

부산 도축장에서 분리된 광범위 베타 락탐 분해효소(Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) 생성 장내세균의 형별분류

이훈구

부경대학교 자연과학대학 미생물학과

본 연구에서는 도축장과 도축물에서 plasmid 매개성 광범위 β -lactam (extended spectrum β -lactamase) 분해 효소를 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*가 분리됨으로서 한국에서는 이들 균주가 임상범위를 넘어 자연계까지 확산되었음을 확인하였다. 디스크 확산 시험, 등전점 수치, 접합시험 등을 통하여 돼지의 분변으로부터 최종 10균주의 접합자를 얻었고 이들의 형별결정은 아미노산 서열분석과 기준주와 대조 등을 BCM Search Launcher 및 NCBI blast를 통해 이루어졌다. 광범위 β -lactam 유형은 *Klebsiella pneumoniae* 8균주가 TEM-52 형이었고 2균주 *Escherichia coli*가 SHV-12형이었다. CMY-1형은 본 연구에서 분리되지 않았다.

Key words □ extended-spectrum β -lactamase (ESBL), isoelectric focusing (IEF), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, TEM, SHV, CMY

광범위 베타락탐 효소(extended-spectrum β -lactamase, ESBL)는 penicillin계와 헴범위 cephalosporin뿐만 아니라 제3세대 cephalosporin계, 그리고 monobactam계 등의 광범위 항균제를 가수분해하는 효소이다(14).

1983년 독일에서 plasmid에 의해서 매개되어진 ESBL 생성균주가 출현됨으로서 기존의 β -lactam 항균제와 제3세대 cephalosporin 계열의 β -lactam 항균제들이 무력화되어지고 있다(24, 29).

이 기작은 β -lactam 항균제의 ring에 있는 carbonyl moiety에 공유결합을 하여, ring의 amide결합을 가수분해 시킴으로서, 항균제를 무력화시키며(24, 28), 한 두 곳의 유전자가 돌연변이(point mutation)되어 기존 아미노산에 변형(mutation)이 일어나 다양한 등전점(pI) 값을 가진다(14, 15, 24). 이 결과 현재 여러 종류의 ESBL이 보고되고 있으며, 초기에는 명명체계의 많은 혼란이 있었지만, Bush와 Jacoby에 의해서 체계화 된 TEM형과 SHV형이 주종을 이룬다(21). 여러 종류의 β -lactamase가 발견됨에 따라 명칭에 혼선을 피하기 위하여 생성물인 단백질에 표준번호를 부여하고 있다(10).

ESBL 연구는 환자나 임상가검물로부터 분리된 균주들이 대부분이며(23, 24) 한국의 경우 1990년대 초반 이후 환자나 환자 가검물로부터 빈번하게 분리되어 보고되고 있다(1, 3, 4, 5).

ESBL 생성균에 대한 보고와 임상양상에 관해서는 앞에 언급한 바와 같이 거의 모든 나라에서 분리되고 있지만, 필자는 ESBL 생성균주가 이미 환자나 임상가검물에서만 국한되지 않고 생활하수나 주변 환경 혹은 도축장과 같은 인간의 생활과 밀접한 장소에 이미 균주들이 확산되어 존재하고 있을 것으로 생각

하고 있다.

이와 같은 관점에서 우리 식생활과 밀접한 관계가 있는 도축장을 검체분리장소로 선정하였고, 2002년부터 2004년까지 부산 지역의 한 도축장을 연구지역으로 선정하고 도축된 소와 돼지의 내장 및 부산물로부터 ESBL 생성균주 분리를 시도하였다.

도축장을 선정한 이유는 한국의 축산 농가는 가축의 질병예방과 치료를 목적으로 항균제를 사용해 왔기 때문에 그 분변이나 도축물로부터 ESBL 생성균주가 분리될 개연성을 가지고 있으며, 내성 유전자를 획득한 균주는 여러 경로를 통하여 인체로 재유입 될 가능성이 크기 때문이었다(2, 8).

