Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 14, No. 3 pp. 1191-1196, 2013

http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2013.14.3.1191

Extended-Spectrum β-Lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주의 유전형 검출

육근돌[1], 양병선[2], 박진숙[3*]
[1]대전보건대학교 임상병리과, [2]진주보건대학교 임상병리과, [3]한남대학교 생명공학과

Genotypic Detection of Extended-Spectrum β-Lactamase -Producing of *Klebsiella pneumoniae*

Keun-Dol Yook[1], Byoung-Seon Yang[2] and Jin-Sook Park[3*]
[1]**Dept. of Clinical Laboratory Science, Deajeon Health Science College**
[2]**Dept. of Clinical Pathology, Jinju Health College**
[3]**Dept. of Biotechnology, Hannam University**

요 약 임상검체에서 분리되는 그람음성 막대균의 제 3세대 cephalosporin에 대한 내성율의 증가는 임상적으로 심각한 문제가 되고 있다. 3세대 cephalosporin 및 monobactam계 항균제에 대한 내성은 주로 Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)의 생성에 기인한다. 따라서 ESBL 유전자의 정확한 검출은 병원내의 감염경로 파악을 위한 감시 및 역학조사를 위해 필수적이다. 본 연구는 2012년 2월부터 8월까지 대전, 충남, 충북지역의 대학병원으로부터 ESBL 생성 *Klebsiella penumoniae* 46균주를 분리하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에 따라 ceftazidime (CAZ)과 CAZ/clavulanate (CLA)를 이용한 combination disk test (CDT) 방법에 의해 표현형을 조사하고, 유전형 특이 프라이머를 이용한 multiplex PCR을 수행하여 유전형을 검출하였다. CDT 결과 42균주가 ESBL생성균주로 확인되었다. PCR 결과, 46균주 모두 TEM형이었으며, 37균주는 SHV형, 14균주는 CTX-M형으로 나타났으며 10균주가 TEM, SHV, CTX-M 유전자를 모두 가지고 있었다. Multiplex PCR에 의한 유전형 검출 방법은 임상에서 분리한 ESBL생성 *K. penumoniae*균주의 감별과 검출에 유용한 방법으로 사료된다.

Abstract Among Gram-negative pathogens in Korea, the incidence of resistance to third generation cephalosporins is becoming an ever-increasing problem. The production of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) is the main mechanism of bacterial resistance to a third-generation cephalosporins and monobactams. Accurate identification of the ESBL genes are necessary for surveillance and epidemiological studies of the mode of transmission in the hospital. This study was conducted to detect the genes encoding ESBL of 46 *K. penumoniae* isolated from Daejeon, Chungnam and Chungbuk regional university hospitals from February to August in 2012. The phenotypes of the isolated specimens were examined according to the combination disc test (CDT) by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Forty two ESBL producing *K. penumoniae* isolates could be detected using ceftazidime (CAZ) discs with and without clavulanate (CLA). By CDT, 42 *K. pneumoniae* strains were confirmed to be ESBL strains. Genotyping was performed by multiplex PCR with type-specific primers. By PCR analysis, TEM gene in 46 strains, SHV gene in 37 strains and CTX-M genes in 14 strains were identified. Ten isolates did carry genes encoding ESBLs of all types TEM, SHV and CTX-M. The multiplex polymerase chain reaction (PCR) analysis was better to detect and differentiate ESBL producing *K. penumoniae* strains in clinical isolates.

