

## Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis for Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens in Korea

Yun-Tae Kim<sup>†</sup>

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,  
Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

*Klebsiella pneumoniae* is the leading cause of nosocomial infection and the most commonly isolated from clinical specimens. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* infection was associated with a significantly longer duration of hospital stay and greater hospital charges. The purpose of this study is to investigate the antibiotic resistant patterns and the DNA fingerprint types of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae*. 223 *K. pneumoniae* strains were collected from three general hospitals with more than 500 beds in Busan, Korea from September 2004 to October 2005. The minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics was measured using the Gram negative susceptibility (GNS) cards of VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO). Random amplified polymorphic DNA method was used to detect DNA fingerprint of the organisms. Of the 226 *K. pneumoniae* isolates 65 ESBL-producing *K. pneumoniae* strains were detected by the Vitek system and confirmed by the double-disk synergy test. All the 65 *K. pneumoniae* strains were resistant cefazolin, cefepime, ceftriaxone and aztreonam, and 83.0% of the organisms were resistant to ampicillin/sulbactam, 66.1% to tobramycin, 67.6% to piperacillin/tazobactam, 61.5% to ciprofloxacin, and 47.6% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 43.0% to gentamicin. The RAPD patterns were distinguished as 10 types by three random 10-mer primers (208, 272, 277). Among ten type patterns, three types (Ic, IIb, IIIe) were remarkably represented at patient of internal department, nerve surgery department, general surgery department, and neonatal room. These results indicate that RAPD can be useful for DNA of strains typing in the epidemiological investigations. Therefore more investigation are needed in order to prevent the ESBL type-producing *K. pneumoniae* from spreading resistance to oxyimino cephalosporin antibiotics.

**Key Words:** *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL), Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

### 서 론

*Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*는 장내세균 속 (family Enterobacteriaceae)에 속하는 그람음성간균이며 인체 장내 정상 상재균이다 (Abbott, 1999). *K. pneumoniae*는 병원 감염의 중요 원인균 중 하나로 요로, 창상 및 혈액 등에서 분리되고 있다. 또한, 병원감염 폐렴의 흔한 원인균으로 알려져 있다 (Quintiliani et al., 1999). 그람음성간균 치료에 임상적 효능이 있는 첫 penicillin계 항균제인 ampicillin이 소개된 이

후,  $\beta$ -lactam 항균제는 이들 균종에 의한 감염증의 치료에 광범위하게 사용되어 왔다 (Quintiliani et al., 1999). Ampicillin이 임상에서 사용된 후  $\beta$ -lactamase 생성에 의해서 이 항균제에 대한 내성을 획득한 균주가 등장하였다 (Livermore, 1995). 이러한 내성세균의 감염증 치료에 병원에서는 Extended spectrum  $\beta$ -lactam 항생제를 흔히 사용하는데 이 항생제를 oxyimino cephalosporin이라 불리며, 제 3세대 cephalosporin 항생제인 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 등이 여기에 속 한다 (Jacoby, 1997). 그런데 1980년대 초반에 extended-spectrum  $\beta$ -lactam제까지 분해하는 효소인 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생성하는 균주가 처음 보고되었다 (Livermore, 1995) 그 후 세계 여러 나라에서 이러한 내성세균이 보고되고 있고 그 빈도는 계속 증가하고 있다 (Arlet et al., 1990). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)는 주로 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 생성하며 이들 효소를 생성하는 유전자에 따라 TEM형

\*논문 접수: 2006년 8월 1일  
수정제접수: 2006년 9월 15일

<sup>†</sup>교신저자: 김윤태, (우) 609-757 부산광역시 금정구 부곡3동 9번지,  
부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과  
Tel: 051-510-0820, Fax: 051-510-0568  
e-mail: ytkim@cup.ac.kr

SHV형, CTX-M형 등으로 불린다. 또한 이들 효소를 encode하는 유전자는 plasmid에 매개되므로 다른 균주로의 내성전달이 용이하다 (Du Bois et al., 1995). 그렇기 때문에 ESBL을 생성하는 균주들은 병원내 감염의 주요 원인이 되고 있다. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)는 Penicillin, 험범위 cephalosporin 뿐 아니라 제 3세대 cephalosporin과 monobactam도 가수분해할 수 있다. 그러나 cephemycin과 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid에 의해서 활성이 억제되는 특성이 있다 (Jacoby, 1994; Bauernfiend et al., 1989). 국내에서는 1990년대 초부터 이 효소를 생성하는 그람음성 세균의 분리가 보고되었으며, 그 빈도는 2000년대 들어서 현저하게 증가하고 있는 것으로 알려졌다 (Lee et al., 2001).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR 방법은 균의 DNA 염기서열에 대한 특별한 정보 없이 1개의 arbitrary primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하여 그 산물을 관찰함으로써 균의 DNA 다형성을 관찰할 수 있는 법으로, 과정이 간단하고 신속하여 균의 분류와 역학조사에 널리 이용되기 시작하였다 (Robert et al., 1995). RAPD 분석은 일반 세균 뿐 아니라, 진균인 *Candida species*의 동정과 역학적 분류에 유용하다고 보고되었다 (Robert et al., 1995). Eshwar 등은 그람음성간균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 감염된 cystic fibrosis 환자의 역학적 조사에 이용하여 그 유용성을 증명하였다 (Eshwar, 1996). 따라서 RAPD 분석은 여러 가지 세균에 의한 감염증에서 동일 균의 전파를 알아내는 분자 역학적 조사에도 많이 이용되어 왔다. 이에 본 연구에서는 부산의 종합병원에서 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주를 대상으로 항균제 내성 현황을 조사하고, 그 내성유전자의 형별

