

한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 Extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징

단국대학교 의과대학 내과학교실, 미생물학교실*, 연세대학교 의과대학 임상병리학교실**,
서울대학교 의과대학 임상병리학교실***, 경북대학교 의과대학 미생물학교실****

배현주 · 김정민* · 권영미* · 이경원** · 정윤섭** · 김의종*** · 조동택****

= Abstract =

Characterization of Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Korea

Hyunjoo Pai, M.D., Jung Min Kim, M.D.* , Young Mi Kwon, M.D.*
Kyungwon Lee, M.D.**, Yunsop Chong, M.D.**, Eui Chong Kim, M.D.***
and Dong Taek Cho, M.D.****

Department of Internal Medicine, Microbiology*, Dankook University College of Medicine,

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine,**

Seoul National University College of Medicine***, Department of Microbiology,

Kyungpook National University School of Medicine****

Background : Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are plasmid-mediated enzymes that confer resistance to oxyimino- β -lactams such as cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam, antibiotics that were designed to be effective against strains producing known plasmid-determined β -lactamases.

Methods : Fifty seven isolates of ESBL producing *K. pneumoniae* which were collected from 3 hospitals in Korea were characterized. They either transferred ceftazidime resistance or showed clavulanic acid enhancement of oxyimino- β -lactam susceptibility. β -lactamase production by clinical isolates and transconjugants were characterized by isoelectric focusing and MIC values of oxyimino- β -lactam were determined by agar dilution method. We performed PCR and RFLP for further characterization of TEM-type ESBLs.

Results : The results showed that SHV-type ESBLs, especially SHV-5 and SHV-2 predominated, but TEM-4 and plasmid-mediated AmpC β -lactamases (pI 8.0 and pI 8.4) were present as well: SHV-5, 26; SHV-2, 12; TEM-4, 9; plasmid-mediated AmpC type β -lactamase (pI 8.0), 4; plasmid-mediated AmpC type β -lactamase (pI 8.4), 1. Two isolates produced both TEM-4 and SHV-5, which showed higher MIC₅₀ of cefotaxime, ceftazidime and aztreonam than those in the isolates producing TEM-4 or SHV-5. Three isolates produced both plasmid-mediated AmpC type β -lactamases and other ESBLs, each one of TEM-4, SHV-2 and SHV-5. All of the isolates showed high resistance to cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam.

Conclusion : With these results we conclude that SHV-type ESBLs outnumber and plasmid-mediated AmpC type β -lactamases are present in high frequency in Korea..

Key Words : Extended-spectrum β -lactamase, *K. pneumoniae*

서 론

β -lactam 항생제에 대한 여러 내성기전중 penicillin과 cephalosporin의 β -lactam ring을 분해하는 β -lactamase 생산이 가장 중요한 기전이다. Cephalothin을 비롯한 초기의 cephalosporin은 *Pseudomonas*, *Enterobacter* 및 다른 그램 음성 간균이 생산하는 chromosomal β -lactamase와 plasmid에 의해 매개되는 β -lactamase에 의해 쉽게 분해된다. 1세대 cephalosporin의 구조를 변경하여 plasmid-mediated β -lactamase에 분해되지 않는 cefotetan, cefoxitin 등의 cephamycin과 기존의 β -lactamase에 안정한 extended-spectrum β -lactam이 개발되었다. 그러나 1980년 중반, 유럽에서 extended-spectrum cephalosporin을 분해하는 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성균주가 처음 보고되었고 이후 세계적으로 그 수가 증가하고 있다^{1), 2)}. 또한 cephamycin계열의 cephalosporin과 extended-spectrum cephalosporin에 내성을 보이는 균주들이 한국을 비롯한 여러 나라에서 보고되었다. ESBL은 주로 *K. pneumoniae*를 비롯한 *Klebsiella* spp.와 *E. coli*에서 관찰되며 나라 및 지역에 따라 그 빈도가 달라, 미국에서 분리되는 *K. pneumoniae*와 *E. coli*의 1.3-8.6%가 ESBL을 생산하며 국내에서는 각각 7.5%, 22.8%의 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 ESBL 생성균주임이 보고되었다^{3), 4)}.

저자들은 서울과 천안에 위치한 세 병원에서 분리된 *K. pneumoniae*를 대상으로 ESBL 생성균의 빈도를 구하고 각 병원의 ESBL 유형을 파악하고자 이번 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

균주: 단국대학교병원의 환자 검체에서 분리된 40균주와 서울대학교병원의 환자 검체에서 분리된 50균주의 *K. pneumoniae*를 대상으로 ESBL 생성균주의 빈도를 구하였으며 여기서 ESBL로 판단된 20균주와 연세대학교 병원에서 분리되어 ESBL 생성균주로 판정된 37균주를 합한 총 57균주를 대상으로 ESBL 유형을 조사하였다.

항생제: 항생제 내성 검사를 위한 항생제의 원밀은 각각 cefoxitin과 imipenem은 중외제약, cefotaxime은 한미제약, ceftazidime은 Glaxo Wellcome, aztreonam은 동아 바이오테크에서 구하였다.

2. 방법

1) MIC (minimum inhibitory concentration)의 측정

항생제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards에 따라 평판 희석법으로 시행하였다⁵⁾. Trypticase soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI, USA)에서 37°C, 20시간 배양한 균 부유액을 생리식염수로 10배 희석하여 약 10^5 균을 Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) 평판 배지에 Steers 접종용구로 접종한 다음 37°C에서 16-20시간 배양후 접종부위에 균 발육유무를 보아 MIC를 판독하였다.