Key Words : Extended-spectrum β -lactamases, *Klebsiella penumoniae,* Polymerase chain reaction

본 논문은 대전보건대학교 2012년도 교내 연구과제로 수행되었음.
*Corresponding Author : Jin-Sook Park(Hannam Univ.)
Tel : +82-42-629-8771 e-mail: jspark@hnu.kr
Received February 12, 2013 Revised (1st February 28, 2013, 2nd March 6, 2013) Accepted March 7, 2012

I. 서 론

Extended-spectrum-ß-lactamase (ESBL)는 주로 장내세균 속에서 생성되며[1], 특히 병원균주들에서 플라스미드 등을 통한 내성의 확산이 큰 문제로 대두되고 있다[2]. ESBL은 활성 범위가 매우 넓은 효소로써 carbapenem과 cephamycin을 제외한 ß-lactam 항균제 대부분을 가수분해한다. Ambler의 분류에 따르면 ESBL에 속하는 class A ß-lactamases는 ß-lactam 항균제를 불활성화 시키는 serine 잔기를 가지며 Temoneira (TEM), Sulfhydryl reagent variable (SHV)형이 이에 속하며, oxyimino-cephalosporin 항균제를 가수분해한다[3]. 모든 penicillin과 1세대부터 4세대까지의 cephalosporin 및 monobactam에 내성을 보이나 cephamycin 또는 carbapenem에는 감수성을 나타낸다. 가장 빈번히 출현하는 ESBL균주들에서 TEM, SHV와 Active on cefotaxime (CTX-M) 유전자를 함유한다[4]. Class B β-lactamase는 효소의 활성에 아연을 필요로 하는 metaloenzyme으로서 *Pseudomonas aeruginosa* , *Acinetobacter* 속 세균에서 나타나며, *Enterobacteriaceae* 균종에서도 드물게 보고된다[5]. Class C β-lactamase는 주로 cephalosporin을 잘 분해하는 cephalosporinase로 그람 음성균의 염색체성 β-lactamase이며 흔히 AmpC 효소로도 불리 운다. *K. pneumoniae*는 2%에서 5%정도가 원내감염의 원인균으로 알려져 있으며, 특히 하부 호흡계와 비뇨기계에 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다[6]. *K. pneumoniae*의 cephalosporin 계에 대한 다제 내성을 나타낸다는 사실은 1980년대 초에 발견되었으며 그 후 점점 증가하는 추세이다. ESBL 생성균주에 대한 역학 조사는 이미 여러 연구에서 수행되었으며, 또한 광범위 내성 *K. pneumoniae* 균주의 감염과 집락화에 관여하는 몇몇 위험인자들에 대한 연구도 수행되고 있다[7]. 지금까지의 ESBL생성 *K. pneumoniae*의 검출에는 표현형적 특성을 이용하는 방법이 널리 이용되어 왔다[8]. 그러나 표현형적 방법을 이용한 검출은 많은 시간이 소요되며, 접종량이 정확하지 않으면 정확한 결과를 얻기가 힘들다. 또한, ESBL 매개 화학요법제 내성 유전자의 정확한 동정은 병원에서의 원내감염의 감시와 역학에 대단히 중요한 역할을 할 수 있다. 현재까지 알려진 장내세균 생성 ESBL의 유형은 40가지 이상으로 다양하다[9]. 유전형 검출 방법 중 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 분석 방법은 다른 균주로부터 ESBL 내성 *K. pneumoniae*의 균주 구별은 가능하나 이 방법은 기술적으로 어려우며, 많은 시간과 특수한 장비를 필요로 한다. PCR을 기초로 하는 다른 typing 방법으로 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석방법이 있으며, 이 방법은 PFGE 방법에 비해 신속하며, 실험 방법이 비교적 용이하다. 그러나 typing에 있어서 재현성, 분석력, 효율성에 관한 전반적인 조사는 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 이러한 방법들이 널리 이용되고 있기는 하나, ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 typing에 있어 분석력과 재현성에서 보다 우수한 방법을 확립하여야만 한다[10]. 본 연구에서는 ESBL 생성 *K. pneumoniae*균주를 대학병원으로부터 분리하여 combination disc 시험(CDT)을 실시하여 ESBL 생성 균주임을 확인하고 TEM, SHV, CTX유전자를 대상으로 multiplex PCR을 실시하여 ESBL 유전형을 검출하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2012년 2월부터 8월까지 대전, 충남, 충북지역의 대학병원에서 ESBL 생성 *K. pneumoniae*로 동정된 46개의 균주를 대상으로 하였다[Table 1].

