

부산시내 종합병원의 임상 검체에서 분리된 Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae*의 형별 분류

김윤태 · 이훈구*

부경대학교 자연과학대학 미생물학과

본 연구는 등전점과 PCR 생성물을 통하여 광범위 β -lactamase (ESBL)를 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*의 ESBL 유형을 결정하였다. 부산시내 소재 3개 종합병원의 임상검체로부터 20균주의 ESBL을 생성하는 *Klebsiella pneumoniae*를 분리하였다. 제 3 세대 cephalosporin인 cefotaxime, cef-tazidime, ceftriaxone으로 double disk synergy test를 시행하여 ESBL 생성균주를 확인하였다. 등전점 및 PCR 결과 TEM형 (pI 5.2~6.0, 1080 bp), TEM+SHV혼합형 (pI 5.2~6.0 및 pI 7.0~7.4로 1080 bp, 599 bp), SHV형 (pI 7.0~7.4, 599 bp), 그리고 PCR 결과는 SHV형으로 나타났으나 등전점을 나타내지 않는 것과, 등전점 및 PCR 결과 어느 쪽에도 속하지 않은 non TEM non SHV 형 등 5개 군으로 나뉘어졌다.

Key words □ Extended-Spectrum β -Lactamase, TEM, SHV

β -lactamase는 penicilloyl serine transferase로서 penicillin, cephalosporin 및 이와 관련되는 복합물질로 세균을 저해시키는 물질인 β -lactam ring을 가수분해시키는 효소들을 말한다(21). 이 효소들은 penicillin과, 제1세대와 불리우는 cephalosporin은 가수 분해시키지만 cefotaxime, ceftazidime, monobactam, aztreonam과 같은 소위 제2, 제3세대 광범위 새로운 항균제들에 대해서는 작용하지 못하였다(16).

병원에서 치료제로서 이 새로운 항균제들을 집중적으로 사용하게 되자 곧이어 이에 대한 내성균주들이 출현하게 되었다(16). 이와 같이 제3세대의 새로운 cephalosporin 계열의 항균제에 내성을 가지는 효소를 광범위 β -lactamase (Extend-spectrum β -lactamase, ESBL)라고 부르며 plasmid 매개성 기전에 의해 기존의 1세대 항균제뿐 아니라 제 3세대 항균제까지도 폭넓게 가수 분해시킨다(20). 이들은 크게 Bush의 DNA의 분자구조 차이에 의한 분류와 Ambler의 β -lactamase 구조에서 아미노산 서열을 기준으로 분류하는 두 가지의 분류 체계를 가지고 있다(12). 일반적으로 Bush 분류가 널리 사용되어지고 있는데 크게 TEM형과 SHV형의 두 계열로 나뉘어지며 이들은 대부분 TEM이나 SHV β -lactamase 구조에서 1~4개의 아미노산 치환이 일어난 변이형으로서 구조 gene의 point mutation이 일어남으로써 현재 약 180여 가지가 보고되고 있다(12).

임상에서는 1980년대 이후 장내세균 중 *Klebsiella*와 *Escherichia coli*에서 plasmid 매개성 ESBL생성 균주가 출현된 이후 임상적으로 중요한 문제로 대두되고 있다(6,18). *Klebsiella pneumoniae*는 면역력이 약해진 어린이나 노약자 또는 수술환자

들에게 폐렴, 창상감염, 중이염, 균혈증 등 중증 감염을 일으키는 기회감염균이다(11). 최근 우리 나라에서도 제 3세대 cephalosporin 계열의 항균제에 내성인 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae*의 분리가 자주 보고 되고 있어(1-8), 임상적으로 그 중요성이 증대되고 있다. 이와 같은 중요성을 감안하여 본 연구자들은 부산시내 3개 종합병원 입원 환자의 임상 가검물로부터 ESBL 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주를 분리하여 디스크 확산법과 접합시험 등을 통하여 이들이 plasmid에 기인된 것인가 또는 염색체성에 의해서 획득된 것인지를 확인하고, β -lactamase의 등전점 유형을 분류함으로써 ESBL생성 균주의 생물학적 성상을 조사하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

균주분리

1998년 9월부터 1999년 3월까지 부산 소재 종합병원인 메리놀 병원, 동아대 병원, 고신 의료원 3개 종합병원 임상병리과 미생물 검사실에 의뢰된 77명 환자의 가검물로부터 모두 77균주의 *Klebsiella pneumoniae*가 분리되었다. *K. pneumoniae* 동정방법은 동아대의 경우 VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO)의 GNI card에 접종하여 균의 생화학적 동정을 실시하였고, 고신의료원의 경우는 MicroScan 등 자동분석기를 사용하였고 메리놀병원은 API Kit를 사용하였다.