2) Double disk synergy test

Ceftazidime의 MIC가 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상인 균주를 대상으로 double disk synergy test를 시행하였다. 균주를 MacConkey 한천에 계대 배양하여 4-5개의 독립된 접락을 백금침으로 채취한 후 TSB에 접종하여 McFarland 제 0.5관의 탁도에 맞추었다. Mueller-Hinton agar 배지의 중앙에는 amoxicillin/clavulanic acid 디스크를, 주위에는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam 디스크 (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)를 2cm 간격으로 놓고 35°C 항온기에 18시간 배양후, 두 디스크 사이에서 상승작용을 나타내는 억제대의 양상을 보였을 때 양성으로 판정하였다^{6, 7)}.

3) 접합에 의한 내성 전달

피전달균 (recipient)으로 *E. coli* J53 Azi^r을 이용하였고 선택배지로는 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ sodium azide (Sigma, St Louis, MO, USA)와 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ceftazidime을 포함한 Trypticase soy agar plates를 이용하였다. 균주를 brain heart infusion broth (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 18시간 배양한 후 균액을 생리식염수로 공여균 (doner)은 1:40, 피전달균은 1:20으로 희석하였다. 피전달균의 희석액을 MHA plate에 바른 후 이어 공여균의 희석액을 접종하고 이를 37°C에서 18시간 배양하였다. 자란 균주를 위의 선택배지에 접종하고 24-48시간 배양한 후 자란 균을 동정하고 항생제 내성 검사를 하였다⁸⁾.

4) 플라스미드의 추출

플라스미드 DNA의 검색을 위해 Birnboim 및 Doly 방법을 약간 변경하여 실시하였다⁹⁾. 3ml의 TSB에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 후 배양액을 0.7ml 취하여 12,000rpm으로 2분간 원심하여 세포 침사를 얻었다. 이를 100 μL의 RNase가 포함된 lysozyme 용액 (2mg/mL lysozyme, 50mM dextrose, 10mM EDTA, 25mM Tris, RNase 1 mg/mL)에 부유시키고 30분간 반응시킨 후 200 μL의 alkali SDS 용액 (0.2 N NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 5분간 얼음에 냉각시켰다. 150 μL의 3 M sodium acetate (pH 4.8)를 첨가하고 60분간 얼음에 방치한 후 12,000rpm하에서 5분간 원심하여 상층액을 얻고 이를 에타놀 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% 에타놀로 세척하고 공기중에 건조시킨후 중류수에 용해하였다. 이를 0.7%의 아가로즈 겔에 전기영동하였다.

5) Isoelectric focusing (IEF)

(1) β -lactamase 추출

시험세균들을 5ml BHI broth에 접종후 37°C에서 18시간 진탕배양하였다. 이를 1000×g에서 15분간 원심 침전한 후 침전물을 모아 3차 증류수 750 μL에 부유하였다. 이를 ultrasonicicator (Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer, Chicago, IL, USA)를 이용하여 30초간 4번 sonication 하였다. 이를 원심 분리하여 상층액을 취한후 이를 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다^{10, 11)}.

(2) IEF

위에서 추출한 β -lactamase crude extract를 ampholine polyacrylamide gel (Ampholine precast gel pH 3.5~9.3, Pharmacia LKB, Piscataway, NJ, USA)에 Multiphor II system (Pharmacia LKB)을 이용하여 전기 영동하였다 (15 W, 50mA, 1500 V, 2시간 30분). 전기영동후 nitrocefin (0.5mg/L in phosphate buffer pH 7.0)(Becton Dickinson)에 적신 Whatman No. 54 paper를 겔 위에 덮어서 band를 관찰하였다^{10, 11)}. 표준으로 이용한 8개의 ESBL 생성 균주 (괄호안은 plasmid)는 다음과 같다: TEM-1 (pBR322), TEM-3 (pCFF04), TEM-4 (pUD16), SHV-1 (R1010), SHV-2 (pMG229), SHV-3 (pUD18), SHV-4 (pUD21), SHV-5 (pAFF2)⁸⁾.

6) TEM 효소 유전자의 연쇄중합반응 및 제한효소 절단 양상

Isoelectric focusing에서 pI 값이 TEM 효소 범위로 나타나는 균주들중 pI 값이 5.9인 β -lactamase를 생산하는 균주들은 subtype을 확인하기 위하여 연쇄중합반응을 시행한 후 제한 효소로 절단하여 그 양상을 관찰하였다¹²⁾.

(1) 연쇄중합반응

여러 TEM 효소 유전자에 공히 보존적인 염기서열을 이용하여 primer를 제작하였다. Primer는 Ts 5'-ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA-3', Tr 5'-GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC-3'로 예상되는 산물의 크기는 1080 bp 크기였다. 반응 조건은 10mM Tris-HCl (pH 7.4); 5.0 mM MgCl₂; 50mM KCl; 0.1% Triton X-100; 200 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0.5 μM primers Ts, Tr; 2.5 Unit Taq polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT, USA)였고 10 μL template DNA를 넣어 반응시켰다. 반응 혼합물을 94°C에서 30초, 45°C에서 90초, 그리고 72°C에서 60초로 thermal cycler (Perkin- Elmer-Cetus)를 이용하여 35회 중합하였다. 중합산물 10 μL를 0.75 μL의 ethidium bromide를 포함하는 1% agarose gel에 전기영동한 후 자외선하에서 관찰하였다¹³⁾.