2.2 Combination disc (CD)시험

세균 부유액을 Mueller-Hinton 한천(BD, Detroit, USA)에 고르게 접종한 후, 배지에 ceftazidime/clavulanic acid (CAZ/CLA) 또는 cefotaxime-clavulanic acid (CTX/CLA)에 대한 내성을 조사하였다. 이들 디스크 주위에 30 ㎍의 ceftaxidime (CAZ)와 cefotaxime (CTX) 디스크를 놓되, 디스크의 간격은 2 cm가 되도록 하였다. 접종 배지는 37℃ 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였다. CAZ와 CTX 억제제 보다 CAZ/CLA 또는 CTX/CLA 억제대가 5mm이상일 경우 ESBL 양성균주로 판정하였다[11].

2.3 균주로부터 DNA분리

순수 분리된 46개의 *K. pneumoniae* 균주를 TSB 배지(BD, Detroit, USA)를 이용하여 37℃에서 하루 동안 진탕배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 후 상등액은 버리고 침전물을 이용하여 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Califonia, USA)를 이용하여 제시한 방법에 따라 DNA를 추출하였다.

2.4 PCR을 위한 Primer합성

β-lactamase의 특성을 분석하기 위해 primer의 서열은 다음과 같이 제작하였다[Table 2].

[Table 1] Phenotypes and genotypes of ESBLs producing *K. pneumoniae* isolates from Daejeon, Chungnam and Chungbuk university hospitals

Strains	TEM/SHV/CTX type	CDT (CAZ+CAZ/CLA)	Strains	TEM/SHV/CTX type	CDT (CAZ+CAZ/CLA)
DJ1	TEM,CTX	+	CN24	TEM,SHV	+
DJ2	TEM	+	CN25	TEM,SHV	+
DJ3	TEM	+	CN26	TEM,SHV	+
DJ4	TEM,SHV,CTX	+	CN27	TEM,SHV,CTX	-
DJ5	TEM,SHV	+	CN28	TEM	+
DJ6	TEM,SHV	+	CN29	TEM,SHV	+
DJ7	TEM,CTX	+	CN30	TEM,SHV,CTX	+
DJ8	TEM,CTX	+	CN31	TEM,SHV,CTX	+
DJ9	TEM,CTX	-	CB32	TEM	+
DJ10	TEM	+	CB33	TEM,SHV	+
DJ11	TEM,SHV	+	CB34	TEMSHV	+
DJ12	TEM,SHV	+	CB35	TEM,SHV	+
DJ13	TEM,SHV	+	CB36	TEM,SHV	+
DJ14	TEM,SHV	+	CB37	TEM,SHV,CTX	+
DJ15	TEM,SHV	+	CB38	TEM,SHV	+
CN16	TEM,SHV	+	CB39	TEM,SHV,CTX	+
CN17	TEM,SHV	+	CB40	TEM,SHV	+
CN18	TEM,SHV	+	CB41	TEM,SHV,CTX	-
CN19	TEM,SHV	+	CB42	TEM,SHV,CTX	+
CN20	TEM,SHV	+	CB43	TEM,SHV,CTX	+
CN21	TEM,SHV	+	CB44	TEM,SHV	-
CN22	TEM,SHV,CTX	+	CB45	TEM,SHV	+
CN23	TEM,SHV	+	CB46	TEM,SHV	+

CDT, combination disc test; CAZ, ceftazidime; CAZ/CLA, ceftazidime-clavulanic acid

[Table 2] Primer sets for characterization of β -lactamases

Gene	Primer sequence	Size
TEM	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGT-3' 5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGA-3'	881
SHV	5'-CCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT-3' 5'-TAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	831
CTX-M	5'-GGACGTACAGCAAAAACTTGC-3' 5'-CGGTTCGCTTTCACTTTTCTT-3'	624

