

부산 수영공공하수처리시설에서 분리된 광범위 항균제 베타락탐 분해효소(Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) 유형

김군도 · 이훈구*

부경대학교 자연과학대학 미생물학과

The Types of Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated from Suyeong Sewage Disposal Plant, Busan Environmental Corporation

Gun-Do Kim and Hun-Ku Lee*

College of Natural Sciences, Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

(Received March 4, 2010/Accepted March 18, 2010)

The study performed to identify the type of ESBL against strains which are producing extended-spectrum β -lactamases and isolated from sewage in Suyeong sewage disposal plant, Busan Environmental Corporation. By the standard activated sludge method, Suyeong sewage disposal plant purify living and lavatory sewage gathering from the northeast Busan and the facility purify total 550,000 tons of living sewage disposal a day. 14 strains were isolated by double disk synergy test and the third generation cepha-antibiotics test. Indole, methyl-red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate, decarboxylase-dihydrolase and sugar-fermentation tests identified as *Klebsiella pneumoniae* (n=4) and *Escherichia coli* (n=10). Plasmid-mediated transmission test against isolated 14 strains proved 11 strains transmitted resistance to recipient *E. coli* J53 (sodium azide^R, ceftazidime^S). 9 strains of conjugant were expressed ESBL genes transferred from parental strain but 2 conjugants did not expressed. The type of ESBL from each strain was determined by isoelectric focusing points, DNA and amino acids sequencing. The results indicated that the types of ESBL transmitted to recipient *E. coli* J53 were TEM-1, the parental TEM type and SHV-12 type.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase (ESBL), *E. coli*, *K. pneumoniae*, SHV-12, TEM-1

광범위 β -lactam 분해효소(extended spectrum β -lactamase, ESBL, EC 3.5.2.6)를 생성하는 세균들은 β -lactam ring을 가진 항균제의 amide 결합을 분해시켜(4, 5, 23) cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxon과 같은 oxyimino β -lactam류 항균제와 monobactam, aztreonam 등을 불활성화 시킨다. 이 효소는 염색체를 통하여 전파되기도 하지만 plasmid로 매개되는 TEM 또는 SHV형의 β -lactamase가 대부분이며 이중에서 특히 TEM 형이 주도가 되어 쉽게 다른 세균으로 전달된다(8, 10). 이와 같은 plasmid 매개성 ESBL은 1983년 독일의 한 병원에서 분리되었고(9, 17), 이후 전 세계적으로 급속하게 확산되어 치료에 많은 어려움을 주고 있다(17, 21).

이들은 크게 Bush의 DNA 분자구조 차이와 Ambler의 β -lactamase 구조에서 아미노산 서열을 기준으로 분류된다(1). 일반적으로 Bush 분류가 널리 사용되어지고 있는데 TEM이나

SHV β -lactamase 구조에서 1-4개의 아미노산 치환이 일어난 변이형으로서 구조 유전자의 점돌연변이(point mutation)가 일어난 것이다(6). Bush-Jacoby-Medeiros (5, 6)의 기능적인 특성에 중점을 둔 분류에 따르면 기질과 억제제의 성상에 따라 β -lactamase는 크게 4개의 군으로 나뉜다. 제 1군은 cephalosporin을 분해하는 효소로 clavulanic acid에는 저해가 일어나지 않으며, 제 2군은 β -lactamase 저해제에 의해서 저해가 잘 일어나며 제 3군은 methallo- β -lactamase로서 EDTA와 *p*-chloromercuribenzoate를 제외한 알려진 모든 β -lactamase에 대하여 저해되지 않으며 제 4군은 clavulanic acid에 저해되지 않는 penicillin 분해효소들을 말한다(8, 9, 16).

임상에서와 자연 환경에서 빈번하게 분리되고 있는 ESBL 생성균종은 장내세균과 (*Enterobacteriaceae*) 세균 중 *Klebsiella* 속과 *Escherichia* 속 세균이 대부분이지만 *Salmonella*, *Enterobacter* 등 여러 종류의 장내세균군에서도 다양하게 분리되고 있으며 이들에 대한 약제 내성기작들이 밝혀지고 있다(21).

* For correspondence. E-mail: hunku@pknu.ac.kr; Tel: +82-51-629-5613; Fax: +82-51-629-5619

우리나라의 경우, 1990년대부터 plasmid 매개성 ESBL 생성 균주가 환자의 여러 가검물로부터 분리되고 있고 ESBL 유형도 다양하다(11, 13, 21). 그리고 도축장이나 생활하수 소하천 등 여러 자연환경으로부터도 분리되고 있어 이미 ESBL 생성 균주는 자연계로 확산된 것으로 생각되고 있다(14, 15).