(2) 제한효소 절단 양상

여러가지 TEM 효소들의 알려진 염기서열을 이용하여 같은 pI 값을 보이는 효소들을 구분하였다. 대상 균주중 TEM 효소를 생산하는 균주들이 pI 5.4외에 모두 5.9를 보였으므로 pI 값이 5.9인 TEM-4, TEM-6, TEM-8과 TEM-17을 구분하였다. Arlet 등의 보고대로 TEM-1의 아미노산 서열상 236번째 아미노산인 glycine에서 serine으로의 변화를 보기위해서는 HpaII (Promega, Madison, WI, USA)으로 절단하였고 162번째 아미노산인 arginine에서 histidine으로의 변화는 Bcl1 (Promega)으로, serine으로의 변화는 Sau3A1 (Promega)으로 절단하였다. 또한 37번째 아미노산인 glutamine에서 lysine으로의 변화는 Sau3A1으로 절단하여 확인하였다¹²⁾. 그러나 Alert 등이 연쇄중합반응에 사용한 primer들과 저자들이 사용한 primer가 달랐으므로 저자들의 primers로 연쇄중합반응하여 제한 효소로 절단시는 다음과 같은 크기의 절단 양상이 나올 것으로 예측되었다

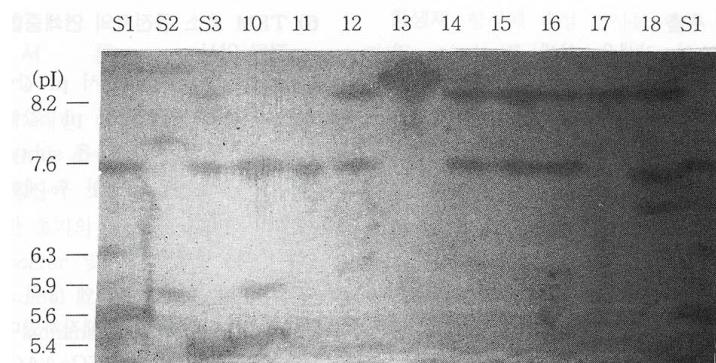


Fig. 1. Isoelectric focusing of β -lactamases. Preparation from the following strains were focused: S1, SHV-2(pMIG 229)+TEM-3(pCFF04)+TEM-2; S2, SHV-4(pUD21)+TEM-4(pUD-16); S3, SHV-5(pAFF2); Lane 4-12(10-18), Y10-18(clinical isolates).

(DNAsis program, Hitachi).

- (1) *HpaII* 절단: TEM-4, TEM-8 → 472, 242, 189, 110, 67
TEM-1, TEM-6, TEM-17
→ 472, 242, 155, 110, 67, 34
- (2) *Bcl I* 절단: TEM-1, 4, 8, 17 → 1080
TEM-6: 387, 693
- (3) *Sau3AI* 절단: TEM-1, TEM-4, TEM-6,
TEM-17 → 341, 319, 258,
46, 45, 36, 18, 17
TEM-8 → 359, 355, 258,
46, 45, 17

위의 3가지 효소로 pI 5.9를 보이는 TEM의 구별을 시도하였다. 제한효소 절단은 효소의 특성에 따른 제작자의 권고대로 시행하였고 연쇄중합반응 산물은

정제하지 않고 그대로 사용하였다. 제한효소로 절단후 이를 예상되는 크기에 따라 1-2%의 아가로즈 겔에 전기영동한후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 관찰하였다.

결 과

ESBL의 정의는 double disk synergy test에서 양성으로 판정되었거나 double disk synergy test에서 음성이라도 접합에 의해 내성이 전달된 경우 ESBL로 판정하였다⁸⁾.

1. ESBL 생산균주의 비율

단국대학교병원과 서울대학교병원에서 분리된 총 90균주의 *K. pneumoniae* 중 20균주가 ESBL을 생산하여 비율은 22%였다. 이중 서울대학교병원에서 분리된 균주가 15 균주로 총 50균주 중 ESBL 생산균주의 비율은 30%였고, 단국대학교병원에서 분리된 균주는 5균주로 ESBL 생산균주의 비율은 총 40균주 중 12.5%였다.

2. ESBL의 분포

단국대학교병원과 서울대학교병원에서 분리된 ESBL 생산균주 20균주와 연세대학교병원에서 분리된 ESBL 생산균주 37균주를 합한 57균주를 대상으로 isoelectric focusing과 PCR & RFLP를 이용하여 ESBL의 아형을 결정하였다 (Fig. 1, Fig. 2). 결과, 우리나라에서 분리되는 ESBL은 SHV-5, SHV-2,



Fig. 2. Digestion with *HpaII* of PCR products of TEM-1(pBR322) and clinical isolates. Lane 1, molecular weight marker(λ *Hind* III); Lane 2, TEM-1; Lane 3-8, clinical isolates.

Table 1. 우리나라 3개 대학병원에서 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 ESBL 아형의 분포

ESBL 아형	pI 값	동정 균주
SHV-5	8.2	26
SHV-2	7.6	12
TEM-4	5.9	9
TEM-4 + SHV-5	5.9, 8.2	2
AmpC type	8.0	4
AmpC type	8.4	1
TEM-4 + AmpC type	5.9, 8.0	1
SHV-2 + AmpC type	7.6, 8.0	1
SHV-5 + AmpC type	8.2, 8.0	1
합 계		57