2.5 PCR을 이용한 ESBL유전자의 증폭

Multiplex PCR을 위한 PCR 혼합액은 dNTP(각기 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 ㎕, primer 10 pmol 각각 1 ㎕, genomic DNA(25 ㎍) 1 ㎕, Taq DNA polymerase (2 unit) 1 ㎕, 최종 반응액 20 ㎕가 되도록 하여 PCR을 수행하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer, Wellesley, USA)에서 94℃에서 1분간 변성, 50℃에서 1분간 냉각, 72℃에서 1분간 신장의 순서로 35회를 시행하고 72℃에서 최종적으로 10분간 신장하였다.

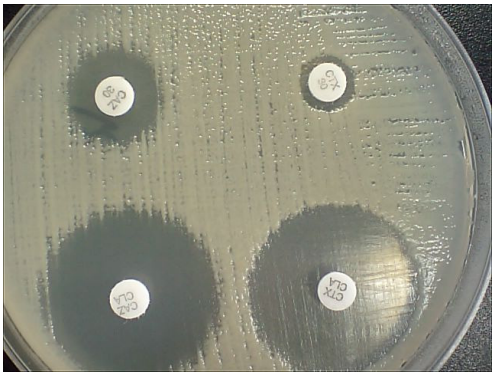
2.6 PCR산물의 확인

PCR 증폭산물은 2% agarose gel을 사용하여 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 70 volt, 100 mA로 1시간 전기영동한 후, ethidium bromide(0.5 ㎍/㎖)로 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색 후 UV transilluminator로 확인 후, polaroid 카메라로 사진 촬영하였다.

3. 결 과

3.1 Combination disk (CD) 시험

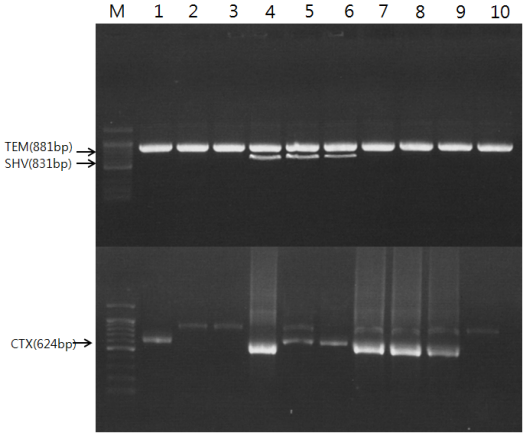
분리균주는 CTX, CAZ에 내성을 나타내어 ESBL 생성 *K. pneumoniae*로 의심되었다. ESBL 생성균주를 확정하기 위한 CDT 확인 시험에서 대전지역의 경우 DJ9, 충남지역의 경우 CN27, 충북지역의 경우 CB41, CB44균주가 음성으로 나타나 총 42균주가 ESBL 양성 균주로 판명되었다[Fig. 1].



[Fig. 1] Detection of ESBLs production of DJ9 strain in combination disc tests (CDT). CAZ,ceftaxidime; CAZ/CLA, ceftazidime/clavulanic acid; CTX, cefotaxime; CTX/CLA, Cefotaxime- clavulanic acid.

3.2 ESBL 유전형

ESBL 유전형 검출을 위한 PCR 결과 대전지역의 경우 TEM형 15균주(32.6%), SHV형 8균주(17.4%), CTX-M형 5균주(10.9%)로 나타났다. 충남지역의 경우 TEM형 16균주(34.7%), SHV형 15균주(32.6%), CTX-M형 4균주(8.7%)였으며, 충북지역의 경우 TEM형 15균주(32.6%), SHV형 14균주(30%), CTX-M형 5균주(10.9%)로 나타났다. 전체적으로 TEM형은 46균주(100%), SHV형은 37균주(80.4%), 그리고 CTX-M형은 14균주(30.4%)로 분류할 수 있었다[Fig. 2].