**Table 1.** Antimicrobial agents and resistance breakpoint used in this study

Antimicrobial agents	Resistance breakpoint, μg/mL
Amikacin	≥64
Ampicillin	≥32
Ampicillin/sulbactam	≥32/16
Aztreonam	≥32
Cefazolin	≥32
Cefepime	≥32
Cefoxitin	≥32
Ceftriaxone	≥64
Ciprofloxacin	≥4
Gentamicin	≥16
Imipenem	≥16
Piperacillin/tazobactam	≥128/4
Tobramycin	≥16
Trimethoprim sulfamethoxazole: SXT	≥4/76

을 분류하고자 하였다. 또한 이들 균주들이 원내감염을 일으키는 주요 원인인지를 조사하기 위하여 DNA를 추출한 후, RAPD 분석을 실시하여 같은 균종 내에서 동일균주인지를 밝힘으로써 ESBL 생성균주의 원내감염에 대한 역학적 조사에 이용하고자 하였다.

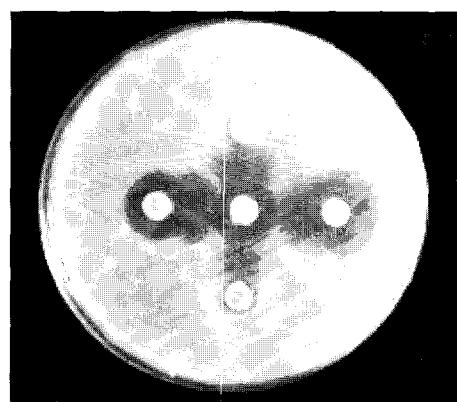
## 재료 및 방법

### 1. Bacterial strain

2004년 9월부터 2005년 12월까지 부산시내 500병상 이상의 3개 종합병원 입상검체에서 분리된 223개의 *K. pneumoniae* 균주로부터 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 65 균주 (A병원: 52주, B병원: 7주, C병원: 6주)를 실험 대상으로 하였다. *K. pneumoniae*는 VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO)의 GNI card에 시험균을 접종하여 생화학적 시험을 하고 동정하였다.

### 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) measurement by VITEK system

Disk 확산법에 의한 항생제 감수성 시험결과 ESBL 균주로 추정되는 *K. pneumoniae*를 MacConkey agar에서 18시간 배양하여 멸균된 중류수에 부유시켜 5,000 rpm에서 3회 원심 분리하여 세척시킨 다음, 멸균된 0.45% NaCl 1.8 mL에 혼탁하여 McFarland No. 0.5로 조정하였다. 이 균액 200 μL를 다시 멸균된 0.45% NaCl 1.8 mL에 가하여 항균제 최소억제농도 자동측정기인 VITEK의 GNS card에 접종하여 MIC를 측정하였다. 측정된 항균제는 14종으로 Table 1과 같았고, 각 약제에 대한 최소억제농도는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다 (NCCLS, 2000).



**Fig. 1.** Double disk synergy test. Assessment of antimicrobial synergy of ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam (four disk of the periphery) and clavulanic acid (disk of the center). ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* strain shows positive double disk synergy between disks containing four antibiotics.

**Table 2.** Nucleotide sequences of the primers used in PCR

Name	Nucleotide sequence	Characteristics
1 TEM type	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	PCR for forward TEM
2 TEM type	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC	PCR for reverse TEM
3 SHV type	5'-TCGTTATGCGTTATTCGCC	PCR for forward SHV
4 SHV type	5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	PCR for reverse SHV
5 CTX-M type	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG	PCR for forward CTX-M
6 CTX-M type	5'-ACCGCGATATCGTTGGT	PCR for reverse CTX-M

### 3. Double disk synergy test

McFarland No. 0.5 농도에 맞춘 신선한 균 부유액을 멀균된 면봉으로 적셔 미리 만든 3 mm 두께의 Mueller-Hinton (MHA) 평판배지에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 µg, Becton Dickinson, USA) disk를 엎여 놓고 그 주변 1.5 cm 간격에 cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftriaxone (30 µg) disk를 올려 놓아 37°C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과 (synergism)를 판정하였다 (Fig. 1).