본 연구에서는 부산지역의 광범위한 지역의 생활하수를 처리하는 하수종말처리장에서 생활하수 속의 ESBL 생성균주를 분리하고 ESBL 유형을 파악하기 위하여 이루어졌다. 앞서 언급한 바와 같이 ESBL 생성균주는 생활주변의 여러 환경으로부터 분리되고 있기 때문에 인간 생활과 매우 밀접한 관계가 있는 하수종말 처리시설을 연구지역으로 선택하였다. 생활 하수와 수세식변기의 오수는 절대 호기성 환경부터 절대 혐기적인 다양한 조건을 통하여 하수 종말처리장으로 유입되며 자연계 환경으로부터 획득된 ESBL 유형과 생성균주를 가장 확실하게 확보할 수 있는 조건을 가지고 있다. 이러한 이유로 부산 환경관리공단에 소속된 10개의 하수종말처리장 중의 하나인 수영사업소(부산광역시 동래구 안락 2동 소재)를 검체분리 장소로 선정하였다. 수영사업소 산하 수영공공하수처리시설은 동래구와 연제구, 금정구 전역과 부산진구, 해운대구, 수영구 일부 등 부산광역시의 동북부 생활하수와 수세식변기의 오수가 처리되며 1단계와 2단계 2개 계열로 나뉘어져 있다.

재료 및 방법

균주분리

2009년 8월 부산 수영공공하수처리시설은 제 1처리장 (1단계; 균주번호 a)과 제 2처리장 (2단계; 균주번호 b)의 유입 하수를 각각의 멸균된 500 ml 플라스틱 채수병에 받아 실험실로 운반하였다. 채수병에서 0.1 ml을 취하여 곧바로 제 3세대 항균제인 ceftazidime (Young-Jin Pharm., Korea) 1 µl/ml을 첨가한 장내세균 선택배지인 MacConkey agar (Difco laboratories, USA)에 고르게 도말하여 37°C에서 17시간 배양하여 균 집락을 얻었다. 이를 다시 ceftazidime 1 µl/ml이 첨가된 MacConkey agar상에 재접종하여 생존여부를 재확인 한 다음 brain heart infusion (BHIA, Difco laboratory) 평판배지에서 순수 분리하였다. 이후 Kligler iron agar (KIA), indole, methyl-red, Simmon's citrate, lysine arginine ornithine decarboxylase dihydrolase 시험과 10여 종의 당 발효능 검사 등 여러 생화학 검사를 실시하여 종 수준까지 최종 동정하였다. 배지제조는 Difco manual (Difco Laboratories)을 따랐고 균주의 동정은 Ewing (7)을 따랐다.

항균제시험

이중 디스크 확산시험(double disk synergy test)은 McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 대수기의 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 미리 만든 3 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA, Difco Laboratory, USA) 평판배지에 고르게 도말 하였다. 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 µg) disk를 놓고 이 디스크 중앙으로부터 각각 25 mm 떨어진 곳에 cefotaxime

(30 µg), ceftazidime (30 µg) 및 ceftriaxone (30 µg) 디스크를 올려놓아 37°C에서 18시간 배양한 후 ticarcillin/ clavulanate 와 해당 항균제 사이에 투명대 형성 유무를 확인하여 상승효과를 판정하였다(13, 14). 사용된 항균제는 모두 BBL (Becton Dickinson, Microbiology System, USA) 제품의 디스크였다.

비 세파계열 항균제 감수성 검사는 amikacin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg) 와 tetracycline (30 µg) 등 8종 디스크였고 이중디스크 확산시험에서와 같이 MHA 평판배지에 균을 도말하고 15분 정도 건조시킨 다음 해당 항균제 디스크를 올려놓고 37°C에서 17시간 배양 후 BBL 사의 판독기준에 따랐다.

제 3세대 항균제의 최소억제농도 시험은 제 3세대 세파계열 항균제인 ceftazidime (Young-Jin Pharm, Korea), ceftriaxone (Young-Jin Pharm), cefotaxime (Young-Jin Pharm), cefuroxime (SK Chemical, Korea), amoxicillin (Sigma, Sigma-Aldrich, Korea)과 제 1세대 세파계열인 cephalothin (Sigma, Sigma-Aldrich)과 penicillin계열인 ampicillin (Sigma, Sigma-Aldrich) 및 sodium azide (Shinyo Pure Chemicals Co., Japan)였다. Amoxicillin은 1 M의 NH₄OH 용액에 녹인 다음 증류수로 희석하였고 나머지 항균제는 증류수에 녹였다. 항균제 농도는 Mueller-Hinton 평판배지 1 ml 당 1/8부터 256 µg이 되도록 1:1 단계 희석을 시켰다. 항균제 효능 검정기준으로 사용된 균주는 *E. coli* ATCC 25922이었고 판독기준은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (18)를 따랐다.

등전점(Isoelectric focusing, IEF)

등전점 측정을 위한 crude β-lactamase 추출은 균을 BHI 액체배지 30 ml에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 후 5,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전된 세균을 모아 3차 증류수 1 ml에 재부유 시켰다. 이를 초음파 파쇄기(Ultrasonic homogenizer 4710. Cole-Palmer Instrument Co., USA)로 30 초간 6회 분쇄하고 고속 원심분리기(Hanil, Korea) 14,000 rpm 로 3분간 원심분리하여 상층액을 새로운 eppendorf tube로 옮겨 -20°C에 보관하였다(14, 15).