TEM-4, pI 8.0을 보이는 plasmid-mediated Amp C type β -lactamase 등이었고 ESBL을 2개 이상 생산하는 균주도 여러 균주 있었다 (Table 1). 총 57 균주중 TEM-4를 생산하는 균주가 9균주였고 TEM-4와 SHV-5를 같이 생산하는 균주가 2균주 있었다. SHV-type 효소중에는 SHV-5를 생성하는 균주가 26 균주로 가장 많았고 SHV-2를 생성하는 균주가 12균주 있었다. SHV-5를 생성하는 26균주중 19균주가 접합에 의해 내성이 전이되었는데 비해 7개의 균주에서는 접합에 의한 내성 전달이 되지 않았다. 그러나 두 균간의 pI값 및 여러 항생제의 MIC값은 거의 같았다. TEM 및 SHV-type ESBL외에 pI 8.0의 AmpC type β -lactamase가 4균주에서 발견되었고 한 균주에서는 pI 8.4를 보이는 AmpC type β -lactamase가 발견되었다. pI 8.0의 AmpC type β -lactamase와 TEM 혹은 SHV-type ESBL을 동시에 생성하는 균주가 세 균주에서 발견되었는데 각각 SHV-5, SHV-2 및 TEM-4였다. 위의 결과로 우리나라에는 ESBL중 SHV-type이 가장 많으며 그중 SHV-5와 SHV-2가 주된 형별임을 알 수 있었다. 또한 TEM-type중에서는 TEM-4가 주된 형별임을 알 수 있었다.

3. Plasmid-mediated AmpC type β -lactamase pI 8.0

기존의 TEM & SHV-type ESBL에 안정한 것으로 알려진 cephamycin계열의 cefoxitin에 내성을 보이는 균주가 9균주 있었는데 이중 4개의 균주는 AmpC type β -lactamase pI 8.0만을 생산하였고 chromosomal SHV-1 β -lactamase도 없었으며 접

합에 의해 내성이 전달되었다. 세 개의 균주는 AmpC type β -lactamase pI 8.0과 함께 각각 TEM-4, SHV-5 및 SHV-2 ESBL을 동시에 생성하였다. 또한 한 균주에서는 pI 8.4를 보이는 AmpC type β -lactamase가 발견되었고 이는 플라스미드에 의해 내성이 전달되었다. 이 효소는 좀더 규명이 필요하겠다. 한 균주는 MIC, 플라스미드 양상 및 β -lactamase의 pI 값이 비슷하였으나 접합에 의해 내성 전달이 되지 않아서 저자들이 정의한 ESBL 기준에 적합하지 못하여 이번 ESBL 균주에는 포함시키지 않았다. 이들이 생성하는 β -lactamase는 모두 clavulanic acid에 의해 억제되지 않았으며 isoelectric focusing상 1개를 제외한 7개의 균주에서 모두 pI 8.0을 보여주었다. 다른 한 균주는 TEM-4와 TEM-1 ESBL을 생산하였으나 pI 8.0을 비롯한 다른 β -lactamase를 생산하지 않았고 특징적으로 imipenem을 비롯한 여러 항생제에 내성을 보였다. 따라서 이 균주는 TEM-4에 의한 내성외에도 β -lactamase가 아닌, 세포막의 항생제 투과 기전의 변형등에 의해 내성이 유래된 것으로 생각하였다⁸⁾.

4. ESBL 아형에 따른 Cefoxitin, Cefotaxime, Ceftazidime 및 Aztreonam의 MIC 양상

ESBL 아형에 따른 cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam의 MIC 양상을 비교하기 위해 ESBL 아형에 따라 균을 나누어 각 균들의 MIC 중간값인 MIC₅₀을 구하였다. 결과 각각의 ESBL 아형에 따라 cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam의 MIC가 특이한 양상을 보였다(Table 2). TEM-4를 생산하는 균주들은 cefota-

Table 2. ESBL 아형에 따른 cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam의 MIC₅₀ 양상

ESBL 아형	MIC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	FOX*	CTX	CTZ	ATM	IMP
SHV-5	8	32	256	512	<1
SHV-2	8	16	8	4	<1
TEM-4	8	64	16	32	<1
AmpC type β -lactamase pI8.0	256	16	4	1	<1
SHV-5 + TEM-4	12	64	256	512	<1
AmpC type + TEM-4**	512	128	128	512	<1
AmpC type + SHV-2**	512	256	32	8	<1
AmpC type + SHV-5**	64	64	512	512	<1

*: FOX=cefoxitin, CTX=cefotaxime, CTZ=ceftazidime, ATM=aztreonam, IMP=imipenem

**: MIC value, not MIC₅₀

xime, ceftazidime, aztreonam의 MIC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)이 각각 64, 16, 16으로 cefotaxime의 MIC가 ceftazidime에 비해 높았고 SHV-2를 생성하는 균주들도 16, 8, 4로 비슷한 양상을 보여주었다. 그러나 SHV-5를 생성하는 균주들은 일반적으로 내성의 수준이 높으면서 특징적으로 cefotaxime에 비해 ceftazidime 및 aztreonam에 대해 훨씬 높은 MIC를 보여주어 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam의 MIC₅₀은 각각 32, 256, 512였다. TEM-4와 SHV-5를 동시에 생산하는 균주가 2균주 있었는데 이들의 MIC₅₀은 SHV-5와 유사하였다. 기존의 TEM과 SHV-type ESBL외에 plasmid-mediated AmpC type β -lactamase pI 8.0을 생성하는 균주들에 대한 cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam의 MIC₅₀은 각각 256, 16, 4, 1으로 특징적으로 cefoxitin의 MIC가 높았으며 ceftazidime, aztreonam에 비해 cefotaxime의 MIC가 높았다. AmpC type β -lactamase와 각각 TEM-4, SHV-2, SHV-5를 동시에 생산하는 균주들의 MIC는 모두 각각의 효소를 단독으로 생산하는 균주에 비해 각 항생제에 대한 내성 수준이 증가하는 것을 보여주었다 (Table 2).