실험 재료 및 방법

균주의 분리

2002년 2월부터 2004년 8월까지 부산 북구 소재 동원산업 도축장을 연구지역으로 선정하여 균주 수집을 하였다. 균주 채취는 소와 돼지의 내장, 분변, 혈액, 도축장 주변의 바닥, 도축장 하수에서 멸균된 면봉으로 이루어졌다. BHI (brain heart infusion, Difco사, 미국)에 증균 과정을 거친 후, 증균액 0.1 ml를 제3세대 cephalosporin 계열 항균제인 ceftazidime (2 μ l/ml, 영진약품, 한국)을 첨가한 장내세균 선택배지인 MacConkey (Difco) 평판배지에 고르게 도말한 다음 37°C에서 17시간 배양하여 성장된 균 집락을 얻었다(8, 28). 이를 다시 BHI 평판배지 상에서 순수 분리 후 생화학 검사를 실시하여 균주를 동정하였다. 배지제조와 균주의 동정은 일반 장내세균 동정법을 따랐다(17).

β -lactamase 생성균주 분리방법과 이중디스크 확산 시험(double disk synergy test)은 전보(2, 8) 및 다른 보고(6, 7)를 따랐다.

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

접합(Conjugation)에 의한 내성전달

ESBL생성이 확인된 균주(일련번호 P, Table 1)를 전달균주(donor)로 하고 sodium azide에 내성을 가진 *Escherichia coli* J53 (Azide^R)를 피전달균주(recipient)로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 모균주들에 대한 교차 항균제의 내성을 확인하기 위하여 ceftazidime(영진약품)과 sodium azide (Shinyo Pure Chemicals, 일본)에 대한 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)시험을 실시하였다(4, 26). 내성전달 균주의 sodium azide에 대한 내성과 피전달균주인 *Escherichia coli* J53에 대한 ceftazidime 내성검사결과는 대조균주 *Escherichia coli* ATCC 25922을 사용하였다. 이때 배지는 Mueller-Hinton (Difco) 액체배지와 Mueller-Hinton (Difco) 평판배지를 사용하였고, ceftazidime 내성전달 확인용 선택배지는 sodium azide (100 µg/ml)와 ceftazidime (32 µg/ml)이 첨가된 MacConkey 평판배지를 이용하였다. 모 시험균주들을 BHI (Difco) 10ml에 접종하여 37°C에서 배양한 후, 그중 100 µl을 취하여 새로운 BHI에 접종하여, 4시간 동안 진탕 배양하였다. 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(2, 7, 8, 9). 이때 역접합이나 위접합체를 배제하기 위하여 생화학 검사를 실시한 다음 피전달 모균주인 *Escherichia coli*를 확인하였다. 접합자균주는 공여균주의 명명 앞에 접합자(conjugant)의 첫 자인 "C"를 해당 모균주의 번호 앞에 붙였다.

β-lactamase의 등전점 검사 (Isoelectric focusing, IEF)

등전점 검사는 전보(2, 8)를 따랐다. 중요한 방법만 요약하면 다음과 같다. BHI 배지에서 18시간 배양액을 원심분리하여 증류수로 철저히 세척 후 초음파와 파쇄기(ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument, 미국)를 이용하여 30초간 4회 분쇄하였다. 이를 12,000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후 시험 전까지 -20°C에 보관하였다. 등전점검사를 위하여 ampholine polyacrylamide gel (Bio-Rad사, 미국)을 사용하였고 gel제작과 전기영동방법 등은 전보와 같았다(2). 전기영동이 끝난 glass plate로부터 gel support film을 분리하여 nitrocefin용액(500 µg/µl in phosphate buffer pH 7.0, Glaxo, 미국)으로 적신 여과지(Whatman No. 2 paper)를 gel 위에 덮어서 band를 관찰하였다(2, 8). pI값 관독을 위한 ladder로는 IEF marker 3-10 (Serva liquid mix, 독일)을 사용하였다.

PCR (Polymer chain reaction)을 이용한 ESBL 유전자의 형별분류

Plasmid 분리는 alkaline방법(33)을 따랐다. ESBL 유전자의 형별분류를 위하여 사용된 특이 primer는 각각 TEM형(1080bp), SHV형(780 bp) 및 CMY-1형(1097bp)이었고 Bioneer사(한국)에서 제작하였다(8).