최소억제농도(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)의 측정

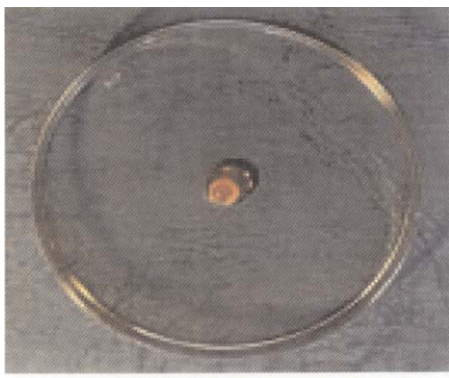
Disk 시험결과 얻어진 ESBL균주로 추정되는 20 균주의 *K. pneumoniae*를 MacConkey agar에서 18시간 배양하여 멸균된 증류수에 부유시켜 5,000 rpm에서 3회 원심 분리하여 세척시킨 다

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

Table 1. The antibiotics used in this study

Antibiotics	MIC* ($\mu\text{g/ml}$)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	≤ 8	Cefotaxime	≤ 8
Cefazolin	≤ 8	Ceftazidime	≤ 8
Cefoperazone	≤ 16	Gentamicin	≤ 4
Cefuroxime	≤ 8	Tobramycin	4
Cephalothin	≤ 8	Trimeth/Sulfa	$\leq 2/38$
Piperacillin	≤ 16	Cefoxitin	≤ 8
Ticarcillin/Clavulanate	$\leq 16/2$	Amikacin	≤ 16
Ampicillin/Sulbactam	$\leq 8/4$	Ciprofloxacin	≤ 1
Ceftriaxone	≤ 8	Imipenem	≤ 4
Aztreonam	≤ 8		

*MIC: Minimal Inhibitory Concentration.

**Fig. 1.** β -Lactamase positive reaction on cefinase disk.

음, 멸균된 0.45% 식염수 1.8 ml에 현탁하여 McFarland No. 0.5로 조정하였다. 이 균액 200 μl 를 다시 멸균된 0.45% 식염수 1.8 ml에 가하여 항균제 최소억제농도 자동측정기인 Vitek의 GNS card에 접종하여 MIC를 측정하였다. 측정된 항균제는 19종이었고(Table 1), 각 약제 최소억제농도는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다(17).

β -lactamase 생성 판정

Nitrocefin이 함유된 Cefinase disk (Becton Dickinson Co.)상에 증류수 한 방울을 떨어뜨리고 대수기 증기의 신선한 배양액을 한 방울 떨어뜨려 5분 이내에 붉은색으로 발색되면 β -lactamase 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

이중disk 확산법 (Double disk synergy test)

McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 미리 만든 3 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA) 평판배지에 고르게 도말 하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 μg , Becton Dickinson, USA) disk를 놓고 그 주변에 cefotaxime (30 μg), ceftazidime (30 μg), ceftriaxone (30

μg) disk를 올려놓아 37°C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과(synergism)를 판정하였다. 이 때 시험군(試驗群)을 각각 1 cm, 1.8 cm, 2.5 cm 간격으로 떨어진 3개 군으로 하여 최적의 synergy 효과를 나타내는 거리를 선택하여 최종시험을 실시하였다.

교차접합시험 (Transconjugation)에 의한 내성 전달

분리된 20개의 ESBL생성 *K. pneumoniae*를 전달균주로 하고 *Escherichia coli* RG176 Na'를 피전달균주로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 시험균주들은 모두 TSB에서 배양된 대수 증식기 중반의 신선한 균주를 선정하였다. 전달균주와 피전달균주의 균체수 비율을 1:4가 되게 하여 새로운 TSB에 혼합한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 이 배양액을 멸균된 면봉에 적서 ceftazidime (30 $\mu\text{g/ml}$)+nalidixic acid (16 $\mu\text{g/ml}$)가 첨가된 MacConkey agar에 고르게 도말하고 37°C에서 18시간 배양하여 균집락 생성 유무를 조사하였다. MacConkey agar에 자란 균집락을 재동정하여 생화학검사와 항균제 감수성검사를 실시하여 피전달 균주인 *E. coli*로 내성이 전달되었는지를 확인하였다.

PCR을 이용한 ESBL 유전자의 형별 분류

ESBL의 내성전달은 대부분이 plasmid에 의하여 일어나기 때문에 균주로부터 plasmid를 분리하여 그 유형을 조사하였고 분리방법은 다음과 같았다.

균주를 TSB에 접종하여 18시간 37°C에서 진탕 배양한 후 배양액 2 ml을 3,000 \times g로 원심하여 같은 양의 생리식염수에 재부유시켜 3회 세척하였다. 이를 plasmid 분리 kit인 Plasmid Minipreps DNA Purification Kit (Injae Science Co.)를 사용하여 분리하였다. ESBL균주의 형별 확인을 위하여 사용된 TEM과 SHV primer와 PCR조건은 다음과 같았다.