유리판 위에 pipette을 이용하여 증류수 몇 방울을 떨어뜨리고 gel support film의 소수성 부분을 유리판에 기포가 생기지 않도록 하여 부착시켰다. Polyacrylamide gel을 제조하여(14) 적당량(3-4 ml)을 분주하고, 분주된 gel 위에 gel support film의 친수성 부분을 기포가 생기지 않도록 주의하면서 부착시키고 30 cm 떨어진 형광등 아래에서 1시간 중합시켰다. 중합이 끝난 후 유리 gel판 위에 sample template를 놓고 2 µl를 loading 한 후 5분간 상온에서 방치한 다음 sample template를 제거하였다. Isoelectrofocusing Chamber (Mine IEF Cell 111., Bio-Rad Co., USA)의 흑연전극에 증류수로 적당히 습윤한 상태를 유지시키고 유리 gel판의 gel이 흑연전극에 닿도록 하여 100 V에 30분, 200 V에 30분, 450 V에서 60분간 전기영동 시켰다(14).

전기영동이 끝난 유리 gel판으로부터 gel support film을 분

리하여 phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 nitrocefin (500 µg/ml, Glaxo, USA)을 1-2 ml 정도를 gel 표면 위에 뿌려 준 후 적색 band가 나타나면 Wattman No. 2 여과지를 gel 위에 덮어 착색시키고 IEF marker 3-10 (Serva liquid mix, Germany)로 등전점(isoelectric focusing point, IEF)을 판독하였다(13). Marker 단백질 염색과 탈색은 Sambrook (24)를 따랐다.

Plasmid 분리 및 Polymer Chain Reaction (PCR)를 이용한 ESBL 유전자의 형별 분류

전보에서와 같이(14, 15) BHI에서 배양된 균주 1 ml을 3,000×g로 원심분리하여 얻은 침전된 세균을 같은 양의 생리 식염수로 세차 부유시켜 3회 세척하였다. 이를 plasmid의 분리 kit인 Plasmid Minipreps DNA Purification kit (Injae Science Co., Korea)를 사용하여 분리하였다. ESBL 균주의 형별 확인을 위하여 사용된 primer는 각각 TEM-1형과 SHV-1형 및 CMY-1형의 보존적 염기서열을 이용하여 Cosmogenetech (Korea)에서 제작하였다.

TEM형 primer는

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

Reverse: 5'-GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC-3'

SHV형 primer는

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

Reverse: 5'-GGT TAG CGT TGC CAG TGC T-3'

CMY-1형 primer는

Forward: 5'-ATG CAA CAA CGA CAA TCC ATC-3'

Reverse: 5'-GTT GGG GTA GTT GCG ATT GG-3'

PCR은 pre-mix (Biosesang, Korea)에 해당 primer (10 pmol)를 각각 1 µl, template를 1 µl 씩 넣고 증류수 7 µl를 넣어 전체 양이 20 µl이 되게 하였다.

TEM형 확인을 위한 PCR 조건은 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 120초로하여 24 cycle을 반복하였다. CMY형의 확인을 위해서는 denaturation 94°C 30초, annealing 60°C 60초, extension 72°C 90초로 30 cycle 중합하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)를 사용하였다. 얻어진 PCR 생성물을 DNA 염색제인 DMF gel stain (Komabio-Technology, Korea) 용액을 1/100로 희석하여 3 µl 첨가하고 1.0% agarose gel에 loading TBE buffer 속에서 50 V로 30분간 전기영동하여 해당 유형의 band가 생성되는지를 UV 형광등 아래에서 확인하였다(13, 14).

교차접합시험(Transconjugation)에 의한 내성 전달

ESBL 생성이 확인된 균주를 전달균주로 하고 sodium azide

에 내성인 *E. coli* J53 균주를 피전달균주로 하여 교차접합시험을 실시하였다(13, 14). BHI에서 배양된 대수 증식기 중반의 전달균주 0.1 ml과 피전달균주 1 ml을 새로운 BHI에 10 ml에 접종한 다음 37°C에서 진탕시키지 않고 18시간 배양하였다. 이 배양액을 0.1 ml 취하여 ceftazidime (16 µg/ml)+sodium azide (100 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar에 고르게 도말하고 37°C에서 18시간 배양하여 균집락 생성 유무를 조사하였고 생화학 검사를 실시하여 피전달 균주인 *E. coli* J53과 생화학 성상의 일치 여부를 재확인하였다. 이후 이 균주들에 대한 PCR, 전기영동 등전점 시험으로 plasmid에 의한 내성이 전달되었음을 확인한 다음 gel extraction kit (Cosmogenetech, Korea)로 정제하여 전기영동으로 해당 생성물을 확인하고 Cosmo-genetech (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석기는 ABI 3730 XL (Applied Biosystems, USA)로 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit를 이용하여 kit의 자동 DNA 서열분석 순서(automatic DNA sequencing protocol)를 따라서 이루어졌다. Cycle sequencing 방법으로 염기서열을 해독한 다음 염기서열분석 반응에 참여하지 않은 형광물질로 표지된 ddNTP를 에탄올 침전 방법으로 제거하였다. 정제가 끝난 후 멸균 증류수나 HDF (Hi-Di Formamide)에 녹여 기기에 장착하여 전기 영동하였다(14).

염기서열 결정 후, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 BCM Search Launcher (<http://searcher.laumcher.bcm.tmc.edu/>)를 이용하여 Multiple Sequence Alignment, Sequence Utility에서 개시코돈을 확인하고 해당 아미노산 결정과 유사도 등을 비교하고 ESBL 유형을 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.