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 전보를 따랐다(2). PCR 생성물은 1% agarose gel을 이용하여 0.5X TBE Buffer에서 100 V로 30분간 전기영동 하였으며, ethidium bromide로 2분 염색과정과 증류수세척 후 UV transilluminator에서 확인하였다. 이후 UV 아래서 신속하게 해당 생성물을 잘라낸 다음 gel extraction kit (DyneBionic사, 한국)를 사용하여 제시된 kit protocol을 따라 plasmid를 정제하고 전기영동하여 해당 밴드의 생성물을 확인하였다. 염기서열분석은 (주)제노텍(한국)에 의뢰하여 결정되었다. 서열 결정은 Single-pass sequencing방법으로 ABI (Applied Biosystems) BigDye terminator Kit (Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit)를 이용하였다. Cycle sequencing방법으로 염기 서열을 해독한 다음 sequencing 반응에 참여하지 않은 형광물질로 labelling된 ddNTP를 EtOH down방법으로 제거하였다. 정제가 끝난 후 멸균 증류수나 HDF (Hi-Di Formamide)에 녹여 기기에 장착하여 전기 영동하였다. 사용한 기기의 기종은 ABI 3730xl DNA analyzer capillary였다.

서열 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 비교하여 ESBL형별을 분류하였다. 형별분류등정기준은 Bush와 Jacoby에 의해서 운영되고 있는 lahey clinical study (<http://www.lahey.org/temtable.asp>)를 따랐다. 이와병행하여 최종적인 형별결정은 아미노산 서열분석을 따랐다(10).

결 과

균주 분리와 등정

Ceftazidime 2 µl/ml이 첨가된 MacConkey 배지에서 성장한 52 균주 중 생화학 검사를 통한 일반 장내세균 동정법을 따라 동정한 결과 돼지 분변으로부터 *Escherichia coli* (10균주), *Klebsiella pneumoniae* (36균주) 소의 내장과 분변으로부터 *Enterobacter cloacae* (6균주) 등 모두 3종의 장내세균이 동정되었다. 이 중 소 내장과 분변에서 분리된 6균주의 *Enterobacter cloacae*는 이중디스크 확산현상이 디스크의 거리가 8mm이내에서 나타났기 때문에 본 연구에서 제외 시켰고 디스크 간격이 20 mm이상 떨어진 거리에서 효과가 강력하게 나타난 돼지에서 분리된 18 균주를 최종 시험균주로 선택하였다(Table 1, Fig 1).

항균제내성검사

내성전달 모균주는 모두 ceftazidime 30 µg disk에 NCCLS 기준 이하의 억제대를 형성하였고 64 µg/ml이 첨가된 Mueller-Hinton 평판배지에서도 성장하여 매우 높은 내성을 나타내었다. Sodium azide가 50 µg/ml 첨가된 Mueller-Hinton 배지에서 6균주(P5, P8, P9, P15, P16, P18)가 내성을 나타내었다. 그러나 sodium azide가 100 µg/ml 첨가된 Mueller-Hinton 배지에서는 시험균주 모두 성장이 일어나지 않았다. 피전달균주 *Escherichia*

Table 1. The Characterization of isolates in this study

Species	Strain no. ^a	Double synergy test	pI value	conjugant (pI value)	ESBL type ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	p1	+	5.4, 6.0	-	-
	p2	+	5.4, 6.0	-	-
	p3	+	5.4, 6.0, 6.9	C3(5.4, 6.0)	TEM-52
	p4	+	5.4, 6.0	C4(5.4, 6.0)	TEM-52
	p5	+	8.4, 6.9, 6.0, 5.4	-	-
	p6	+	8.4, 6.9, 6.0, 5.4	-	-
	p7	+	8.4, 6.9, 6.0, 5.4	-	-
	p8	+	5.4, 6.0	-	-
	p9	+	5.4, 6.0	C9(5.4, 6.0)	TEM-52
	p10	+	5.4, 6.0	-	-
	p11	+	5.4, 6.0	C11(5.4, 6.0)	TEM-52
	p12	+	8.4, 6.9, 6.0, 5.4	C12(5.4, 6.0)	TEM-52
	p13	+	8.4, 6.9, 6.0, 5.4	C13(5.4, 6.0)	TEM-52
	p14	+	5.4, 6.0	C14(5.4, 6.0)	TEM-52
	p15	+	6.9, 6.0, 5.4	C15(5.4, 6.0)	TEM-52
	p16	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	p17	+	5.4	C16(5.4)	SHV-12
	p18	+	5.4	C17(5.4)	SHV-12

a; All strains isolated from a slaughterhouse in Pusan, Korea during 2002-2004.

b; conugant ESBL type

coli J53은 ceftazidime 4 µg/ml이 첨가된 Mueller-Hinton 평판배지에서 자라지 못하였고 sodium azide가 100 µg/ml이 첨가된 배지에서는 성장이 잘 이루어졌다.