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

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

SHV Primer F: 5'-TCT CCC TGT AAG CCA CCC TG-3'

R: 5'-CCA CTG CAG CTG C(A/C) GTT-3'

PCR 조성성분은 DNA 추출액 5 μl , primer 각 1 μl , 2.5mM dNTP 8 μl , 2.5 U Taq DNA polymerase 0.5 μl , 10 \times Buffer 10 μl 로 이들을 증류수 75.5 μl 에 잘 섞어 주었다. TEM형 확인을 위한 PCR 조건은 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 45°C에서 90초, extension은 72°C에서 60초로 하여 25 cycle을 반복하였고, SHV형 확인을 위해서는 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 58°C에서 60초, extension 72°C에서 60초로 하여 25 cycle을 반복하였다. 이와 같이 하여 얻어진 PCR 생성물은 0.8% agarose gel을 사용하여 TBE buffer 속에서 100V로 25분간 전기영동하여 해당 위치에 band가 생성되는지를 UV 형광등 아래에서 확인하였다.

등전점(Isoelectric focusing, IEF) 측정

β -Lactamase의 추출

혈액한천 배지에서 자란 균을 BHI broth 5 ml에 접종하여

37°C에서 밤새 진탕 배양한 후 1,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전된 세균을 모아 3차 증류수 750 μ l에 재부유 하였다. 이를 초음파 파쇄기 (Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument Co., Chicago IL, USA)를 이용하여 균체를 30초간 4회 초음파 파쇄를 시행하였다. 이 용액을 5,000 rpm에 5분간 원심분리하여 상층액 1 방울을 취한 후 nitrocefin 용액 1 방울과 잘 혼합시켜 30분 안에 적색으로 발색된 것을 β -Lactamase가 존재하는 것으로 판정하였다. 채취된 상층액은 사용 할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

Polyacrylamide Gel의 제조

Monomer ampholyte solution (H_2O 5.5 ml+monomer concentrate 2.0 ml+ 25% glycerol 2.0 ml+ ampholyte 0.5 ml)에 catalyst solution (10% ammonium persulfate 15 μ l+0.1% riboflavin-5'-phosphate 50 μ l+N, N'-tetramethylene-ethylenediamine 3 μ l)을 혼합하여 즉시 사용하였다(IEF product, Serva Co., Heidelberg, German).

Gel support film에 polyacrylamide Gel 부착

Film package로부터 gel support film의 sheet를 제거하였다. 제조된 gel을 mini casting tray에 적당량(약 3 ml)을 분주하고, 분주된 gel 위에 gel support film의 친수성 부분을 기포가 생기지 않도록 주의하면서 부착시켰다. 이상과 같이 준비한 유리 gel 판을 45분 동안 형광등 불빛 6 cm 아래에서 중합시키고, 다시 뒤집어서 15분 동안 빛을 쏘여서 중합이 되지 않은 부분들을 제거시켰다.

Sample loading과 Isoelectrofocusing

유리 gel판 위에 sample template를 놓고 sample 2 μ l를 loading 한 후 5분 정도 상온에서 방치한 다음 조심스럽게 sample template를 제거하였다. Isoelectrofocusing Chamber (Mini IEF Cell 111., Bio-Rad Co., California, USA)의 흑연 전극에 물속으로 적당히 습윤한 상태를 유지시키고 유리 gel판 gel 부분이 흑연전극에 닿도록 하여 100V 30분, 200V 30분, 450V 60분간 전기영동 시켰다.

Band의 확인과 pI 판독

전기영동이 끝난 유리 gel판으로부터 gel support film을 분리하여 nitrocefin (0.5 mg/l, phosphate buffer pH 7.0)을 1~2 ml/정도를 gel 표면 위에 뿌려 준 후 적색 band가 나타나면 Wattman No. 2 여과지를 gel위에 덮어 착색시킨 후 즉시 사진 촬영을 하였다. 사진 촬영 후 고정액 (4% sulfosalicylic acid, 12.5% trichloroacetic acid, 30% methanol)에 30분 동안 고정 후, 1시간 동안 염색시켰다. 염색액의 조성 성분은 27% isopropanol 또는 ethanol, 10% acetic acid, 0.04% Coomassie brilliant blue R-250, 0.5% $CuSO_4$ 였다. 염색된 gel plate는 다시 증류수에 담귀 탈색시켜, 단백질 표준 marker를 확인하고 Wattman No. 2 여과지에 착색된 ESBL sample을 표준 marker와 비교하면서 pI를 판독하였다.

결 과

Klebsiella pneumoniae의 분리동정

1998년 9월부터 1999년 3월까지 부산 소재 종합병원인 메리놀 병원, 동아대 병원, 고신 의료원 등 3개 종합병원 임상병리과 미

생물 검사실에 의뢰된 77명 환자의 가검물로부터 1인당 1균주씩 모두 77균주의 *Klebsiella pneumoniae*를 미생물 자동동정분석기인 Vitek과 상품화된 API Kit 20E를 이용하여 동정하였다.