### 4. ESBL gene detection by PCR (polymerase chain reaction)

ESBL 효소를 생성하는 유전형을 분석하기 위하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 시험균주를 TSB 액체배지 (tryptic soy broth)에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였으며, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 AccuPrep® plasmid extraction kit (Bioneer Seoul Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 사용한 primer는 Table 2에 나타내었고 시약은 AccuPower® PCR Premix kit (BIONEER Co. Ltd. Seoul, Korea)를 사용하였다. Primer (10 pmol)를 각각 1 µL, template DNA 8 µL, 3차 종류수 10 µL를 가하여 총량이 20 µL 되게 맞춘 후 사용하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)를 사용하였다. TEM type의 PCR 반응 조건은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 45°C에서 90초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. SHV type은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. CTX-M type은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. 반응이 끝난 PCR 생성물은 1.5% agarose

**Table 3.** Sequences of 10-mer RAPD PCR primers in this study

Primer	Sequence (5' to 3')
208	ACGGCCGACC
272	AGCGGGCCAA
277	AGGAAGGTGC

gel에서 100 volt로 30분 간 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 U.V. transilluminator로 생성분획을 확인하였다.

### 5. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR

원내감염의 원인이 동일균주에 의한 것인지를 분석하기 위하여 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR을 실시하였다. 균주를 TSB에 접종하여 37°C에서 8~10시간 배양하였다. 균 배양액 1.5 mL을 microcentrifuge tube에 옮긴 후, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 하층 펠렛만 남겼다. 여기에 STET buffer [Sucrose 8 g (8%), Triton X-100 5 mL (5%), EDTA 1.461 g (50 mM), Tris 0.605 g (50 mM)] 300 µL를 넣고 vortex 하였다. 여기에 다시 10 mg/mL의 lysozyme를 20 µL 넣고 상온에서 1분간 방치하였다. 95°C로 맞춘 hot block에 끊어서 5분간 heating 하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 새 tube에 옮겼다. 여기에 99.9% ethanol 600 µL를 넣고 -70°C에서 30분 이상 정치시켰다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액은 버렸다. 70% ethanol 300 µL를 가한 후 가볍게 inverting 한 후 다시 12,000 rpm에서 5분간 원심 후 상층액을 완전히 제거하였다. 이때 피펫으로 조심스럽게 제거한 후 vacuum이나 dryer로 건조하였다. 30~60 µL TE buffer 또는 멸균증류수에 녹인 후, PCR template로 사용하였다. RAPD PCR의 primer은 NAPS Unit list of standard primers (<http://www.ubc.ca/>) 중에서 No. 208, No. 272, No. 277 세 가지를 사용하였다 (Eshwar et al., 1996).

PCR에 사용된 시약은 AccuPower® PCR Premix Kit (BIONEER Co. Ltd. Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR product 제조는 premix kit에 primer 1 µL와 template DNA 6 µL를 넣고 멸

균중류수 13 μL를 넣어서 총량이 20 μL되게 하였다.

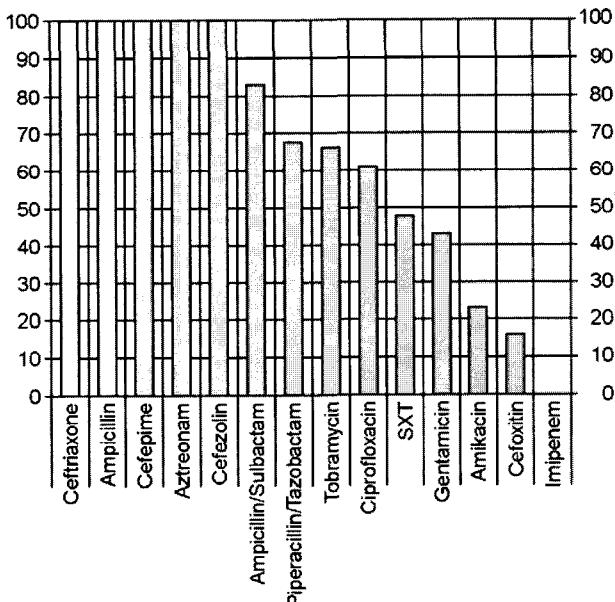
사용한 primer는 Table 3에 나타내었고 primer 농도는 40 pmol로 맞추어 사용하였다.