5. 각 병원에 따른 ESBL 아형의 분포

각 병원별로 ESBL 아형의 분포가 달랐는데 단국대학병원은 ESBL 생성 균주의 비율이 낮아 그 수가 적으나 다른 병원과는 달리 SHV-5 아형이 발견되지 않았고 총 5균주중 SHV-2 생성 균주가 3균주로 가장 많았으며 TEM-4와 AmpC type β -lactamase

pI 8.0을 내는 균주가 각각 1균주씩 있었다. 서울대학교병원에서는 SHV-5를 생성하는 균주가 9균주로 가장 많았고 그외에 TEM-4가 2균주에서, SHV-2가 3균주에서 그리고 TEM-4+AmpC type β -lactamase가 1균주에서 발견되었다. 균주수가 가장 많았던 연세대학교병원의 경우 SHV-5가 17균주에서, SHV-5+TEM-4가 2균주에서, SHV-5+AmpC type β -lactamase가 1균주에서, SHV-2가 5균주에서, SHV-2+AmpC type β -lactamase가 1균주에서 그리고 AmpC type β -lactamase가 3균주에서 발견되었다. 또한 한 균주는 pH값이 8.4인 아직 확인되지 않은 AmpC type β -lactamase를 생산하였다. 단국대학교병원과 서울대학교병원은 균주수가 적어 좀 더 많은 균을 대상으로 한 연구가 필요하지만 단국대학교병원에서는 SHV-2가, 서울대학교병원에서는 SHV-5가 많으며, 연세대학교병원에서는 특징적으로 SHV-5와 AmpC type β -lactamase를 생성하는 균주가 혼하면서 여러 ESBL을 같이 생산하는 고도내성균이 혼한 것으로 사료되었다.

고 찰

ESBL은 cefotaxime, ceftazidime을 비롯한 oxyimino- β -lactam항생제와 aztreonam을 분해하여 내성을 일으키는 효소로서 기존의 penicillin제제와 1세대 cephalosporin에도 내성을 보인다. 이러한 ESBL은 크게 둘로 나누면 TEM 및 SHV-type의 ESBL과 TEM 및 SHV-type이 아닌 ESBL로 나눌 수 있다¹⁴⁾. TEM 및 SHV-type 효소들은 흔히 발견

되는 plasmid-mediated β -lactamase (TEM-1 & SHV-1) 유전자의 변이(mutation)에 의해 발생하며 현재까지 30종 이상이 발견되었다¹⁴⁾. TEM 및 SHV-type ESBL은 cephamicin과 imipenem은 분해하지 못하며 특징적으로 clavulanic acid, sulbac-tam 및 tazobactam 등의 β -lactamase inhibitor에 의해 억제된다^{6, 7)}. TEM 및 SHV-type이 아닌 ESBL중 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 발견되는 plasmid-mediated AmpC type ESBL은 그람음성 간균에 존재하는 chromosomal AmpC 유전자가 플라스미드에 옮겨져서 발생되었을 것으로 생각된다. 이러한 AmpC 타입의 ESBL은 oxyimino-cephalosporin 외에 cefoxitin 등 cephamicin에도 내성을 일으키며 β -lactamase inhibitor에 의해 억제되지 않는다¹⁵⁾.

TEM 및 SHV-type ESBL들은 위에서 언급한대로 그람음성 간균에서 흔히 발견되는 plasmid-mediated TEM-1 및 SHV-1 효소 유전자에서 point mutation으로 인해 1개에서 4개의 아미노산 변이가 일어난다²⁾. 이러한 몇 개의 아미노산 변이가 기질 및 용해능에 커다란 차이를 일으키는 것은 변이가 일어나는 아미노산들이 효소의 활성에 매우 중요한 활동 부위 (catalytic site)에 모여 있기 때문이다¹⁶⁾. 최근 X-ray crystallography로 β -lactamase의 3차 구조를 분석한 결과 Ser-70을 포함하는 H2 α -helix 와 162에서 179 아미노산 부위가 형성하는 omega loop 및 233에서 249 아미노산 부위의 β 3- β 4 sheet가 형성하는 hole이 주된 효소의 활동 부위임이 밝혀졌고, β -lactam은 Ser-70근처의 hole 기저에 부착하는 것으로 알려졌다. 변이 부위가 효소의 활동 부위인 보존적 아미노산 Ser-70, Lys-73, Arg-164, Glu-166, Asp-179, Lys-234, Gly-236 및 Arg-244 근처에 근접하여 있어서 활동 부위의 전하를 변화시키고 효소 활동 부위의 3차 구조를 변형시켜 기질의 변화를 일으킨다¹⁶⁾.

TEM 및 SHV-type의 ESBL이 일으키는 내성 정도는 매우 다양하여 어떤 효소들은 모든 oxyimino- β -lactam에 매우 높은 내성을 일으키는데 비해 어떤 ESBL들은 일부의 항생제에만 매우 낮은 내성을 일으킨다. 후자의 경우 임상 미생물 검사실에서 일반적으로 사용하는 디스크 확산법에 의한 감수성 검사로 검출하지 못하는 경우가 많다^{8, 14)}. 디스크 확산법에 주로