분리된 전 77 균주의 검체별 분석은 객담에서 32균주로 가장 많이 분리되었고, 그 다음으로 뇨 16균주, 농 10균주, 창상감염 5균주, 혈액 5균주, 기타 9 균주였다. 병동별 분리율은 내과가 23균주로 가장 많았으며, 그 다음으로 중환자실 13균주, 외과 11균주, 비뇨기과 8균주, 신생아실 8균주, 소아과 5균주, 기타 9균주였다(Table 2). 질환별 분리는 창상감염 21균주였으며, 폐렴 12균주, 요로감염 10균주, 감기 5균주, 간염 4균주, 만성신부전증 4균주, 복막염 3균주, 암 3균주, 중이염 2균주, 패혈증 2균주, 기타 11균주 순이었다.

광범위 β -lactamase (ESBL)생성 균주는 20균주(26%)가 분리되었다. ESBL생성 균주를 검체별 분석은 객담에서 12균주가 분리되어 가장 높았고, 혈액 4균주, 뇨 2균주, 창상감염과 농에서는 각각 1균주씩 나왔다. 병동별로는 중환자실이 10균주로 가장 많았고, 그 다음으로 신생아실 5균주, 내과 4균주, 외과 1균주 순이었다(Table 2). 질환별 분리는 폐렴 4균주였으며, 창상감염 3균주, 요로감염 2균주, 만성신부전증 2균주, 패혈증 2균주, 간염 1균, 복막염 1균주, 암 1균주, 중이염 1균주, 기타 3균주 순이었다.

항균제 감수성 검사

19가지의 항균제를 77균주에 대하여 감수성 시험을 실시한 결과는 다음과 같았다. ESBL을 생성하는 20균주를 제외한 57균주가 ampicillin 이외의 전 약제에 감수성을 나타내었다. 그러나 ESBL을 생성하는 20균주 중 ampicillin, cefazolin, cefoperazone, ceftriaxone, cefuroxime, cephalothin, piperacillin, ticarcillin/clavulanic acid 등 8종류의 항균제에 대하여 모두 내성을 나타내었지만, amikacin, ciprofloxacin, imipenem 등 3종류의 약제에 대해서는 감수성을 나타내었다. 이들 20균주에 대한 항균제별 내성율은 ampicillin/sulbactam 97.5%, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime에 각각 95%, gentamicin 85%, tobramycin 80%, trimeth/Sulfa 65%, cefoxitin 35%이었다.

ESBL 생성균주의 약제 내성범위는 최소 11종에서 최대 17종

Table 2. The origin of isolates

Specimen	Ward							
	Med	I.C.U	GS	NR	UR	PD	Other	Total
Sputum	17(2)	6(6)	2(-)	5(4)	-(-)	2(-)	-(-)	32(12)
Urine	3(1)	2(-)	-(-)	1(1)	8(-)	2(-)	-(-)	16(2)
Pus	2(-)	1(-)	5(1)	1(-)	-(-)	1(-)	-(-)	10(1)
Wound	-(-)	1(1)	3(-)	1(-)	-(-)	-(-)	-(-)	5(1)
Blood	1(1)	3(3)	1(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	5(4)
Others	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	9(-)	9(-)
Total	23(4)	13(10)	11(1)	8(5)	8(-)	5(-)	9(-)	77(20)

*() : ESBL *K. pneumoniae*, **Med: Medicine, I.C.U: Intensive Care Unit, GS: General Surgery, NR: New Born Room, UR: Urology department, PD : pediatrics

Table 3. Resistance pattern of ESBL *K. pneumoniae*

Drugs	Resistance pattern	No. of strains
17	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztGmTbT/sCfxCip	1
16	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztGmTbT/sCfx	1
15	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztTbT/sAn	1
15	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztGmTbT/s	8
14	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztTbCfx	2
14	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztGmCfx	3
14	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazAztGmTbT/s	1
14	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztTbCfx	1
14	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCazCtxAztGmTb	1
11	A/sAmCfzCfpCroCfuCfPipT/cCfxT/s	1
Total		20

*Abbr.: Ampicillin/Sulbactam (A/S), Ampicillin (Am), Cefazolin (Cfz), Cefoperazone (CFP), Ceftriaxone (CRO), Cefuroxime (CFU), Cephaloth (CF), Piperacillin (PIP), Ticarcillin/Clavulanate (T/C), Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX), Aztreonam (AZT), Gentamicin (GM), Tobramycin (TB), Trimeth/Sulfa (T/S), Cefoxitin (CFX), Amikacin (AN), Ciprofloxacin (CIP), Imipenem (IPM)

까지였고 대부분의 균주(13균주)는 14~15종의 약제에 중복내성을 나타내었다. 그리고 분리된 20개의 ESBL 균주 중 2균주를 제외한 18균주가 cephalosporin 계열을 포함한 β -lactam 계열의 항균제에 대하여 중복내성을 나타내었다(Table 3).