등전점

전달 모균주의 등전점은 표 1과 같았다. *Escherichia coli* 2균주는 1개의 등전점(pI 5.4)을 형성하였고 *Klebsiella pneumoniae*는 비교적 다양하여 1균주는 이중 디스크 확산 효과는 선명하게 나타났지만 등전점 값을 형성하지 못하였고(p16) 2개의 등전점(pI 5.4, 6.0)을 형성한 것이 8균주(p1, p2, p4, p8, p9, p10, p11, p14), 3개의 등전점(pI 5.4, 6.0, 6.9)을 형성한 것은 2균주(p3, p15), 4개의 등전점(pI 5.4, 6.4, 6.9, 8.4)을 형성한 균주는 5균주(p5, p6, p7, p12, p13)였다. 이중 접합자를 형성한 균주는 모두 10균주로 *Klebsiella pneumoniae*는 2개의 등전점(pI 5.4와 6.0)이 전달되었다. 그리고 *Escherichia coli* 2균주는 모균주에서와 같이 1개의 등전점(pI 5.4)이 전달되었다.

ESBL 생성균주의 확인

중양에 있는 ticarcillin/clavulanate (TIM)에 대하여 ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO) 및 cefotaxime (CTX)에 대한 이중 디스크 확산법(double-disk synergy test)에 의한 상승(synergy)현상은 선정된 전체 모균주인 18균주 및 10균주의 접합자에서 확인되었다(Fig. 1).

접합 (Conjugation) 에 의한 접합자 형성 시험

ESBL 생성 내성 획득 원인이 plasmid 매개에 의한 것임을 확인하기 위하여 이중 디스크 확산법으로 얻어진 18 균주를 공여

균주로 하여 *Escherichia coli* J53에 접합시험을 실시한 결과 10 균주(c3, c4, c9, c11, c12, c13, c14, c15, c17, c18)가 접합자를 형성하였다(Table 1).

PCR을 통한 접합균주(conjugant)의 TEM형과 SHV형 β-lactamase 특이 유전자 확인 및 아미노산 서열 분석에 의한 광범위 베타락탐아제의 유형 결정

접합이 형성된 10 균주에 대한 생화학 검사를 실시하여 이들

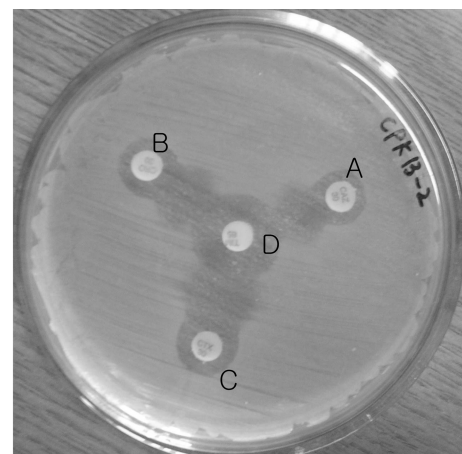


Fig. 1. Detection of the ESBL producing bacterium by double disk synergy test. The bacterium was *Klebsiella pneumoniae* wild strain P13 conjugant C13. bla_{TEM52}. A: ceftazidime (30 µg), B: ceftriaxone (30 µg), C: cefotaxime (30 µg), D: ticarcillin (75 µg)/clavulanate (10 µg). The distance between clavulanate and 3rd generation cephalosporin is 20 mm.

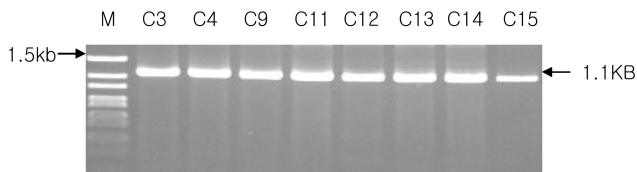


Fig. 2. Agarose gel showing products of blaTEM type from the eight *Klebsiella pneumoniae* conjugant strains. M; Standard ladder.