PCR 조건은 94°C에서 5분, 36°C에서 5분, 72°C에서 5분간 4 cycles한 후 94°C에서 1분, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분간 30 cycles하고 나서 72°C에서 10분 간 1 cycle로 마무리 하였다. 1.5% agarosegel을 사용하여 100 V에서 90분 동안 전기영동한 후 EtBr로 20분 동안 염색한 후 U.V에서 DNA 분획을 확인하였다. DNA major band의 개수와 위치를 파악하여 분석 자료를 Excel에 기록한 후 MVSP (Multi variate Statistical Package)의 프로그램을 이용하여 Dendrogram을 그려서 분류를 하였다 (<http://www.exetersoftware.com/cat/kovach/mvsp.html>).

## 결 과

### 1. Antibiotic susceptibility test by VITEK system

항생제 감수성 시험 결과 100% 내성으로 나타난 항균제는 ampicillin, cafazolin, cefepime, ceftriaxone, aztreonam이었고, amicillin/sulbactam은 79.6%, tobramycin은 83.0%, piperacillin/tazobactam은 67.6%, ciprofloxacin은 61.5%, trimethoprim/sulfamethoxazole과 gentamicin은 각각 43.0%, amikacin은 23.0%, cefoxitin은 16.9%의 내성을 나타내었으며, imipenem은 모든 균주가 감수성을 보였다 (Fig. 2).



**Fig. 2.** Antimicrobial resistance rates (%) of ESBL-producing *K. pneumoniae* tested by VITEK system. All the clinical isolates (100%) of *K. pneumoniae* were resistant to ceftriaxone, ampicillin, cefepime, aztreonam, and cefazolin: 83.0% of the organisms were resistant to ampicillin/sulbactam, 66.1% to tobramycin, 67.6% to piperacillin/tazobactam, 61.5% to ciprofloxacin, 47.6% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 43.0% to gentamicin, 23.0% to amikacin, 16.9% to cefoxitin, and all strains were susceptible to imipenem.

\*Abbreviations, SXT; Trimethoprim/sulfamethoxazole

tazobactam은 67.6%, ciprofloxacin은 61.5%, trimethoprim/sulfamethoxazole과 gentamicin은 각각 43.0%, amikacin은 23.0%, cefoxitin은 16.9%의 내성을 나타내었으며, imipenem은 모든 균주가 감수성을 보였다 (Fig. 2).

### 2. ESBL 생성균주 확인

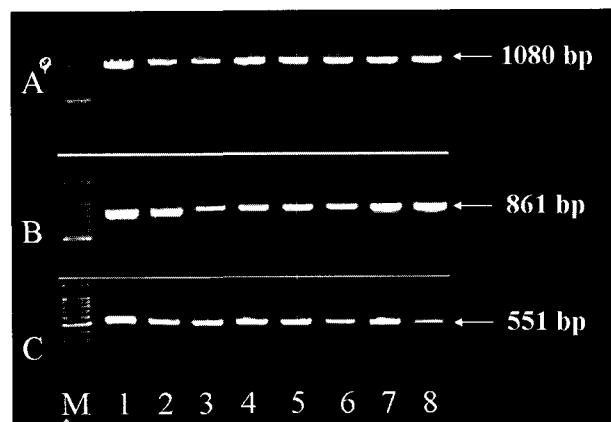
VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO)에서 ESBL 생성균주로 판정된 *K. pneumoniae* 65주 중에서 65주 (100%) 모두 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험에서 양성이 확인되었다. 그러나 cefotaxime, ceftriaxone 디스크의 double disk synergy 시험에서는 65균주 중 2균주를 제외한 63주 (96.9%)가 양성으로 확인되었다.

### 3. *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> gene detected by polymerase chain reaction

ESBL 생성 *K. pneumoniae* 65균주를 대상으로 *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> 유전자 검출을 위한 PCR을 시행한 결과 *bla*<sub>TEM</sub> 유전자는 42주 (64.6%), *bla*<sub>SHV</sub> 유전자는 46주 (70.7%), *bla*<sub>CTX-M</sub>

**Table 4.** Presence of ESBL-genes in *Klebsiella pneumoniae* strains

ESBL gene type	Number of isolates (%)
TEM	4 ( 6.2%)
SHV	7 (10.8%)
CTX-M	8 (12.3%)
TEM+SHV	22 (33.8%)
TEM+CTX-M	4 ( 6.2%)
SHV+CTX-M	5 ( 7.7%)
TEM+SHV+CTX-M	12 (18.5%)
Not detected	3 ( 4.6%)
Total	65 (100%)



**Fig. 3.** Detection of amplified products of *bla*<sub>TEM</sub> genes, *bla*<sub>SHV</sub> genes and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. A; *bla*<sub>TEM</sub> genes, B; *bla*<sub>SHV</sub> genes, C; *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. M; size marker.