많이 이용하는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam의 디스크들은 모두 30 μ g 디스크를 이용하는데 이들을 이용하는 경우 ESBL 생성 *K. pneumoniae*와 *E. coli*에서 10%-35%까지 감수성이 있는 것으로 판독되었다⁸⁾. 그러나 in vitro에서 낮은 내성을 보이는 균들도 MIC 측정시 접종균 수를 증가시키면 MIC가 대단히 높아지는 것을 볼 수 있으며¹⁴⁾ 이들 균으로 감염된 환자에서 3세대 cephalosporin을 사용할 경우 치료 실패율이 높다고 보고되었다^{17, 18)}. 따라서 임상 검사실에서 ESBL 생성 균주를 제대로 찾아내는 것은 대단히 중요하겠다. ESBL 검출의 예민도 (sensitivity)을 높이기 위한 방법으로는 MIC의 경우 breakpoint 값을 낮추어, 예를 들면 ceftazidime 2 μ g/mL 이상의 MIC를 보이는 균주들을 double disk synergy test나 E-test로 확인하는 방법이 있겠다. 그러나 일부의 보고를 보면 ESBL의 아형에 따라 E-test의 민감도가 달라 TEM-type효소들은 E-test로 잘 발견되는데 비해 SHV-type효소들은 감수성이 낮은 것으로 보고되었다¹⁹⁾. 그러나 임상 미생물 검사실에서 모든 균주의 MIC를 측정할 수는 없으므로 Jacoby 등은 기존의 ceftazidime 30 μ g 디스크 대신 ceftazidime 5 μ g 디스크를 사용할 것을 주장하였다⁸⁾. 그러나 이 디스크는 현재 국내에서는 사용되지 않는다.

본 연구에서 각각의 ESBL type을 결정하기 위해 이용한 방법은 isoelectric focusing과 연쇄중합반응 (PCR) 방법인데 (TEM의 경우는 제한효소절단양상 포함), isoelectric focusing상 SHV-type은 아형에 따라 뚜렷한 pI의 차이를 보여 pI 값을 측정하는 것이 용이하다. 그러나 이러한 방법으로는 같은 pI값을 가지나 유전자에 차이를 보이는 새로운 유전자를 구별하지 못 할 수 있고, 무엇보다도 pI 7.6의 SHV-2는 같은 pI값을 보이는 SHV-6, SHV-7과는 구별이 어렵다²⁰⁾. 그러나 우리 균주들은 MIC 양상이 SHV-2와 가장 비슷하였다. 또한 SHV-type 효소의 아미노산 서열을 보면 SHV-1에서 하나의 아미노산의 변이로 SHV-2가 생기고 SHV-2에서 하나의 아미노산의 변이에 의해 SHV-5와 SHV-3가 생긴다. 따라서 국내의 SHV-type 효소들이 SHV-2와 SHV-5가 주로 분포하는 것은 SHV-type 효소들의 상관관계상 가능한 것으로 생각되었다²¹⁾. 이를 확인하기 위해서는 염기서열의 분석이 필요할 것으로 생각된다. 연쇄중합반

용 방법은 *K. pneumoniae*의 경우 chromosomal SHV-type 효소를 가지고 있으므로¹⁴⁾ wild strain은 PCR 방법으로 중합산물을 보여도 이것이 plasmid-mediated 효소인지 chromosomal 효소인지 구별이 안간다. 따라서 본 연구에서는 접합을 시행한 일부균들에 대해서는 피전달균을 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였고 모두 중합산물을 얻을 수 있었다(data not shown). TEM-type의 경우는 좀더 복잡하여 같은 pI 값을 갖는 다른 TEM 효소들이 혼히 있고 계속하여 새로운 효소들이 보고되고 있어 isoelectric focusing으로는 효소의 종류를 구별하기 어렵다. 따라서 저자들은 이미 알려진 보고대로 PCR과 RFLP를 시행하였고 본 연구의 ESBL이 TEM-4임을 확인하였다¹²⁾. 그러나 이 역시 유전자의 염기서열을 확인하여야 효소의 아형을 확증할 수 있겠다.

TEM 및 SHV-type이 아닌 ESBL중 *E. coli*, *K. pneumoniae*에서 분리되는 plasmid-mediated AmpC type ESBL로는 CMY-1, CMY-2, MOX-1, FOX-1, MIR-1, BIL-1, LAT-1 등이 있는데 이들의 아미노산 서열을 비교하면 CMY-2, BIL-1 등은 *C. freundii*의 chromosomal AmpC와 94.2%에서 95.8%가 동일하고, MIR-1은 *Enterobacter cloacae*의 chromosomal AmpC와 90% 정도가 같아 아마도 그람음성 간균의 chromosomal AmpC 유전자가 플라스미드로 옮겨졌을 것으로 생각된다^{15, 22-26)}. CMY-1, MOX-1 및 FOX-1은 서로 비슷한 염기서열을 보이지만 아직 유사한 chromosomal AmpC 효소는 발견되지 않았고 그중 *Pseudomonas aeruginosa*의 AmpC 효소와 가장 유사하여 약 57%의 동일성을 보인다¹⁵⁾. 현재까지 이러한 plasmid-mediated AmpC type 효소들은 비교적 혼하지 않은 것으로 보고되었다. 그러나 저자들의 결과를 보면 AmpC type 효소들이 비교적 자주 발견되는 것을 알 수 있는데 이것은 매우 특징적인 소견이라고 할 수 있겠다. 이와 비슷한 보고로는 1996년 Jacoby 등이 미국의 15개 병원에서 수집한 ESBL 생성균들을 대상으로 검사하였을 때 ESBL균중 약 30%가 cefoxitin에 내성을 보였고 이중 반수 가량이 plasmid 매개성인 것으로 보아 약 15%의 균주가 plasmid-mediated AmpC type 효소이고 나머지는 아마도 porin의 변화에 의한 막투과성 감소가 중요한 기전일 것으로 보고하였다⁸⁾. 본 연구에서 관찰된 plasmid-mediated AmpC type

효소들도 아직 확실히 규명되지 않았으나 isoelectric focusing에서 pI 8.0의 β -lactamase를 보이고 pI 8.0의 β -lactamase를 단독으로 가지고 있던 네 균주 중 세 균주가 내성의 전달을 보인 점으로 보아 예전에 한국에서 분리된 바 있는 CMY-1와 같은 형일 것으로 생각된다¹⁵⁾.