결과

ESBL 생성 장내세균의 분리동정

Ceftazidime (1 µg/ml)이 첨가된 MacConkey 평판배지에서 균집락을 형성한 균주들을 선택하여 BHI 평판배지에 순수 배양을 하였고 이들 중 이중디스크(Double disk synergy) 확산시험 결과 중앙에 놓여진 ticarcillin/clavulanic acid와 주변에 놓인 제 3세대 항균제 사이에 간섭현상을 나타내 투명대를 형성하고 전기영동결과 TEM이나 SHV 생성물을 형성하는 14균주를 최종실험 모균주로 선택하였다(Figs. 1 and 3). 이들에 대한 생화학 검사로 균을 동정한 결과 장내세균인 *E. coli* (10균주)와 *K. pneumoniae* (4균주)를 얻었다. 그람 염색 및 oxidase 시험 결과 2종 모두 음성을 나타내었고, catalase 시험은 양성을 나타내었다.

*E. coli*의 생화학적 성상은 다음과 같았다. KIA 배지 상에서 slant 부분과 butt 부분에서 산을 생성(A/A)하였고, 0.4% 한천이 첨가된 nutrient 반고체 배지에서 운동성을 나타내었다. Indole 양성, methyl-red 양성, Voges-Proskauer 음성, Simmon's citrate agar 배지 상에서 단독 탄소원으로 citrate를 이용하지

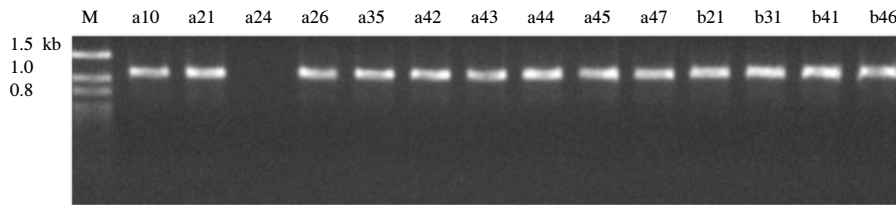


Fig. 1. TEM-type of parental strains. Each lane shown the TEM-type of ESBL products produced by PCR. M, Marker; a and b, Two different collection sites.

못하였다. Lysine decarboxylase 시험 양성, arginine dihydrolase 음성, ornithine decarboxylase 양성반응을 나타내었다. 당발효 시험은 당 종류에 따라 다양하였지만 대부분의 당을 발효시켰다. 분리된 장소는 제 1단계 지에서 6균주(a21, a26, a35, a42, a43, a44) 제 2단계 지에서 4균주(b21, b31, b41, b46)가 분리되었다(Table 1).

*K. pneumoniae*는 MacConkey 평판배지에서 전 균주가 중앙이 선명한 적색, 주변부가 투명한 동심원으로 집락 표면에 점성을 띄는 매끄러운 convex 형태였다. KIA 배지 상에서 slant 부분과 butt 부분에서 산을 생성(A/A)하였다. Indole 음성 methyl-red 음성, Voges-Proskauer 양성, Simmon's citrate 음성, lysine decarboxylase 양성, arginine dihydrolase 음성, ornithine decarboxylase 음성이었다. 시험된 대부분의 당을 발효시켰고 0.4% 한천이 첨가된 nutrient 반고체 배지에서 운동성이 없었다. 제 1단계 지에서만 4균주(a10, a24, a45, a47)가 분리되었다(Table 1).

모균주의 PCR 및 등전점 결과

Plasmid를 추출하여 PCR 생성물을 확인한 결과 1,080 bp 부근에서 TEM형의 생성물을 형성한 균주는 *E. coli* 전균주(10균주), *K. pneumoniae*에서 3균주(a10, a45, a47)였다. SHV형의 생성물(880 bp)을 형성한 균주는 *E. coli*에서 1균주(a43)였고 *K. pneumoniae*에서 4균주(a10, a24, a45, a47)였다. 이중 균주번호 a24는 SHV 단일 형태였고 나머지 4균주는 TEM+SHV형이었다(Figs. 1 and 3). CMY형의 생성물은 형성되지 않았다.

등전점 결과는 다음과 같았다. *E. coli* 10균주 중 1균주(a43)는 pI 5.4와 pI 8.4 2곳에서 생성물을 형성하였고 그 외 9균주는 pI 5.4에서 단일한 생성물을 형성하였다(Fig. 5). *K. pneumoniae* 4균주 중 1균주(a 24)만 pI 8.4에서 단일한 생성물을 형성하였고, 나머지 3균주는 pI 5.4와 pI 8.4 2곳에서 생성물을 형성하였다(Fig. 5).

Table 1. Biochemical properties of the strains isolated from Suyeong sewerage disposal plant

Test \ Strain No.	a10	a21	a24	a26	a35	a42	a43	a44	a45	a47	b21	b31	b41	b46
KIA	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Indole production	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Methyl-Red	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Citrate, Simmons	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Lysine, Moeller's	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Arginine, Moeller's	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Ornithine, Moeller's	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Motility	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Gas from glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production from:														
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Adonitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Inositol	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Species	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

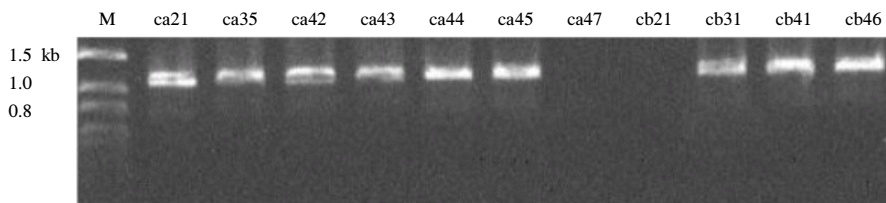


Fig. 2. PCR products of transconjugant TEM-type. c designated conjugant strain, transmitted by ESBL plasmid of parental strains.