유전자는 29주 (44.6%)가 양성반응을 보였다.

65균주 중 *bla<sub>TEM</sub>* 만 가지고 있는 균주는 4주 (6.1%), *bla<sub>SHV</sub>* 만 가지고 있는 균주는 7주 (10.7%), *bla<sub>CTX-M</sub>* 만 가지고 있는 균주는 8주 (12.3%), 그리고, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* 두 가지

유전자를 가지고 있는 균주는 22주 (33.8%), *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 4주 (6.1%), *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 5주 (7.6%)였고, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* 유전자 세 가지를 모두 가지고

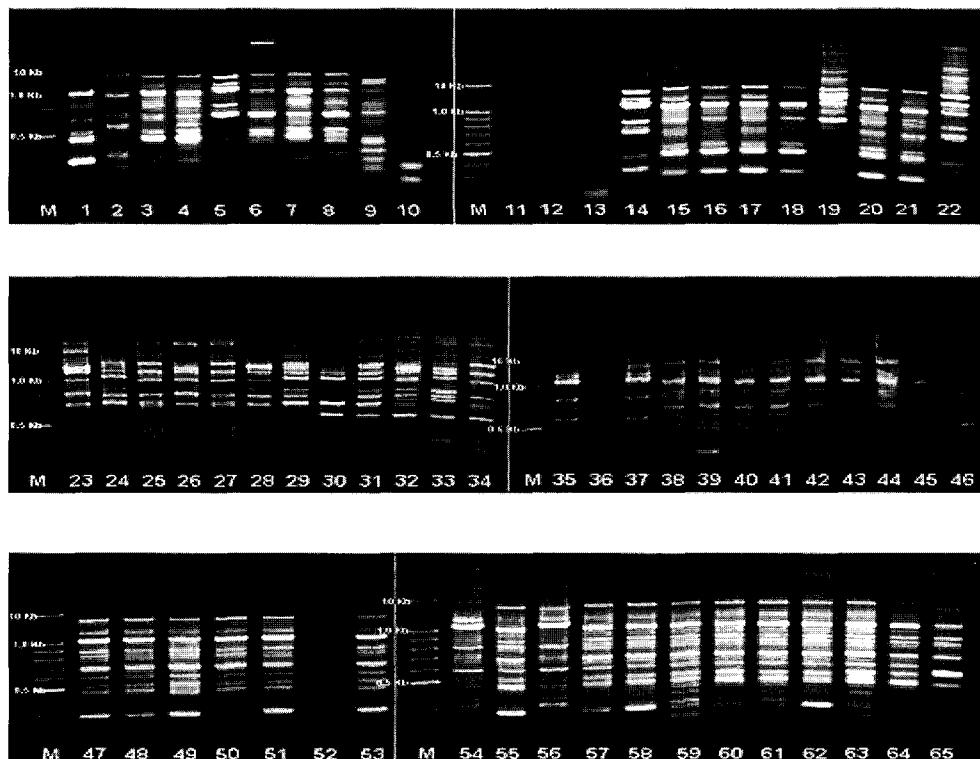


Fig. 4. Amplified RAPD products with primer 208 from 65 clinical isolates of *K. pneumoniae*. M: size marker.

Table 5. Analysis of RAPD profile based on patients of hospitals and wards hospitals and wards

RAPD TYPE	Source													Total
	A hosp.	A hosp.	A hosp.	C hosp.	A hosp.	A hosp.	B hosp.	A hosp.	A hosp.	B hosp.	A hosp.	C hosp.	A hosp.	
	MED	NS	GS	GS	GS ICU	NR	NR	MED ICU	PED	GS	URO	MED	Others	
Ia										2	1			3
Ib									2	2				4
Ic	1	1	2	5	1			1						11
IIa							1					1	2	
IIb						3	4							7
IIIa					3									3
IIIb											1	1		
IIIc											1	1		
IIId					3									3
IIIe	13	12		5	7	3	5	4		2	2	1	1	30
Total	14	13	2	5	7	3	5	5	2	2	2	1	4	65

\* Abbreviations

hosp.: hospital, MED: Internal medicine, NS: Nerve surgery, GS: General surgery, GS ICU: General surgery intensive care unit, NR: Nursery room, MED ICU: Intensive care unit medicine, PED: Pediatric department, URO: Urinary organ department