ESBL 생성 균주의 확인

분리된 77균주를 TSB 배지에서 37°C, 18시간 배양시켰다. 이 배양액을 한방울 취하여 nitrocefin이 포함된 cefinase 디스크(BBL)에 떨어뜨려 30분 안에 붉은색으로 변화된 20개의 β -lactamase 생성균주를 선별하였다. ESBL 생성균주의 확인을 위하여 이중disk 확산법(Double-disk synergy test)을 시행하였다. Ticarcillin/clavulanate (75/10/ μ g, Becton Dickinson, USA)와 3세대 cephalosporin의 간격을 1.0 cm와 1.8 cm 및 2.5 cm 등의 세 가지 경우로 나누어 실험한 결과, 1.8 cm 범위 내에서 synergy 현상이 가장 뚜렷하게 나타났지만, 2.5 cm 간격에서는 synergy 효과가 불확실하였고, 1.0 cm의 간격은 너무 가까워 억제대가 심하게 중복되었다(Fig. 2).

β -lactamase 시험결과 얻어진 20균주는 모두 제3세대 cephalosporin (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) 가운데 적어도 한가지 이상의 약제에 대하여 내성을 나타내었다. 즉, 16균주는 실험된 제3세대 cephalosporin에 synergy 효과를 모두 나타내었지만, 나머지 4균주는 ceftazidime에서 synergy 현상이 선명하였으나 cefotaxime과 ceftriaxone에서는 synergy 현상이 불확실하였다.

교차접합시험(Transconjugation)에 의한 내성 전달검사

ESBL 생성 *K. pneumoniae* 20균주 중 내성 획득의 원인이 염색

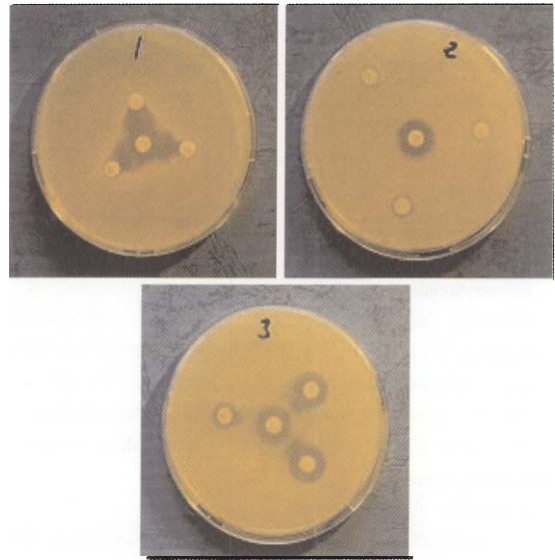


Fig. 2. Double disk synergy test. 1. Clavulanic Acid/ 3rd Generation Cephalosporin : distance 1.0 cm, 2. Clavulanic Acid/ 3rd Generation Cephalosporin : distance 2.5 cm, 3. Clavulanic Acid/ 3rd Generation Cephalosporin : distance 1.8 cm.

체성인가 혹은 plasmid 매개에 의한 것인가를 확인하기 위하여 교차접합시험을 실시하였다. 공시 균주인 *K. pneumoniae*에서 피 전달균주인 *Escherichia coli* RG176 N_4^+ 로 내성이 전달된 것을 확인하기 위하여 ceftazidime (30 μ g/ml)과 nalidixic acid (16 μ g/ml)가 첨가된 MacConkey agar 배지에 균을 접종하여 배양한 결과 11균주가 내성이 전달되었고 나머지 9균주는 내성전달이 일어나지 않았다. 내성전달이 일어난 11균주를 다시 위의 교차약제가 첨가된 배지에 접종하여 균의 성장을 재확인 한 결과 이들은 모두 성장되었다.

PCR을 이용한 ESBL의 형별 분류

ESBL을 생성하는 *Klebsiella pneumoniae* 20균주에 대한 형별 분류를 위하여 공시된 TEM primer와 SHV primer를 이용하여 PCR을 시행한 결과는 다음과 같았다. PCR결과 YT1, YT2, YT3, YT4, YT9, YT10, YT11, YT13, YT14, YT16, YT20 등 11균주는 1080 bp에서 band를 생성하여 전형적인 TEM형이었다(Fig. 4). 그리고 YT5, YT6, YT7, YT8, YT12, YT15, YT17, YT19 등 8균주는 599 bp에서 생성물을 만들어 전형적인 SHV형이었다. 그러나 YT18은 TEM형과 SHV형에서 모두 생성물을 형성하지 않았다(Fig. 3, 4).

ESBL의 등전점 조사에 의한 형별 분류

ESBL 생성 20균주에 대한 TEM형과 SHV형의 추정을 위하여 등전점(isoelectric focusing) 검사를 실시하였다. 그리고 등전점 검사 결과와 PCR로 얻은 결과를 비교하여 TEM형, SHV형, TEM+SHV형, 기타형 등 5개 군으로 분류하였다. TEM형은 다시

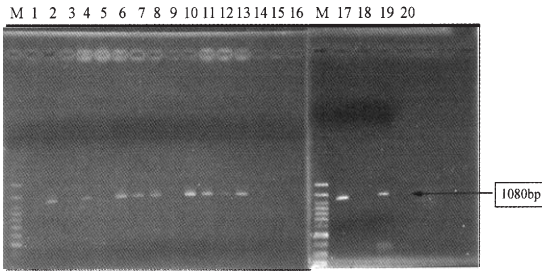


Fig. 3. TEM type of PCR Product. Lane 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 20, 1080 bp TEM type PCR product; Lane 5, 6, 7, 8, 12, 15, 17, 19, not produced TEM type PCR product; Lane M, molecular size marker.