항균제 감수성 검사

모균주에 대한 3세대 cephalosporin 계열과 sodium azide 항균제에 대한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 검사 및 비 cephalosporin 계열에 대한 디스크 감수성 시험을 실시한 결과는 아래와 같았다. 비 cephalosporin 계열에 대한 디스크 감수성 시험 결과 *E. coli*는 amikacin, chloramphenicol, imipenem 등 3종의 항균제에 대하여 전 균주가 감수성을 나타내었고 erythromycin에는 전 균주가 내성을 나타내었다. 다약제 내성 유형은 1종의 항균제에 내성을 가지는 균주 4 균주(a43, a44, b21, b46), 3종 내성 2균주(a21, a26), 4종 내성 1균주(b31), 5종 2균주(a35, a42)이었고 1균주(b41)는 3종의 항균제에 내성을 1종의 항균제에는 중등도 내성을 나타내었다. *K. pneumoniae*는 imipenem에 전 균주가 감수성을 나타내었다. 1균주(a47)가 2종의 항균제에 내성을, nalidixic acid에 중등도 내성을 나타내었다. 나머지 3균주는 5종의 항균제에 내성을 나타내었고, 1종류의 항균제에 중등도 내성을 나타냈지만 중등도 내성을 나타내는 항균제는 균주에 따라 다르게 나타났다(Table 2).

교차접합시험(Transconjugation)에 의한 내성 전달 검사

MIC 시험결과를 토대로(Table 2) ceftazidime (16 µg/ml)과 sodium azide (100 µg/ml)가 첨가된 MacConkey agar 배지에서 교차접합시험을 실시한 결과 *E. coli*에서 1균주(a26), *K. pneumoniae*에서 2균주(a10, a24) 등 3균주가 접합자를 형성하지 못하였고, *E. coli*에서 9균주와 *K. pneumoniae*에서 2균주가 접합자를 형성하였다. 접합자에서 plasmid를 추출하여 PCR로 유전자 전달을 확인한 결과는 Fig. 2, Fig. 4와 같다. 접합자를 형성하기는 하였지만 TEM 또는 SHV 유전자를 접합자에게 넘겨주지 못한 것은 균주는 2균주로서 *E. coli*에서 1균주(b21)와 *K. pneumoniae*에서 1균주(a47)였다. 접합자를 형성한 9균주(ca21, ca35, ca42, ca43, ca44, ca45, cb31, cb41, cb46)중 8균주는 부모가 가진 ESBL 유전자를 모두 전달 받았다. 나머지 1균주(*E. coli* ca43)는 부모가 가진 ESBL 두 개의 유전자중 한쪽(TEM)만 plasmid 매개에 의하여 전달 받았다(Figs. 1, 2, 3, and 4).

접합자 β-lactamase 등전점

접합자를 형성한 11균주 중 적어도 부모의 한쪽 ESBL을 넘

Table 2. Antibiotics test and IEF of β-lactamase of parental strains

Strain No.	MIC test								pI(s)	Disk test							
	AM	AmC	CAZ	CF	CRO	CTX	CXM	SA		AN	C	E	GM	IPM	K	NA	Te
<i>E. coli</i>																	
a21	>256	>256	64	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	S	S	S	R	R
a26	>256	>256	64	>256	>256	>256	>256	32	5.4	S	S	R	S	S	S	R	R
a35	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	R	S	R	R	R
a42	>256	>256	64	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	R	S	R	R	R
a43	256	>256	64	>256	>256	>256	>256	64	5.4, 8.4	S	S	R	S	S	S	S	S
a44	256	>256	64	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	S	S	S	S	S
b21	>256	>256	32	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	S	S	S	S	S
b31	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	S	S	R	R	R
b41	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	R	S	I	R	S
b46	>256	>256	64	>256	256	>256	>256	64	5.4	S	S	R	S	S	S	S	S
ATCC 25922	4	16	1/4	16	1/4	1/4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J53	1	>256	1/4	8	1/4	1/4	16	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>																	
a10	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	64	5.4, 8.4	S	R	R	R	S	I	R	R
a24	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	64	8.4	S	R	R	R	S	I	R	R
a45	>256	>256	>256	>256	256	256	>256	32	5.4, 8.4	I	S	R	R	S	R	R	R
a47	256	>256	>256	>256	256	256	>256	64	5.4, 8.4	S	S	R	S	S	R	I	S

Abbreviations: AM, ampicillin; AmC, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CF, cephalothin; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime SA, sodium azide; AN, amikacin (30 µg); C, chloramphenicol (30 µg); E, erythromycin (15 µg); GM, gentamicin (10 µg); IPM, imipenem (10 µg); K, kanamycin (30 µg); NA, nalidixic acid (30 µg); Te, tetracycline (30 µg); R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; -, not tested