Fig. 3. Agarose gel showing products of blaSHV type from the two *Escherichia coli* strains. M; Standard ladder.

이 모두 모 피전달 균주인 *Escherichia coli* 임을 확인였다. 이들에 대한 TEM형과 SHV형의 특이 primer를 사용하여 agarose gel상에서 얻은 결과 공여 모균주가 *Klebsiella pneumoniae*인 8균주는 모두 TEM형(1080bp)이었고(Fig. 2), 모균주가 *Escherichia coli*인 2균주는 SHV형(780bp)이었다(Fig. 3). 이들을 elution kit를 이용하여 DNA 추출 후 서열 분석결과 *Klebsiella pneumoniae*로부터 생성된 접합균주 8균주는 모두 개시코돈(AM, 메티오닌)부터 마지막 아미노산(W, 트립토판)까지 TEM-52형과 완전히 일치되었다. 모균주가 *Escherichia coli*인 2균주는 개시코돈부터 유전자 서열이 모두 동일하였고 아미노산 서열이 인증번호 gi56181498 extended-spectrum beta-lactamase SHV-12의 286개의 전체 아미노산과 완전히 일치되었다.

모균주 18균주에 대한 CMY-1의 PCR 결과, 증폭산물을 형성하지 않았다.

고 찰

1983년 plasmid 매개에 의해서 ESBL 생성균주가 처음 독일에서 분리된 이후(23), *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*는 대표적인 ESBL 생성균주로 세계 도처에서 분리 보고되고 있으며, 중환자실과 장기입원환자의 치료에 많은 어려움을 주고 있다(19, 24, 25, 29, 32). 국내에서도 이미 1990년대 이후 여러 지역의 대학병원과 종합병원의 장기 입원환자들에서도 ESBL 생성 *E. coli*가 많이 보고된 바가 있으며, 이들의 유형도 TEM, SHV형 등 매우 다양하다(6, 7, 9). 이처럼 ESBL 생성균주에 대한 연구는 주로 임상에서 환자를 통하여 균이 분리되고 있지만 도축물이거나 음식 혹은 자연계에서 분리된 예는 상대적으로 극히 드물다(8, 13, 34, 35).

β -lactamase는 종류가 매우 다양하지만 기본적으로는 TEM-1과 TEM-2 또는 SHV-1에서 유전자가 1개 또는 여러 개의 돌연변이가 만들어짐으로서 활성부위의 구조가 바뀌어져 항균제가 세균에게 작용할 수 없게 되는 현상으로 넓게 보면 생존에 대한 진

화 형태로 이해 될 수 있다(20, 29, 30).

초기 ESBL항균제 분류체계와 명명에서는 혼란이 있었지만 현재는 정리가 되어 일정한 분류체계를 가지고 있다(16, 18). Bush 분류의 TEM의 어원은 이 효소를 생성하는 균주를 처음 분리한 환자 이름에서 유래하게 되었고 SHV는 SulfHydrylVariable에서 유래되었는데 그 뜻은 p-chloromercuribenzen에 의해 효소가 억제됨을 나타내기 위해서였다. 하지만 후에 연구 결과 serine hydroxyl에 억제되는 것으로 밝혀졌지만 초기 명칭이 그대로 굳어져 오늘에 이른 것이다(30). SHV-1은 1979년 Matthew 등에 의해서 처음 분리되었다(22). 본 연구에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae* 8균주로부터 분리된 TEM-52형은 Poyart 등에 의해서 1998년 *Klebsiella pneumoniae*로부터 처음 분리되어 명명되었고(31), NCBI 등록번호 J3162로 861 bp, 단백질 등록번호 CAA73933으로 모두 286개의 아미노산으로 구성되어있다. TEM 52형은 *Klebsiella*에서 주로 생성되지만 일부 *Salmonella*속 세균에서도 분리되어 NCBI에 등록되어 있다. 생물학적 주요 특징은 등전점(pI) 6.0이고, TEM-1형과 비교하였을 때 Ambler 등(10)의 아미노산 분류법에 따라 3곳의 아미노산(104Glu→Lys, 182Met→Thr, 238Gly→Ser)이 치환된 것으로, 이미 국내 환자에서 우점종으로 보고되었다(28). 본 연구에서 얻어진 결과는 염기서열뿐 아니라 단백질 순서 및 개수에서도 완전히 일치되었다.

