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. However SHV-12 was isolated from *Klebsiella pneumoniae* only. The results indicated that the plasmid mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing bacteria spreaded over the area of clinical to the nature in Korea.