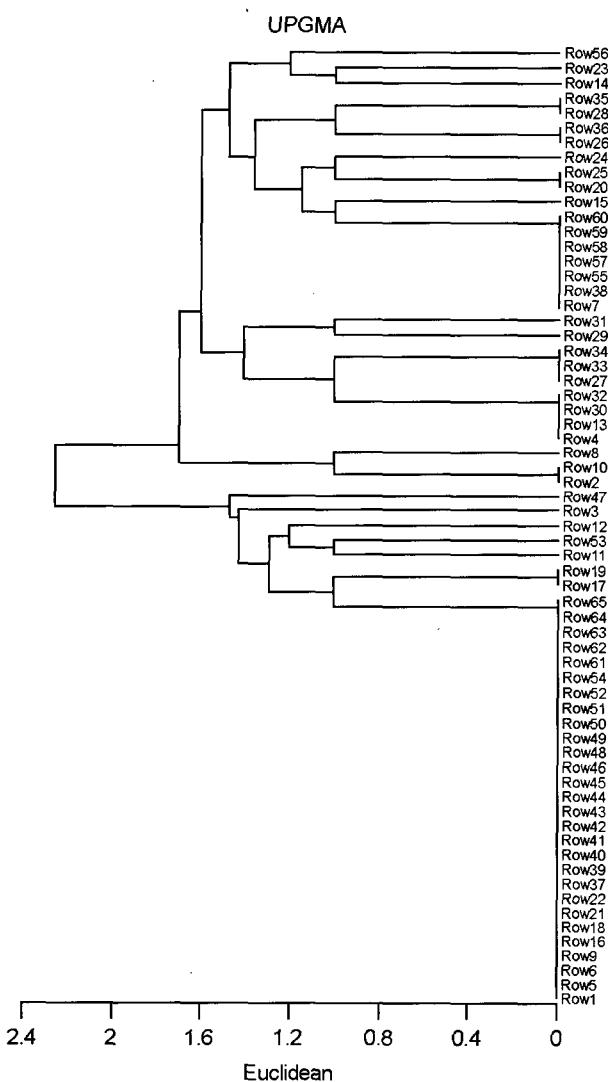
있는 균주는 12주 (18.4%)였다. 그리고 세 가지 유전자를 모두 가지고 있지 않은 균주는 3주 (4.6%)였다 (Table 4, Fig. 3).

#### 4. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

RAPD 양상을 분석한 결과 여러 가지 희미한 band를 제외하고 뚜렷하게 나타난 것으로 dendrogram을 그린 결과 크게 세 가지 형으로 분류되었고 band의 양상과 위치를 고려하여 다시 10가지 band pattern으로 세분하였다. DNA 분획이 500 bp, 600 bp, 700 bp, 1050 bp, 10 Kbp에서 5개의 band가 뚜렷한 것을 Type Ia라고 하였다. Type Ib는 500 bp, 600 bp 900 bp, 1050 bp에서 4개의 band가 나타난 것을, Type Ic는 500 bp, 600 bp에서 2개의 band가 나타난 것을, Type IIa는 600 bp, 700 bp, 900 bp, 1050 bp에서 4개의 band가 나타난 것을,

Type IIb는 600 bp, 1050 bp, 10 Kbp에서 3개의 band가 나타난 것을, Type IIIa는 450 bp, 550 bp에서 2개의 band가 나타난 것을, Type IIIb는 450 bp, 550 bp 600 bp, 700 bp, 900 bp, 10 Kbp에서 6개의 band가 나타난 것을, Type IIIc는 900 bp, 1050 bp에서 2개의 band가 나타난 것을, Type IIId는 450 bp, 550 bp, 700 bp, 900 bp, 1050 bp에서 5개의 band가 나타난 것을, Type IIIe는 500 bp, 600 bp, 900 bp, 1050 bp에서 4개의 band가 나타난 것으로 분류하여 dendrogram으로 나타내었다 (Fig. 4, 5). Dendrogram을 분석한 결과 각 병원간의 유사성과 같은 병동간의 유사성이 잘 나타났는데 이는 Table 5에 나타내었다.

## 고 찰



**Fig. 5.** A dendrogram of distinct RAPD fragments amplified from *Klebsiella pneumoniae* isolates with primer 208, 272 and 277. The lane numbers are the sample numbers.