최근 ESBL 생성 균주들에 의한 병원 감염이 계속 보고되고 있고 국내에서도 이러한 병원 감염의 예가 있었다²⁸⁻³¹⁾. 아직까지 국내에서는 이러한 보고가 적으나 분리된 균주중 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 비율이 대단히 높고, 수가 적기는 하나 본 연구에 포함된 3개 병원의 ESBL 분포 양상은 병원마다 우세한 ESBL이 존재함을 보여주어, 국내 병원에서 ESBL 유전자를 포함하는 플라스미드의 균주간 전이가 혼히 발생하는 것을 제시하였다²⁹⁻³¹⁾. 또한 저자들이 플라스미드 양상을 분석한 결과 병원에 따라 비슷한 양상을 보여서 위의 사실을 더욱 지지하였다(data not shown). 병원내 ESBL 생성균의 증가는 3세대 cephalosporin의 사용이 selective pressure로 작용하는 것은 이미 알려져 있고^{17, 18, 29, 30)} 3세대 cephalosporin의 제한으로 ESBL균의 증가를 억제한 예가 보고된 바 있다³²⁾. 따라서 원내 ESBL생성 균주의 증가를 억제하기 위해서는 3세대 cephalosporin의 사용을 제한하고 이러한 세균에 감염되었거나 정착화된 환자들의 엄격한 격리가 필요할 것으로 사료되었다.

ESBL은 임상적으로 매우 심각한 문제를 야기하고 있으나 ESBL 생성균주의 감염증 치료에 대한 전향적 임상 연구는 현재까지 거의 보고된 바 없다. 현재까지 발표된 것은 대부분이 증례 보고나 병원 감염으로 생긴 가벼운 감염들이 대상이어서 이에 대한 잘 설계된 전향적 연구가 필요한 실정이다^{17, 18, 22)}. In vitro에서는 감수성을 보이는 cephamycin의 경우 치료 실패 예가 보고되어 있다²²⁾. β -lactamase inhibitor 병합제제중에서는 piperacillin-tazobactam이 clavulanic acid나 sulbactam보다는 비교적 활성이 강한 것으로 알려져 있고³³⁾, 토끼-심내막염 모델상 TEM-3 ESBL 생성 *K. pneumoniae*에 piperacillin-tazobactam이 유용하다는 보고도 있었다³⁴⁾. 그러나 일부의 보고에는 piperacillin-tazobactam이 SHV-type ESBL의 내성을 극복하지 못한다고 하였다^{34, 35)}. 따라서 현재까지로는 요로감염을 제외하고는 ESBL생성

그럼 음성 간균의 치료에는 carbapenem이 선택약제이며 다른 약제에 대해서는 좀더 연구가 필요하다.

본 연구로 국내에 주로 분포하는 ESBL이 SHV-type, 그중 SHV-5가 가장 우세하며 SHV-2와 TEM-4도 고르게 분포하는 것으로 생각되었다. 또한 특징적으로 plasmid-mediated AmpC type β -lactamase가 비교적 높은 빈도로 분포하였다. 그러나 본 연구에 사용된 균주들이 주로는 연세대학교병원에서 동정된 균주이고 서울대학교병원과 단국대학교병원 균주들은 균주수도 적을 뿐 아니라 단기간에 수집된 것이라서 이 결과로 어느 균주가 우세하다고 단정하기에는 이르다. 따라서 좀더 오랜 기간에 걸쳐 수집된 많은 수의 균주를 대상으로 한 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

목 적: 국내에서 분리되는 *K. pneumoniae*에서 extended-spectrum β -lactamase의 생성균의 빈도를 구하고 각 병원의 ESBL 아형을 분석하고자 본 연구를 수행하였다.

방 법: ESBL 생성 균주는 double disk synergy test에서 clavulanic acid에 의해 억제대의 양상을 보이거나 접합에 의해 ceftazidime 내성이 전달되는 균주로 정의하였다. 각 항생제의 MIC는 agar dilution 방법을 이용하였고 ESBL 아형의 결정은 isoelectric focusing과 TEM-type 효소의 경우는 PCR과 RFLP 방법으로 수행하였다.

결 과:

1) 국내 2개 대학병원에서 분리된 90균주의 *K. pneumoniae* 중 20균주가 ESBL을 생산하여 비율은 22%였다. 이중 서울대학교병원은 50균주 중 15균주로 ESBL 생산균주의 비율은 30%였고 단국대학교병원은 40균주 중 5균주로 12.5%였다.

2) 국내 3개 대학병원에서 분리된 ESBL 생성 57균주의 ESBL 아형의 분포는 SHV-5가 26개로 가장 많았고 SHV-2가 12개, TEM-4는 9개였다. Plasmid-mediated AmpC type ESBL이 5균주에서 발견되었고 이중 4주의 β -lactamase는 pI 8.0을 보였고 1개는 pI 8.4를 보였다. 5개의 균주들은 2가지의 ESBL을 생산하였는데 2균주가 TEM-4+SHV-5를 생산하였고, 각각 TEM-4+AmpC type,

SHV-2+AmpC type, SHV-5+AmpC type을 생산하는 균주가 1균주씩 있었다.