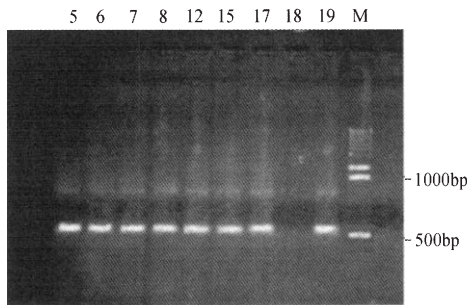


Fig. 4. SHV Type of PCR Product. Lane 5, 6, 7, 8, 12, 15, 17, 19, 599 bp SHV type PCR product; Lane 18, not produced 599 bp SHV type PCR product; Lane M, molecular size marker.

4개의 소군으로 분류하였는데 제 1 소군과 제 2소군은 등전점 (pI)이 2개였고, 제 3, 4소군은 pI 값이 1개였다. 제 1 소군은 등전점(pI)이 5.4와 6.0으로 YT1, YT2, YT10 등 3개 균주가 이에 속하였다. 제 2 소군은 pI 5.2, 5.3 으로서 YT16, YT20 등 2균주가 속하였다. 제 3 소군은 pI 5.4로서 YT3, YT4, YT9 등 3균주가 속하였다. 제 4 소군은 pI 5.2로서 YT12, YT17 등 2개 균주가 속하였다. SHV형은 2개의 소군으로 나뉘었는데 제 1 소군은 pI 7.4로서 YT6, YT15, YT19 등 3균주가 속하고, 제 2군은 pI 7.2로서 YT5가 여기에 속하였다. TEM+SHV형은 3개의 소군으로 나뉘었는데 제 1 소군은 pI 5.2와 7.3으로서 YT13, YT14 등 2균주가 속하고, 제 2 소군은 pI 5.2, 5.3, 6.3 으로서 YT11이 속하였다. 제 3 소군은 pI 5.4와 7.4으로서 YT7이 여기에 속하였다. 제 4 군은 1균주(YT8)로서 cefinase 시험에서 양성하였고, 이중 disk 확산 synergy 검사 양성반응으로 ESBL균주로 판명되었지만, PCR 실험결과 599 bp에서 band를 형성하여 SHV형으로 판명되었고, 등전점 확인 검사에서는 생성물을 형성하지 않아 pI를 측정할 수가 없었다. 제 5 군은 1균주 (YT18)로서 cefinase 시험에서 양성하였고 이중 disk 확산 synergy 검사 양성반응으로 ESBL균주로 판명되었지만, PCR 실험결과와 등전점 확인 검사에서도 생성물을 형성하지 않았다 (Table 4, Fig. 3, 4, 5).

Table 4. ESBL typing of *K. pneumoniae*

Group*	pI	Possible Type	Strain YT No.	PCR Type
1	5.4	TEM-1, 5, 7, 9, 19, 26	3, 4, 9	TEM
	5.2	TEM-1, 7, 12, 19	12, 17	SHV
	5.4/ 6.0	TEM-1, 7, 12, 19/ TEM-4, 5, 6, 8, 17	1, 2, 10	TEM
	5.2/ 5.3	TEM-1, 7, 12, 19/ TEM-1, 7, 12, 19	16, 20	TEM
2	5.3/ 7.3	TEM-1, 7, 12, 19/ SHV-1, 2	13, 14	TEM
	5.2/ 5.3/ 6.9	TEM-1, 7, 12, 19/ TEM-1, 7, 12, 19/ SHV-3	11	TEM
	5.4/ 7.4	TEM-1, 5, 7, 9, 19, 26/ SHV-1, 2	7	SHV
3	7.4	SHV-1, 2	6, 15, 19	SHV
	7.2	SHV-3	5	SHV
4	-	-	8	SHV
5	-	-	18	Unidentified

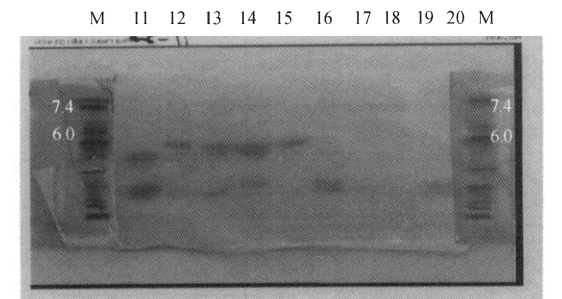
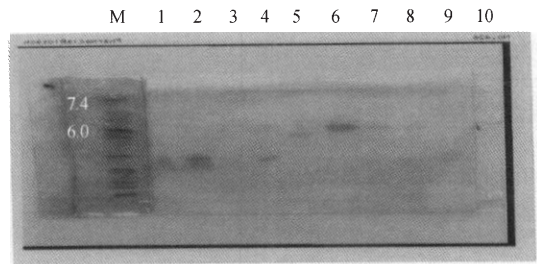