그람음성간균은 임상검체에서 흔히 분리되는 균속인데, 이 세균에 의한 감염증 치료에는 흔히  $\beta$ -lactam제가 이용되어 왔다 (Du Bois et al., 1995). 그러나 근래 중증감염을 일으키는 *K. pneumoniae* 중에 ESBL 생성균이 증가하고 있으며, ESBL 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 전달될 수 있고 원내감염을 일으킬 수 있기 때문에 심각한 문제가 되고 있다 (Dumarche et al., 2002). 송 등 (Song et al., 2000)의 전국적인 조사에 의하면 우리나라의 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*도 중환자실 환자에서 분리율이 높았고 (Son et al., 1997), 다른 항균제에 대한 내성을 ESBL 비생성균주에 비해 높다고 하였다 (Epai, 1998). 본 연구에서도 항생제 감수성 시험결과 ampicillin, cafazolin, cefepime, ceftriaxone, aztreonam이 100% 내성으로 나타났고 cefoxitin의 내성을 13.0%로 가장 낮았으며, imipenem은 모든 균주가 100%의 감수성을 나타냄으로써 ESBL 생성균주의 전형적인 양상을 나타내었다 (Fig. 2). 본 연구에서는 아직까지 carbapenem 제제인 imipenem에 내성을 보이는 ESBL 생성균주가 없다는 것을 확인할 수 있었다. 병원의 규모가 크거나 대학병원일수록 ESBL 생성균주의 분리율이 높다는 보고가 있다 (Hong et al., 2004). 우리나라의 경우 그 비율은 균종, 병원 및 분리연도에 따라 달랐지만, 대체로 *E. coli*는 9.1%, *K. pneumoniae*는 29.2%로 적지 않게 보고되었다 (Hong et al., 2004). 본 연구에서는 500병상 정도의 병원 환자에서 분리된 *K. pneumoniae* 중 ESBL 생성균주의 비율이 28.7%로 전국 평균과 거의 비슷하였다. Double disk synergy 시험은 TEM 및 SHV형 ESBL이 clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성을 이용한 것으로, 이 효소를 생성하는 세균의 검출에 널리 사용되고 있다 (Coudron et al., 1997). 본 연구에서는 ceftazidime cefotaxime, ceftriaxone 디스크와 clavulanic acid 디스크를 사용하여 double disk synergy 시험을 시행하였다. 위의 3세대 cephalosporin 디스크 중 한 가지 디스크에서라도 synergy 현상이

나타난 균주를 양성으로 판정하였다. 실험한 결과 Vitek system에서 ESBL로 분리된 65균주 중 cefotaxime, ceftriaxone 디스크의 double disk synergy 시험에서는 63주 (96.9%)가 양성으로 나타났다. 그렇지만 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험에서는 65균주 모두가 양성으로 나타났다. 따라서 Vitek system에서의 ESBL 생성균주 검출과 ceftazidime 디스크의 double disk synergy 시험과의 일치율이 100%를 나타내어 ceftazidime 디스크를 사용하여 double disk synergy 시험을 하는 것이 가장 효과적이었다.

TEM형은 1960년대 초에 그리스에서 Temoniera라는 패혈증 환자의 검체에서 분리된 *K. pneumoniae*로부터 처음으로 검출되어 보고되었다. 그래서 이 환자의 이름을 따서 TEM형이라고 불려졌다 (Bradford, 2001). SHV형은 sulphydryl variable의 약자로 표시한 것인데 주로 *K. pneumoniae*의 chromosome에 존재 하지만 plasmid에 매개되어 자주 *E. coli*에서 발견된다. SHV형은 1980년대에 독일에서 분리된 *Klebsiella ozaenae* 균주에서 처음 검출되었다 (Bradford, 2001). CTX-M 형 ESBL은 1989년 독일의 임상에서 발견되는 *E. coli* 균주에서 검출되기 시작했는데 이 효소는 다른 항생제에 비해 cefotaxime에 강한 내성을 나타내었다. 이 cefotaxime 항생제의 이름을 따서 CTX-M이라고 명명하였다 (Bonnet, 2004). CTX-M-β-lactamases는 TEM, SHV형 ESBL과는 다소 연관이 적은 것으로 보고되고 있으며, TEM, SHV형 ESBL gene과는 40% 이하의 homology를 갖고 있는 것으로 보고되었다 (Moland et al., 2003). 현재 전 세계적으로 ESBL 생성균주가 많이 나타나고 있는데 주로 TEM형, SHV형, CTX-M형 등이 주류를 이룬다. 국내에서도 ESBL 생성균주가 상당히 많이 검출되고 있는데 분리되는 ESBL 생성 장내세균 중에는 SHV형을 생성하는 세균이 많았다는 보고가 있다 (Lee et al., 2003). 본 연구에서도 TEM형 42주, SHV형이 46주로 나타나서 SHV형이 많이 증가함을 나타냈다. 그리고 CTX-M형이 29주가 검출되었는데 이는 우리나라에서도 CTX-M형이 많이 나타나고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 TEM, SHV, CTX-M형의 한 가지 gene을 생성하는 균주는 적게 나타났고, 두 가지 또는 세 가지의 gene을 동시에 보유하는 균주가 많이 확인되었다. 특히, TEM과 SHV를 동시에 가지는 균주가 65균주 중에서 22주 (33.8%)로 가장 많았고 그 다음으로 TEM, SHV, CTX-M 세 가지를 동시에 가지고 있는 균주가 12주 (18.5%)로 확인되었다 (Table 4). 이상과 같은 결과에서 최근에는 한 가지의 내성유전자를 가지고 있는 균주보다 여러 가지 내성유전자를 복합적으로 가진 균주가 많이 출현한다는 것을 알 수 있었다. RAPD PCR 방법은 최근 균종을 좀 더 정확하고 신속하게 동정하는 것 이외에도, 동일 균의 전파를 알아내는 분자 역학적 조사에도 이용되었다 (Loudon et al., 1993).