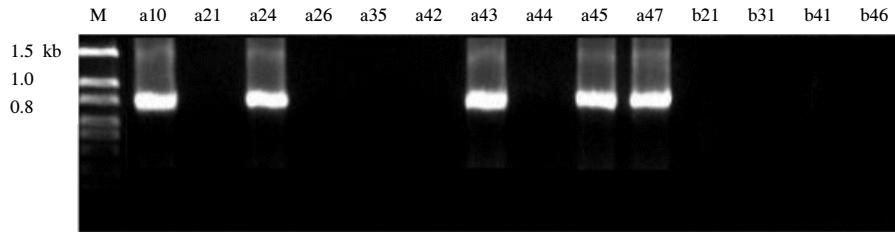


Fig. 3. SHV-type of parental strains.

겨받은 9균주(*E. coli* 8균주, *K. pneumoniae* 1균주)에 대한 등전점은 *K. pneumoniae* ca45 1균주만 pI 5.4와 pI 8.4 부근에서 2개의 생성물을 형성하였고 나머지 전 균주는 pI 5.4 부근에서 단일한 생성물을 만들었다(Fig. 6).

ESBL 유전자의 염기서열 분석

PCR 생성물과 등전점 분석결과 접합자를 형성한 *E. coli*는 어미균주와 접합자 9균주 모두 TEM형 pI 5.4였고, *K. pneumoniae*는 TEM+SHV형의 특성을 가졌기 때문에 *E. coli* 2균주(a21, ca21, b41, cb41)와 *K. pneumoniae* (a45, ca45) 1균주를 선택하여 해당 ESBL 염기서열을 분석하였고 그 결과, TEM형의 경우 이들의 부모효소인 TEM-1과 완전히 일치되었고 SHV형은 SHV-12와 완전히 일치되었다.

고찰

Extended-spectrum β -lactamase를 생성하는 장내세균은 국내외를 막론하고 대부분 임상 가검물로부터 얻어진 것들이며 (20) 그 외의 환경검체 등에서는 자주 보고되지 않고 있다(2, 26). 그러나 우리나라의 경우 부산지역의 도축장이나 하천수 등 생활환경에서 이미 plasmid 매개성 ESBL 생성균들이 분리되었고 이들의 ESBL 유형도 조사된 바가 있다(14, 15).

부산지역의 하수종말처리시설은 부산환경공단 산하 수영, 강변, 남부, 녹산, 신호, 해운대, 서부, 중앙, 기장, 정관 등 10곳이 있고, 본 연구의 검체채취지역인 수영사업소 산하 수영공공하수처리시설은 1단계와 2단계로 계열화 되어있다. 1단계는 주로 수영과 해운대 라인으로 일 최대 처리량은 286,000 톤으로 A, B, C 3개의 계열로 구성되어있고 각 계열당 12개의 지로 구성되어 36개의 지를 형성하고 있다. 2단계는 A-G까지 7개 계열로 구성되고 각 계열마다 4개지가 이루어져 총 28개로 이루어진 복층구조를 가지고 있으며 주요 처리지역이 범어사-

온천천 라인으로 일 최대 처리량은 264,000톤이며 일부 하수는 제 1단계로 넘겨진다. 따라서 이 두 곳의 일 생활하수 처리량은 총 550,000톤이다. 하수처리는 표준활성슬러지공법이었다. 처리후 방류수는 수영강으로 방류되었다. 수영사업소의 원수유입구조를 감안하여 채수도 제 1단계(균주 번호 a)와 제 2단계(균주번호 b)로 나누었고, 일단 지로 들어온 하수는 원수에서 섞여 각 계열 지로 인위적으로 나뉘어지기 때문에 계열별 1곳씩 채수하였다.

Plasmid 매개성 ESBL 생성균주는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 가장 대표적인 세균이며 이 두 종의 세균은 기회감염균과 원내감염균으로 매우 중요하다(9, 10, 25).

우리나라에서는 TEM형의 경우, 임상 가검물에서 TEM-52형이 우점종으로 분리되는 것으로 보고되었고(10, 20), SHV는 SHV-12가 우점종으로 분리되고 있다(12). 도축장이나 수계 등 인간의 생활환경에서 분리된 TEM 유형은 TEM 유형의 모효소인 TEM-1이 가장 많이 분리되고 있다(14, 15). 환경에서 분리된 SHV형은 제한된 자료이지만 SHV-12가 가장 빈도가 높게 단일유형으로 분리되며(14, 15), 본 연구에서도 이 결과와 일치되었다. 환경에서 분리된 SHV 유형의 자료가 아직 많이 축적되지 않았기 때문에 SHV-12를 우점종으로 말하기는 어렵겠지만 SHV-12가 우리나라에서 분리되는 SHV 유형의 우점종일 가능성이 높다고 생각된다(14). SHV-12는 SHV-1에서 35Leu→Gln, 238Gly→Ser, 240Glu→Lys로 치환된 것으로 pI 8.2로 SHV-5a로 분류되던 것이었다(19). 입원환자들에게 원내 감염을 일으켜 집단적인 발병을 일으키기도 한다(10).