3) 각각 ESBL의 아형을 생산하는 균주에 따라 cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam의 MIC는 특정적인 양상을 보여 SHV-5를 생산하는 균주가 SHV-2나 TEM-4를 생산하는 균주보다 내성이 강하였고 AmpC type을 내는 균주들은 cefoxitin에 강한 내성을 보이면서 cefotaxime에 비교적 높은 내성을 보였다. 두 가지의 ESBL들을 같이 생산하는 균들은 한가지를 생산하는 균주에 비해 높은 내성을 보여주었다.

4) 각 병원별로 ESBL의 양상이 달라 서울대학교 병원에서는 SHV-5가 가장 흔하였고 단국대학교병원에서는 SHV-2가 많았다. 연세대학교병원에서는 SHV-5와 특징적으로 plasmid-mediated AmpC type 효소가 비교적 흔하면서 2개의 ESBL을 생산하는 고도 내성균도 관찰되었다.

결 론: 위의 결과로 국내에서 분리되는 *K. pneumoniae*에는 SHV-type ESBL이 가장 흔하며 특징적으로 plasmid-mediated AmpC type β -lactamase가 비교적 흔하게 존재함을 확인하였다.

감사의 글

Extended-spectrum β -lactamase의 표준균주를 주신 George A Jacoby와 피전달균을 주시고 많은 조언을 해주신 배직현 선생님께 감사드립니다.

REFERENCES

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S : Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marscencens*. *Infection* 11:315-317, 1983
- 2) Philippon A, Labia R, Jacoby G : Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1131-1136, 1989
- 3) Jones RN, Kehrberg EN, Erwin ME, Anderson SC : Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States. I. Study on the threat of emerging resistance: real or perceived? *Diagn Microbiol Infect Dis* 19:203-215, 1994

- 4) 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현 : Extended broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli* 와 *Klebsiella pneumoniae*. *감염* 26:341-348, 1994
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilutional antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A2*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. 1992
- 6) Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A : Extended broad-spectrum β -lactamase conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867-878, 1988
- 7) Fantin B, Pangon B, Potel G, et al.: Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone in vitro and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2-like β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 581-586, 1990
- 8) Jacoby GA, Han P: Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 34:908-911, 1996
- 9) Birnboim HL, J. Doly :A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523, 1979
- 10) Matthew M, A.M. Harris, M.J. Marshall, G.W. Ross :The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol* 88:169-178, 1975
- 11) Medeiros AA, M. Cohenford, Jacoby GA :Five novel plasmid-determined β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 27:715-719, 1985
- 12) Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A :Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Letters* 134:203-208, 1995
- 13) Mabilat C, Courvalin P: Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2210-2216, 1990
- 14) Livermore DM : β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557-584, 1995
- 15) Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y: Comparative characterization of the cephemycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1926-1930, 1996
- 16) Knox JR: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2593-2601, 1995
- 17) Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ: Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* 119:353-358, 1993
- 18) Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 2:302-306, 1987
- 19) Philippon A, Arlet G, Lagrange PH: Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (Suppl 1):17-29, 1994
- 20) Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K: SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 39:899-905, 1995
- 21) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA :A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211-1233, 1995
- 22) Pangon B, Bizet C, Bure A, et al.: In vivo selection of a cephemycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 β -lactamase. *J Infect Dis* 159:1005-1006, 1989
- 23) Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H: Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephemycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40:221-224, 1996
- 24) Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Mentis AF : Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (bla LAT-1) found in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2207-2209, 1994
- 25) Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Wacharotayankun R, Ito H, Kato N :Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed blaMOX-1 gene encoding AmpC-type β -lactamase. *Gene* 139:93-98, 1994
- 26) Fosberry AP, Payne DJ, Lawlor EJ, Hodgson JE : Cloning and sequence analysis of blaBIL-1, a

- plasmid-mediated class C β -lactamase gene in Escherichia coli BS.* *Antimicrob Agents Chemother* 38:1182-1185, 1994
- 27) Gold HS, Mollering RC : *Antimicrobial-drug resistance.* *N Engl J Med* 335:1445-1453, 1996
- 28) 정석훈, 서설송, 신희봉, 이경원, 정윤섭, 권오현, 고신옥: *Extended-spectrum β -lactamase생성 Klebsiella pneumoniae*감염의 pulsed-field gel electrophoresis를 이용한 역학적 분석. *감염* 28:405-412, 1996
- 29) Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, et al. : *Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility.* *Antimicrob Agents Chemother* 34:2193-2199, 1990
- 30) Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, et al. : *Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients.* *Antimicrob Agents Chemother* 36:1991-1996, 1992 [Erratum, *Antimicrob Agents Chemother* 37:375, 1993]
- 31) Sader HS, Pfaller MA, Jones RN : *Prevalence of important pathogens and the antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States. II. Study of the intra- and interlaboratory dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae.* *Diagn Microbiol Infect Dis* 20:203-208, 1994
- 32) Pena C, Pujol M, Ardanuy C, et al. : *Impact of third-generation cephalosporins restriction on the control of an extended-spectrum beta-lactamases producing Klebsiella pneumoniae outbreak in ICU.* *abstr. J25. In Program and abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society of Microbiology, New Orleans.
- 33) Jacoby GA, Medeiros AA : *More extended-spectrum β -lactamases.* *Antimicrob Agents Chemother* 35:1697-1704, 1991
- 34) Leleu G, Kitzis MD, Vallois JM, Gutman L, Decazes JM : *Different ratios of the piperacillin-tazobactam combination for the treatment of experimental meningitis due to Klebsiella pneumoniae producing the TEM-3 extended-spectrum β -lactamase.* *Antimicrob Agents Chemother* 38:195-199, 1994
- 35) Bauernfiend A : *Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by Escherichia coli and Klebsiella with plasmidic resistance to third-generation cephalosporins.* *Infection* 18:48-52, 1990