본 연구는 실험에 사용된 균주를 대상으로 간단한 방법으로 DNA를 추출한 후, RAPD 분석을 실시함으로써, 원내감염을 일으키는 동일균주의 검출을 위한 역학적 조사에 이용하고자 하였다. 연구에 사용한 균주들은 대학병원이 아닌 3개의 일반종합병원에서 분리한 것들이었는데 다양한 검체에서 균이 분리되었다. 각 병원별로 분석하였고 검체를 수거한 병동별로도 분석하였다. 동일한 병원의 같은 병동에서 분리한 균주들의 band pattern이 유사하게 분류할 수가 있어서 같은 병동내의 감염이 동일균주에서 비롯되었음을 추정할 수 있었다. 하지만 같은 병동 내에서 분리한 균주라도 band pattern이 다른 것도 다수 나타났다. 또한, 이들 band pattern을 검출된 ESBL 유전형들과도 비교 분석해 보았으나 이들의 연관성은 찾아낼 수가 없었다.

총 10가지의 band type 중에서 1-3균주 정도를 포함한 일부 type들은 band의 양상이 정확하게 분석되지 않아서 분류의 한 형태로 보기는 어려울 것 같았다. 이는 PCR이 제대로 되지 않았거나 전기영동이 정확하게 실행되지 않아서 나타난 현상 같았다. 10가지 분류 중에서 Ic, IIb, IIIe형의 3그룹에 포함되는 균주가 전체 65균주 중에서 48균주였는데 90% 이상의 높은 유사성을 보였다. 가장 많이 나타난 IIIe형에는 30균주가 포함되었는데 이는 A병원의 내과중환자실 12주와 신경외과 12주로 나타났다. IIb형에는 7균주가 포함되었는데 B병원의 소아과 4주, A병원 소아과 3주로 나타났다. Ic형은 모두 11균주가 포함되었는데 C병원 외과에서 분리한 5균주가 같은 형태였다. 이 같은 분석결과는 ESBL을 생성하는 균주가 원내감염으로서 같은 병동에 입원한 환자들에게 전파되고 있다는 것을 증명 해 주는 것 같다.

앞으로 항생제에 내성을 가지는 균주의 확산을 방지하기 위해서 ESBL gene을 생성하는 균주의 유전적 특징과 항생제 내성기전을 연구하고 또한 이러한 균주의 원내감염 확산을 방지하기 위하여 꾸준한 조사와 감시가 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Abbott S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, and Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999. 475-482.
- Arlet G, Sanson-Le Por MJ, Rouveau M, Fournier G, Mario O, Schlemmer B. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 β-lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990. 9: 797-803.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004. 48:

- 1-14.
- Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933-951.
- Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 : 2593-2597.
- Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM and SHV derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 35: 7-22.
- Dumarche P, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1128-1131.
- Epai H. The characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Korean isolates of *Enterobacteriaceae*. *Yonsei Med J.* 1998; 39: 514-519.
- Eshwar MA, Maureen EC, Jennifer F, Joseph SL, David PS. Random Amplified Polymorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1129-1135.
- Hong SG, Lee J, Yong D, Kim EC, Jeong SH, Park YJ. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. *Korean J Clin Microbiol.* 2004; 7: 171-177.
- Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum betalactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994; 13: 2-11.
- Jacoby GA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- $\beta$ -lactams. *Infect Dis Clin NA.* 1997; 11: 875-887.
- Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC. Dissemination of SHV-12 and characterization of New AmpC-type  $\beta$ -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2477-2482.
- Lee SH, Jeong SH, Lee KJ. Evolution of TEM  $\beta$ -lactamase genes identified by PCR with newly designed primers in Korean clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 98-100.
- Livermore DM.  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8: 557-584.
- Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1117-1121.
- Moland ES, black JA, Hossain A, Hanson ND, Thomson KS, Pottumarthy S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2382-2383.
- National Committee for Clinical laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. Wayne: NCCLS. 2000. M7-A5.
- Quintiliani RJ, Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, and Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999. 1505-1525.
- Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2366 -2371.
- Son SH, Lee DJ, Kim CG, Kim JM, Bae HJ. Distribution TEM, SHV type beta-lactamase gene of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection.* 1997; 29: 271-276.
- Song WG, Lee KW, Kim SJ, Jeong SH, Chang CH, Shin HJ. Extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from 12 hospital in Korea. *Korea J Chemother.* 2000; 18: 401-410.