Fig. 5. Isoelectric focusing value of ESBL *K. pneumoniae*. Lane 1, 2, 10, pI 5.4, 6.0; Lane 3, 4, 9, pI 5.4; Lane 5, pI 7.2; Lane 7, pI 5.4, 7.4; Lane 6, 15, 19, pI 7.4; Lane 11, pI 5.2, 5.3, 6.9; Lane 12, 17, pI 5.2; Lane 13, 14, pI 5.3, 7.3; Lane 16, 20, pI 5.2, 5.3; Lane M, pI marker.

고 찰

*Klebsiella pneumoniae*는 *Escherichia coli*와 더불어 대표적인 인체 장내의 정상균총을 이루며 자연계에서도 쉽게 분리되며 운

동성이 없기 때문에 유연관계가 매우 높은 *Enterobacter*屬과 구분할 수 있다(13,14). *Klebsiella pneumoniae*는 면역계가 약해진 노약자나, 어린이, 또는 약물 남용자들에게 기회감염균으로 작용하여 *Streptococcus pneumoniae* 다음의 높은 빈도로 폐렴을 일으키며 특히 토양, 물, 식물 등의 환경 요인으로부터 감염되어 상처를 통하여 감염되기도 한다. 최근에 *Klebsiella pneumoniae*는 병원의 장기입원 환자와 수술후의 환자들에게 의사나 간호사의 손, 의복 등을 통한 원내감염을 일으켜 보건학적으로 중요할 뿐만 아니라 빈번하게 항균제의 다약제 내성을 유발시켜 치료에 매우 어려움을 주고 있는 병원균이다(6). 본 연구에서는 균주수집의 통계적인 객관성을 유지하기 위하여 한 환자에서서 1균주만을 분리하는 것을 원칙으로 함으로써, 광범위 β -lactamase 생성(ESBL) 균주가 특징인으로부터 중복되어 분리되는 것을 방지하였다. 본 실험에서 분리된 77균주는 내과병동에서 많이 분리되었고 검체별로는 객담에서 가장 많이 분리되었지만 외과와 비뇨기과에서는 예상외로 적게 분리되었다(Table 2). *Klebsiella pneumoniae* 균종은 이미 오래 전부터 다약제 내성 획득능력이 매우 우수한 것으로 알려져 있지만, ESBL 생성균주로 판정된 20균주는 전통적으로 임상에서 치료 목적으로 사용되는 여러 종류의 기존약제들에 대하여 내성을 획득하고 있을 뿐 아니라 최근에 치료용으로 투여되는 많은 종류의 제 3세대 cephalosporin 계열의 항균제에도 다약제 내성을 보여, 그 위험성이 매우 증대되고 있음을 보여주었다(Table 3). ESBL생성 균주의 병동별 분율은 중환자실과 신생아실에서 높은 수치를 나타내어(Table 2), 면역성이 저하된 중환자나 신생아에게 ESBL생성 균주가 감염을 쉽게 일으킬을 관찰 할 수 있었다. 이와 유사한 결과들은 Bush 등(6,9,10)에서도 보고된 바가 있으며, 국내에서 보고된 논문들과도 일치되었다(1-7).

ESBL의 정의는 이중 disk 확산법(double disk synergy test)에서 제3세대 cephalosporin 약제인 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 중 적어도 한가지 이상에 synergy 현상이 나타나며(13,15) 이들 약제에 적어도 한가지 이상에 대하여 내성을 나타내는 경우를 말한다. 본 연구에서는 이 정의와 완전히 일치되는 20균주를 분리하여 실험하였고 이에 대한 결과를 살펴보면 아래와 같았다.

단순한 β -lactamase 생성 균주의 확인은 초음파로 세균을 파쇄하여 5,000×g로 10분간 원심 분리하여 그 상등액을 paraffin film에 한 방울 떨어뜨리고 nitrocefin 용액을 한 방울 첨가시키면 2~30분 안에 반응이 적색으로 나타나 쉽게 판정이 되었다. ESBL 생성 균주의 일차 확인은 이중 disk 확산법을 사용하는 것이 효과적이었으며 약제간의 거리 간격은 1.5~2 cm 사이가 최적 조건으로 판정되었고 이 결과는 다른 연구자들의 보고와 약간 차이가 있었다(4,8). 이중 disk 확산법과 등전점 조사, 접합 시험 결과를 종합하여 보았을 때 이들은 plasmid 매개성에 의한 ESBL 생성 균주로 생각되었다. 그러나 ESBL균주 명명은 비록 등전점 값(pI)이 같다고 할지라도 point mutation에 의하여 한 두 개의 아미노산의 종류가 달라지고 이 결과 그 성상이 완전히 달라지기 때문에 Kinetic parameter (K_m 및 V_{max})를 측정하기 전에는 정확한 TEM형과 SHV형을 지정하여 명명하기가 어려웠다