[Fig. 2] Electrophoresis of the amplified products of TEM, SHV, CTX genes. Lane M, 100-bp DNA ladder; lanes 1 to 10, Daejeon isolates.

4. 고 찰 및 결 론

최근 β-lactam 항균제 내성세균에 의한 감염의 증가는 중요한 문제로 대두되고 있다. 세균이 β-lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은 β-lactamase 생성, penicillin-binding protein의 변성, β-lactam 항균제의 세포막 투과성 저하, 세포 외로의 항균제 유출 등 다양하며, 장내세균은 흔히 β-lactamase 생성에 의하여 β-lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다.

임상에서 시행하는 항균제 감수성 검사는 균종의 약제별 breakpoint를 기준으로 감수성과 내성을 구분한다. 그러나 ESBL을 생성하는 균주는 cephalosporin과 monobactam 등을 가수분해하므로 이러한 균주는 carbapenem제나 cephamycin제를 제외한 모든 β-lactam제 내성균으로 간주해야 하나, 각 약제의 최소억제농도는 효소의 종류에 따라 다르기 때문에 디스크 확산법에서 내성을 보이지 않는 경우가 있다. 따라서 ESBL생성 균주 검출을 위한 정확하고 신속한 검사법이 필요하다[12]. ESBL 확인검사로는 Vitek ESBL시험, E-test, 이중 또는 3차원 디스크 확산법, 분자유전학적 방법 등이 있다[12]. 본 연구에서는 ESBL생성균주를 CD시험방법으로 확인한 후 유전형을 검출하였다.

TEM형은 1960년대 초에 그리스에서 Temoniera라는 패혈증 환자로부터 분리된 *K. pneumoniae*에서 처음으로 검출되어 보고되었으며 그 이름을 따서 TEM형으로 불리운다. SHV형은 1980년대에 독일에서 분리된 *K. ozaenae* 균주에서 처음 발견되었다[13]. ESBL유전형은 국가에 따라 다른 분포를 보이는데 프랑스와 미국에서는 TEM형, 그리스에는 SHV형이 많은 것으로 알려져 있다[14]. 본 연구에 사용된 *K. pneumoniae* 46균주 중 CD시험방법에 의해 42균주(91.3%)가 양성으로 4균주(8.7%)가 음성으로 나타났으나, PCR에 의한 유전형 검출에서는 46균주(100%)가 양성으로 나타났다. ESBL을 생성하는 균주의 경우 염색체성 AmpC β‐lactamase의 생성량에 따라서 CD시험결과가 결정된다. 염색체성 AmpC β‐lactamase의 생성량이 낮으면 clavulanic acid에 의한 ESBL활성 억제 효과가 발현되어 CD시험 양성결과를 보이지만 반대로 AmpC β‐lactamase생성량이 많으면 CD시험 음성결과를 보인다[9]. DJ9, CN27, CB41, CB44균주가 CD시험 음성으로 나타난 것은 AmpC β‐lactamase 생성량이 많기 때문인 것으로 추정된다. 본 연구에서는 TEM형 46균주(100%), SHV형 37균주(80%), CTX-M형 14균주(30%)로 나타났다. 이는 국내에서 분리되는 ESBL생성 장내세균 중 SHV형의 비율이 높다는 손 등[15]의 보고와는 다른 경향을 나타낸 것이다.

Multiplex PCR 방법을 이용한 ESBL생성 *K. pneumoniae* 의 typing 방법은 기술적인 어려움이나, 시간적인 소모 그리고 특수한 장비가 있어야 되는 다른 typing 방법들의 문제점을 보완하고, 분석력이나 재현성에 있어 우수한 방법이라 할 수 있다. 따라서 multiplex PCR을 이용한 ESBL 내성 유전자의 검출은 표현형적 방법에서의 문제점의 해결이나, 원내감염의 역학에 아주 유용한 방법이라 사료된다.