본 연구에서 얻어진 결과들을 고찰하면 다음과 같다. 분리된 장내세균은 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 2균종이었다. 이들 두 균종의 생화학적 성상의 차이는 indole, methyl-red, Voges-Proskauer, 및 Simmon's citrate 배지에서 citrate를 단독 탄소원으로 이용 여부로 쉽게 구분이 되며, 특히 *K. pneumoniae*는 운동성이 없는 것이 균의 중요한 생화학적 특성이다(7). 항균제

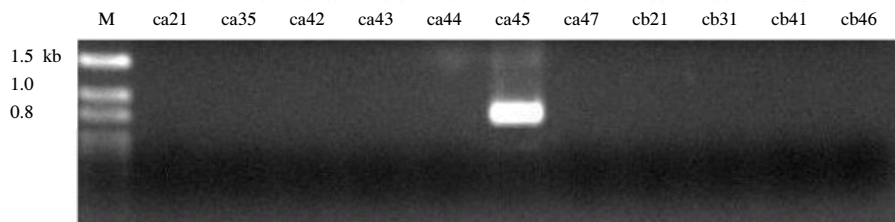


Fig 4. PCR product of transconjugant SHV-type.

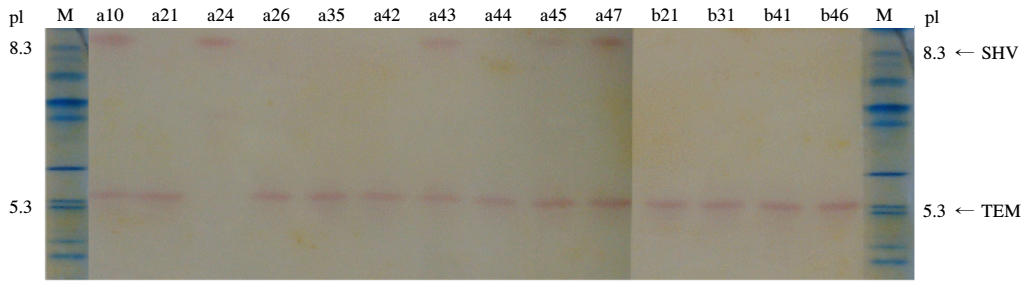


Fig. 5. IEF points of ESBL produced by parental strains.

감수성시험결과 수영사업소 산하 수영공공하수처리시설에서 분리된 14균주들은 대부분 ampicillin이나 amoxicillin과 같은 β -lactam 구조를 가진 penicillin류 항균제들과 제 1세대 cephalosporin인 cephalothin 뿐 아니라 oxyimino β -lactam류 제 3세대 cephalosporin류 항균제에 강력한 내성(>256 $\mu\text{g/ml}$)을 획득한 상태였다(Table 2)(18). 비 oxyimino β -lactam류 항균제 디스크 시험결과는 약제에 따라 다양한 내성을 나타내었지만 kanamycin에서 유래된 반합성 aminoglycoside 항균제인 amikacin에서 감수성을 나타내었고 thienamycin에서 유래된 광범위 β -lactam 항균제인 imipenem에는 전 균주가 감수성을 나타내었다(3).

어미균주의 등전점(IEF) 결과는 분리된 균종에 관계없이 TEM의 경우 pI. 5.4에서 단일한 생성물을 형성하였다(Fig. 1). 항균제감수성시험을 토대로 접합자 형성 확인을 위한 ceftazidime 농도를 16 $\mu\text{g/ml}$, sodium azide 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하였다. Plasmid 매개로 ESBL 유전자가 피전달체인 *E. coli* J53에 전달되지 못한 3균주를 제외한 11균주가 접합자를 형성하였고(*E. coli* 9균주, *K. pneumoniae* 2균주), 접합자들에 대한 생화학 검사 모두 피전달 균주와 동일한 *E. coli*를 확인하였다.

TEM형의 모균주와 접합자들에 대한 PCR 생성물에 대하여 직접 염기서열분석(direct sequencing)결과와 아미노산 서열분석결과 이들이 생성하는 광범위 β -lactam 분해효소는 모두 TEM-1형으로, 이 TEM-1형은 TEM-2형 SHV-1형과 함께 점 돌연변이를 일으켜 수많은 종류의 광범위 β -lactam 분해효소를 만들어내는 부모효소이다(22).

본 시험결과 수영공공하수처리시설에서 분리된 광범위 β -lactam분해 효소(ESBL)는 부모형인 TEM-1형과 SHV-1에서 3개의 아미노산이 치환된 SHV-12형이었고 특히 SHV-12는 부

산지역의 여러 생활환경에서 가장 많이 분리되는 단일형이다 (14, 15).