(12,15,19). 그러나 등전점과 등전점 band의 수(數)에 기준을 두고 PCR 결과와 비교하여 유형을 나눌 수 있었다. 이와 같은 선별기준으로 부산의 3개 종합병원 미생물 검사실에서 분리된 ESBL *Klebsiella pneumoniae* 20균주는 TEM형, TEM+SHV 공유형, SHV형, 그리고 이중 disk 확산법과 PCR 검사결과는 분명히 ESBL 생성 균주에 속하지만 등전점값과 PCR결과를 얻을 수 없는 non TEM 및 non SHV형과, PCR 결과는 SHV형이었지만 등전점 값을 확인할 수 없는 5개의 범주로 분류가 가능하였다.

참고문헌

1. 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정운섭, 김의중, 조동택. 1997. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징. 감염 29, 93-103.
2. 설성용, 김광만, 신형섭, 장희경, 이유철, 조동택. 1997. 항균제내성의 분석에 의한 *Klebsiella*의 역학조사. 대한미생물학회지 32, 467-485.
3. 손소희, 이대준, 김창인, 김정민, 배현주. 1997. *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 TEM 및 SHV Type β -lactamase 유전자 분포. 감염 29, 271-276.
4. 이경원, 조성란, 이창숙, 정운섭, 권오현. 1994. Extended broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 26, 341-348.
5. 이상만, 이상화, 조동택. 1996. *Klebsiella pneumoniae*와 *Serratia marcescens*에서 확장된 내성범위의 β -lactamase 유전자의 분자유전학적 형질분류. 대한미생물학회지 31, 13-33.
6. 이선화, 정재심, 이수연, 배현주, 나준, 박성중, 피수영, 배직현. 1997. Extended-spectrum β -lactamase를 생산하는 *Klebsiella pneumoniae* 패혈증 집단발생의 분자유전학적 조사. 병원감염관리 2, 13-28.
7. 이수연, 이선화, 배직현. 1997. *Klebsiella pneumoniae* extended-spectrum β -lactamase 검출. 대한임상병리학회지 17, 1076-1088.
8. 정운섭, 이경원, 오가모도 료이찌, 이노우에 마쓰히사. 1997. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 특성. 감염 29, 477-485.
9. Bush, K. 1989. Minireviews, Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 259-263.
10. 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.
11. Ewing, W.H. 1986. The genus *Klebsiella*. In W.H. Ewing, Edwards and Ewings Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier, N.Y.
12. Goussard, S. and P. Courvalin. 1999. Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 367-370.
13. Grimont, F., P.A.D. Grimont, and C. Richard. 1991. The genus *Klebsiella*, p. 2775-2796. In A. Balows (eds.), The prokaryotes Vol III, 2nd ed. Springer-Verlag. N.Y.
14. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Genus *Klebsiella*. p.181. In Bergey's manual of deter-

- minative bacteriology, 9th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland.
15. 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.
 16. Mabilat, C. and S. Goussard. 1993. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p. 553-559. In D.H. Persing (ed.), *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 17. NCCLS. 1994. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 5th informational supplement. NCCLS document M100-S5. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085.
 18. Palucha, A., B. Mikiewicz, and M. Gniadkowski. 1999. Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL) during a hospital outbreak : emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 393-396.
 19. Philippon, A., R. Labia, and G. Jacoby. 1989. Extended-spectrum β -lactamase (minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131-1136.
 20. Poirrel, 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.
 21. Sanschagrin, F., F. Couture, and R.C. Levesque. 1995. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 887-893.

(Received August 4, 2000/Accepted September 6, 2000)

ABSTRACT : Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Typing of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimen in Pusan

Yun-Tae Kim and Hun-Ku Lee(Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea)

This study was performed to investigate the biological characteristics of twenty isolates of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* collected from the various clinical specimens of three hospitals in Pusan. Isoelectric focusing (IEF) and PCR were used to determine the types of β -lactamase gene in this study. Twenty isolates of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* could be divided by PCR, such as TEM type (11 strains), SHV type (8 strains), non TEM non SHV type (1 strain). In the isoelectric focusing test, the pI of TEM type was 5.2-6.0 and that of SHV type was 6.9-7.4. According to the pI value and PCR bands, twenty strains of ESBL *Klebsiella pneumoniae* were divided into 5 types, TEM type (pI 5.2-6.0; 1080 bp on PCR band), TEM + SHV type (pI 5.2-6.0; and pI 7.0-7.4; 1080 bp and 599 bp on PCR band), SHV type (pI 7.0-7.4; 599 bp on PCR band), non TEM non SHV type, and other type (PCR result was SHV type but pI was not detected).