References

[1] Jacoby GA, Medeiros AA. More extend-spectrum-latamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:1697-1704, 1991.

[2] Heritage JP, Hawkey M, Todd NI, Lewis J. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extend-spectrum-latamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 1981-1986, 1992. DOI: http://dx.doi.org/10.1128/AAC.36.9.1981

[3] Kil KS, Darouiche RO, Hull RA, Mansouri MD, Musher DM. Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. *J Clin Microbiol,* 35:2370-2374, 1997.

[4] Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariani-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, Denamur E, Philippon A, Elion J. Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J Clin Microbiol*, 31:179-184, 1993.

[5] Galani I, Russell EG, Tymms M, Roper EJ, Grayson ML, Turnidge J. Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. *Clin Microbiol Infect*, 8:579-588, 2002. DOI: http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00391.x

[6] Gazouli M, Kaufmann ME, Tzelepi E, Dimopoulou H, Paniara O, Tzouvelekis LS. Study of an outbreak of cefoxitin-resistance *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Clin Microbiol,* 35:508-510, 1997.

[7] Macrae MB, Shannon KP, Rayner DM, Kaiser AM, Hoffman PN, French GL. A simultaneous outbreak on a neonatal unit of two strains of multiply antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* controllable only by ward closure. *J Hosp Infect,* 49:183-192, 2001. DOI: http://dx.doi.org/10.1053/jhin.2001.1066

[8] Monica C, Sonia MT, Alejandro P, Angeles BN, David D, Francisca V, Rosa M, German V. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol,* 42:42-49, 2004.

[9] Pnaiara E, Platouka H, Dimopoulou E, Tzelepi B, Miriagou, Tzouvelekis LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother,* 12:204-207, 2000.

[10] Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, Miranda G, Leanos B, Solorzano F, Echaniz G. Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol*, 39:3193-3196, 2001. DOI: http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.9.3193-3196.2001

[11] Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S9, Wayne, PA. 2001.

[12] Bedenic B, Randegger C, Boras A, Haechler H. Comparison of five different methods for detection of SHV extened-spectrum beta-lactamases. *J Chemother*, 13:24-33, 2001.

[13] Chin Fu Lin, Shin Kuang Hsu, Chao Hsien Chen, Jr Rung Huang, Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *J Med Microbiol,* 59:665-671, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.015818-0

[14] Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14:933-951, 2001.

[15] Son SH, Lee DJ, Kim CG, Kim JM, Bae HJ. Distribution *TEM*, *SHV* type *beta-lactamase* gene of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection*, 29:271-276, 1997.

양 병 선(Byoung-Seon Yang) **[정회원]**

- 1991년 2월 : 한남대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1997년 8월 : 한남대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 1996년 3월 ~ 현재 : 진주보건대학교 임상병리과 교수

<관심분야>
의생명과학

육 근 돌(Keun-Dol Yook) **[정회원]**

- 1999년 2월 : 충남대학교 보건대학원 (보건학 석사)
- 2011년 2월 : 한남대학교 대학원 미생물학과 (박사수료)
- 1990년 7월 ~ 2006년 2월 : 가톨릭의대대전성모병원 진단검사의학과 임상병리사 근무
- 2006년 3월 ~ 현재 : 대전보건대학교 조교수

<관심분야>
임상병리학 및 미생물학

박 진 숙(Jin-Sook Park) **[정회원]**

- 1989년 3월 : The University of Tokyo (미생물학 박사)
- 1989년 3월 ~ 1990년 2월 : 일본 미쓰비시생명과학연구소 연구원(post doc.)
- 1990년 3월 ~ 현재 : 한남대학교 생명공학과 교수
- 1994년 1월 ~ 현재 : 한국미생물학회, 평의원, 기획위원, 편집위원
- 2004년 1월 ~ 현재 : 한국생태학회 이사
- 2007년 6월 ~ 2008년 5월 : 국가과학기술위원회 전문위원

<관심분야>
미생물계통분류학, 환경미생물학