적요

본 연구는 부산 환경관리공단 수영사업소 산하 수영공공하수종말처리장 하수로부터 광범위 베타락탐 분해효소(ESBL, extended-spectrum β -lactamase)의 유형을 파악하기 위하여 이루어졌다. 수영공공하수처리시설은 부산광역시의 동북부 생활하수와 수세식변기의 오수가 표준활성슬러지공법으로 처리되며 일 생활하수 처리량은 총 550,000톤이다. 이중디스크 확산 검사, 제 3세대 세파계열 항균제에 대한 최소억제농도 시험을 통하여 14균주를 선별하였다. Indole, methyl-red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate, decarboxylase-dihydrolase 시험과 당 발효 시험 등 생화학 검사를 통하여 동정한 결과 *Escherichia coli* (10균주), *Klebsiella pneumoniae* (4균주)가 동정되었다. 이를 전달균주로, sodium azide에 내성을 가진 피전달 균주인 *E. coli* J53에 교차접합을 시켜 11균주 (*E. coli* 9균주, *K. pneumoniae* 2균주)가 접합이 이루어졌다. 접합자중 2균주는 ESBL 유전자를 전달받지 못하였고 9균주는 부모로부터 ESBL 유전자를 전달받았다. 등전점, 유전자서열과 단백질서열 분석 등을 통하여 피전달균주인 *E. coli* J53에 전달된 유전자유형은 TEM형의 모형인 TEM-1과 SHV-12형으로 규명되었다.

감사의 말

본 논문은 2007 (No. 001200200708100)년 부경대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

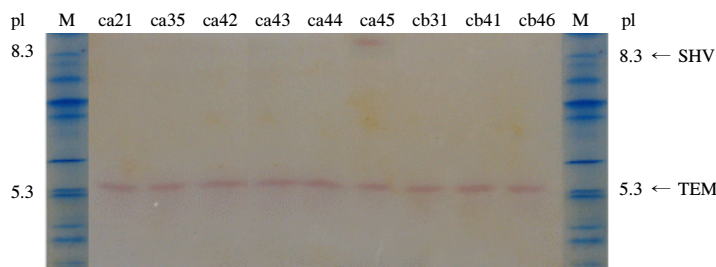


Fig. 6. IEF points of ESBL produced by transconjugants.

참고문헌

1. Ambler, R.P., A.F.W. Coulson, N.M. Frere, J.M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R.C. Lebversque, G. Tiraby, and S.G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for class A β -lactamases. *Biochem. J.* 276, 269-272.
2. Brinas, L., M. Zarazaga, Y. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002. β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3156-3163.
3. Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, P.E. Heckelman, and J.F. Kinneary. 1996. The Merck Index. Merck & Co., Inc., USA.
4. Bush, K. 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 259-263.
5. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
6. Bush, K. and G. Jacoby. 1997. Nomenclature of TEM β -lactamases. *Antimicrob. Chemother.* 39, 1-3.
7. Ewing, W.H. 1986. The genus *Klebsiella*. In W.H. Ewing (ed.), Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, New York, N.Y., USA.
8. Jacoby, G.A. 1994. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 2-11.
9. Jacoby, G.A. and I. Carreras. 1990. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 859-862.
10. Jarlier, V., M.H. Nicolas, G. Fourrier, and A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamase conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews Infect. Dis.* 10, 867-878.
11. Jeong, Y.S., J.C. Lee, H.Y. Kang, H.S. Yu, E.Y. Lee, C.H. Choi, S.H. Tae, and *et al.* 2003. Epidemiology of nalidixic acid resistance and TEM-1-and TEM-52-mediated ampicillin resistance of *Shigella sonnei* isolates obtained in Korea between 1980 and 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3719-3723.
12. Kim, J., Y. Kwon, H. Pai, J.W. Kim, and D.T. Cho. 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamase: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1446-1449.
13. Kim, Y.T. and H.K. Lee. 2000. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimen in Pusan. *Kor. J. Microbiol.* 36, 221-227.
14. Lee, H.K. 2006. Typing of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* isolated from slaughterhouse in Pusan, Korea. *Kor. J. Microbiol.* 42, 125-130.
15. Lee, H.K., H.J. Kim, and G.D. Kim. 2007. Typing of extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from rivers in Pusan, Korea. *Kor. J. Microbiol.* 43, 116-123.
16. Kirby, R. 1992. Evolutionary origin of the class A and class C. *J. Mol. Evol.* 34, 345-350.
17. Medeiros, A.A. 1993. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann. Intern. Med.* 119, 428-430.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS document M2-A6. NCCLS, Wayne, Pa, USA.
19. Nuesch-Inderbinen, M.T., F.H. Kayser, and H. Haechler. 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.
20. Pai, H.J., S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim, and Y. Kwon. 1999. Survey of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.
21. Philippon, A., R. Labia, and G. Jacobi. 1989. Extended-spectrum β -lactamases (minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131-1136.
22. Randegger, C.C., A. Keller, M. Irla, A. Wada, and H. Hächler. 2000. Contribution of natural amino acid substitutions in SHV extended-spectrum β -lactamases to resistance against various β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2759-2763.
23. Rasheed, J.K., G.J. Anderson, H. Yigit, A.M. Quanan, A. Doménch-Sánchez, J.M. Swenson, J.W. Biddle, M.J. Ferraro, G.A. Jacoby, and F.C. Tenover. 2000. Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2382-2388.
24. Sambrook, J., F.E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, I. 1.25-1.28.
25. Silva, J., R. Gatoca, C. Auguilar, Z. Becerra, U. Garza-Ramos, M. Velázquez, G. Miranda, and *et al.* 2001. Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3193-3196.
26. Teshager, T., L. Domínguez, M.A. Moreno, Y. Saénz, C. Torres, and S. Cardeñosa. 2000. Isolation of an SHV-12 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3483-3484.