본 연구에 분리된 SHV-12는 주로 *Escherichia coli*에서 분리되어 NCBI에 염기서열과 아미노산 서열 인증번호가 여러 개 등록된 상태이나 처음 보고된 것은 1997년 *Klebsiella*에서 분리되었고 Ambler(10) 분류법에 따라 기준이 되는 SHV-1 35Leu→Gln, 238Gly→Ser, 240Glu→Lys로 치환된 것이다(27). 본 연구와 대조하여 서열 및 아미노산 서열 분석은 GenBank nucleotide database에 등록된 gi56181498 이었다(11). 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 *Klebsiella pneumoniae*에서 분리되어 명명되었고, SHV-1과는 35번에서 동일하고 238과 240번에서 SHV-12와 같이 치환됨으로서 결국 SHV-5와 SHV-12는 35번 1개의 아미노산만 다른 것이다(12). 본 연구에서 분리된 SHV-12는 286개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산 서열은 Ambler 서열 7번 Tyr을 시작으로 8번 Ile, 35번 Leu 등 SHV-12와 완전하게 일치되었다(11). 대부분의 ESBL 생성균주들은 지역이나 국가에 따라 나타나는 양상이 다소 정형화 되어 있는 경향이 많이 있지만(11, 12) 특히 SHV-5는 신생아실의 집단 감염을 일으키는 임상적으로 매우 중요한 균이다(11).

본 연구를 통하여 육류 공급원의 원천이 되는 도축장에서 광범위 다약제 내성 균주(extended-spectrum β -lactamase)의 존재가 확인되었다.

본 연구 결과는 2002년부터 2004년까지 3년에 걸쳐 도축장의 환경과 폐기물 분변 등을 시료로 하여 최종 얻어진 결과이며 전체 동정된 균주 수에 비하여 최종 선택된 균주 수는 적었다. 같은 도축물임에도 불구하고 소보다 돼지에게서 ESBL 생성균주가 많이 분리된 점이 특이하였다. 본 실험 결과에서 특이한 점은 접

합자에 전달된 등전점(pI) 수치가 *Klebsiella pneumoniae*의 경우 모두 pI 5.4와 6.0 2개가 발현되었지만 실제 유전자 분석결과는 pI 6.0 (TEM-52형) 하나만 일치되고 pI 5.4(TEM-1형)의 결과는 모두 나타나지 않았다. *Escherichia coli*의 경우는 모균주와 접합자에서 모두 pI 5.4 값을 나타냈지만 유전자 서열 분석결과는 전혀 다른 pI 8.2에 해당하는 SHV-12와 일치되었고 아미노산 서열 역시 이와 일치되었기 때문에 SHV-12로 형별을 결정하였다.

본 연구 결과, 도축장과 도축물에서 2종의 ESBL 생성균주가 실제로 확인된 사실은 기존에 알려진 임상계통 뿐만 아니라 자연환경, 특히 육류공급원과 관련된 도축장에서 분리되었다는 사실이 중요한 의미를 가진다. 이는 한국의 경우, 적어도 ESBL 생성균주가 병원이나 임상 가검물에서만 국한되어 있지 않고 이미 주변의 자연 환경에까지 확산되어 존재하고 있음을 증명하는 것이다.

감사의 말

본 논문은 2003년도 부경대 기성회계 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. 김병렬, 정석훈, 구자영, 이경원, 정운섭, 정태진, 황현웅, 김미향. 1999. Extended-spectrum β -lactamase 생성 장내세균의 분리율 및 선별검사. 대한임상미생물학회지 2, 28-39.
2. 김운태, 이훈구. 2000. 부산시내 종합병원의 임상검체에서 분리된 extended spectrum β -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae*의 형별분류. 한국미생물학회지 36, 221-227.
3. 배현주, 김정인, 권영미, 이경원, 정운섭, 김의중, 조동택. 1997. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징. 감염 29, 93-103.
4. 설성용, 장희경, 신형섭, 이유철, 조동택, 김경숙. 1998. 전달성 항균제 내성유전자의 분석에 의한 *Serratia*의 역학조사. 대한 미생물학회지 33, 485-497.
5. 이경원, 조성란, 이창숙, 정운섭, 권오현. 1994. Extended broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 26, 341-348.
6. 이선화, 정재심, 이수연, 배현주, 나준, 박성중, 피수영, 배직현. 1997. Extended-spectrum β -lactamase를 생성하는 *Klebsiella pneumoniae* 패혈증 집단 발생의 분자역학조사. 병원감염관리. 2, 13-28.
7. 이선화, 김미나, 최수진, 정화순. 2000. 임상 검체에서 분리된 *Escherichia coli*의 extended-spectrum β -lactamase 생성. 대한임상병리학회지 20, 400-409.
8. 이훈구. 2001. 광안리 오수처리장에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) *Klebsiella*와 *Enterobacter*의 유형. 한국미생물학회지 37, 277-283.
9. 정운섭, 이경원, 오까모도료이찌, 이노우에 마쓰히사. 1997. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 생성. 감염 29, 477-485.
10. Ambler, R.P., A.F.W. Coulson, N.M. Frere, J.M. Ghuyssen, B. Joris, M. Forsman, R.C. Lebersque, G. Tiraby, and S.G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for class A β -lactamases. *Biochem. J.* 276, 269-272.
11. 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.
12. Billot-Klein, D., L. Gutmann, and E. Collatz. 1990. Nucleotide sequence of the SHV-5 β -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2439-2441.
13. 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.
14. Bush, K., 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 259-263.
15. 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.
16. Bush, K. and G. Jacoby. 1997. Nomenclature of TEM β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 1-3.
17. Ewing, W.H. 1986. Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, N. Y.
18. Goussard, S. and P. Courvalin. 1999. Update sequence information for TEM β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 367-370.
19. Jacoby, G.A. and P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 908-911.
20. 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, 858-862.
21. Karen, B. and J. George. 1997. Nomenclature of TEM β lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 39, 1-3.
22. Matthew, M., R.W. Hedges, and J.T. Smith. 1979. Types of β -lactamase determined by plasmid in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 138, 657-662.
23. Medeiros, A.A. 1993. Nosocomial outbreaks of multi resistant bacteria extended spectrum β -lactamases have arrived in north America. *Ann. Inter. Med.* 119, 428-430.
24. Meideiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generation of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 245, 19-45.
25. Miranda, G., N. Castro, and B. Leanos. 2004. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 30-35.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS: M7-A4.
27. Nuesch-Inderbinen, M.T., Kayser, F.H., and Haechler, H. 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.
28. 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 β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.

29. Philippon, A., R. Labia, and G. Jacobi. 1989. Extended-spectrum β -lactamases (minireview) *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131-1136.
30. 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 β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 573-581.
31. Poyart, C., P. Mugnier, G. Quesum, P. Berche, and P. Trieu-Cout. 1998. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 108-113.
32. 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 β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 647-653.
33. Sambrook, J., F.E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. I. 1.25-1.28.
34. Teshager, T., L. Dominguez, and M.A. Moreno. 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.
35. Winokur, P.L., A. Brueggemann, D.L. Desalvo, L. Hoffmann, M.D. Apley, 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 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2777-2783.

(Received June 7, 2006/Accepted June 27, 2006)

ABSTRACT : Typing of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Slaughterhouse in Pusan, Korea

Hun-Ku Lee (Department of Microbiology, Pukyong National Univ., Pusan 608-737, Korea)

The emergence of extended spectrum β -lactamase 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 extended spectrum β -lactamase producing organisms isolated from natural environment in Korea. This study was conducted to investigate the biological characteristics and extended spectrum β -lactamase types of eighteen strains of extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated from a slaughterhouse in Pusan in Korea during 2002 to 2004. Extended spectrum β -lactamases were identified by double-disk synergy test, conjugation, isoelectric focusing values and gene sequencing. Eight strains of *Klebsiella pneumoniae* and two strains of *Escherichia coli* were isolated from pigs and transferred extended spectrum β -lactamase genes to recipient *Escherichia coli* J53 (sodium azide resistant and ceftazidime sensitive) strain by conjugation. The conjugants of extended spectrum β -lactamase genes were alignments and translated to amino acids by BCM and NCBI blast. Eight conjugants of *Klebsiella pneumoniae* were typed TEM-52, and two strains of *Escherichia coli*, SHV-12, but CMY-1 type were not detected in this study.