

*Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 TEM 및 SHV Type Beta-lactamase 유전자의 분포

단국대학교 의과대학 내과학교실, 미생물학교실*

손소희 · 이대준 · 김창인 · 김정민* · 배현주

= Abstract =

Prevalence of TEM- and SHV-type Beta-lactamase gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea

So Hee Sohn, M.D., Dae Jun Lee, M.D., Chang In Kim, M.D.
Jung Min Kim, M.D.* and Hyun Joo Pai, M.D.

Department of Internal Medicine and Microbiology*
DanKook University Medical College, Chuncheon, Korea

Background : Resistance to beta-lactams in *E. coli* is mostly via acquisition of plasmid-mediated beta-lactamase gene. Among the plasmid-mediated beta-lactamases, TEM-1 beta-lactamase is by far the most prevalent among ampicillin-resistant *E. coli*. The prevalence of TEM-1 or TEM-2 ranged from 61% to 98% across the surveys. *Klebsiella* species generally have class A chromosomal beta-lactamases, which differ greatly from the class C types. Most *K. pneumoniae* isolates have chromosomally mediated SHV-1 beta-lactamase in most surveys. There has been only one report of prevalence and types of beta-lactamases in *E. coli* and *K. pneumoniae* in Korea. We performed this study to determine the prevalence and types of beta-lactamases in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated in Korea.

Methods : Ampicillin resistance was determined by disc diffusion test (*E. coli*) and agar dilution method (*K. pneumoniae*). Fifty five isolates of *E. coli* and 92 isolates of *K. pneumoniae* which were derived from patients in 2 university hospitals in Korea during 1996 were tested by TEM- and SHV-specific PCR.

Results : The ampicillin resistance rate in *E. coli* and *K. pneumoniae* was 82% and 94.6%, respectively. TEM-type beta-lactamase gene was found in 53% of *E. coli* isolates. 93.5% of *K. pneumoniae* isolates was found to have SHV-type beta-lactamase gene.

Conclusion : In Korea TEM-type beta-lactamase gene was most prevalent in *E. coli*, but its prevalence rate was relatively low compared with those in other country. For *K. pneumoniae*, the isolates with SHV type beta-lactamase gene were predominant.

Key Words : Beta-lactamase, Ampicillin resistance, *E. coli*, *K. pneumoniae*, Korea

1)

교신저자 : 배현주 천안시 안서동 산16-5 단국의대 내과학교실 Tel : (0417)550-3909

서 론

beta-lactam 제제는 감염증의 치료에 가장 흔히 사용되는 항균제 중 하나로 이 약제에 대한 내성은 대부분 beta-lactamase 생성에 의한¹⁻³⁾. 최근 분리되는 그람 음성 간균 중에는 ampicillin 등 beta-lactam 항균제에 대한 내성균이 대단히 많은데 대부분의 그람음성 간균은 chromosomal beta-lactamase를 가지고 있어 이것의 양과 표현 방법에 따라 내성을 갖게된다^{4, 5)}. 또한 plasmid를 통해 broad-spectrum beta-lactamase를 이차적으로 획득하는데 이 plasmid 매개성 beta-lactamase는 1960년대 중반부터 보고되기 시작하여 최근까지 약 75개 이상이 그람음성 간균에서 보고되었고 이중 TEM-1 type이 가장 흔한 것으로 알려졌다⁶⁾. *E. coli*는 소량의 chromosomal beta-lactamase (AmpC-type)를 생산하므로 소수를 제외하고는 plasmid 매개성 beta-lactamase에 의하여 내성을 발현한다⁶⁾. *E. coli*는 전 세계적으로 50% 이상이 ampicillin에 내성을 갖는 것으로 보고되었는데 이 내성균중 61-94%가 TEM-1 type의 beta-lactamase를 생성하는 것으로 나타났다⁷⁾.

*Klebsiella species*는 ESBL을 생성하는 균종 중 가장 흔한 균종으로 *E. coli*와는 달리 class A의 chromosomal beta-lactamase를 가지고 있어 ampicillin과 1세대 cephalosporin에 내성을 보인다^{6, 7)}. *K. pneumoniae*에서 가장 흔히 생산하는 chromosomal beta-lactamase는 SHV 1 type으로 약 11%에서 73%까지 다양하게 보고되고 있다⁷⁾.

국내에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 ampicillin 내성율은 1994년 11월부터 1995년 2월사이 전국 72개 병원에서 분리된 균주를 대상으로 한 연구에서 각각 78%와 94%였고⁸⁾, 1994년 6월부터 1995년 12월에 본원에서 분리된 균주를 대상으로 한 결과, ampicillin 내성율은 각각 72%와 95%였다⁹⁾. 또한 1986년 1월부터 1993년 12월까지 8년간 한 대학병원에서 동정된 균주를 대상으로한 항생제 감수성 조사에서는 ampicilline에 대한 감수성이 *E. coli*에서는 1986년 27.7%, 1993년에 22.2%였고 *K. pneumoniae*에서는 각각 23.5%, 5.4%로 점점 감소하는 추세를 보였다¹⁰⁾. 이와 같이 대표적인 병원균인 두 균종의 ampicilline 내성율은 대단히 높지만 국내에서는

beta-lactamase 유형에 관한 자료가 극히 적어 *K. pneumoniae*에서 1 보고가 있고 *E. coli*에 대해서는 알려진 바가 없다¹¹⁾. 이에 저자들은 국내 분리 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 내성에 관여하는 beta-lactamase의 유형을 연쇄중합반응을 이용하여 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1996년 4월부터 9월까지 단국대 병원의 입원 및 외래 환자에서 분리된 *E. coli* 55균주와 국내 3개의 대학병원 환자에서 분리된 *K. pneumoniae* 92균주를 대상으로 하였다. 균주의 동정은 전통적인 방법으로 하였다. 감수성 검사는 NCCLS에 따른 디스크 확산법 (*E. coli*)과 한천 희석법 (*K. pneumoniae*)을 이용하였다. 연쇄중합반응을 위해 균주를 trypticase-soy broth에서 하룻밤 배양후 10분간 끓여 각각 SHV와 TEM 특이 primer를 이용해 연쇄중합반응을 시행하였다. Primer는 각각 TEM과 SHV-type의 여러 아형에 공통적인 보존적 염기서열을 이용하여 제작하였다. 각각의 primer와 PCR 조건은 다음과 같다.

SHV-specific primer

-P: 5' GAT CCA CTA TCG CCA GCA GG 3'
-R: 5' GCG GGT TAG CGT TGC CAG 3'

TEM-specific primer

-P: 5' ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA 3'
-R: 5' GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC 3'

PCR condition

-SHV: 94°C 30', 58°C 60', 72°C 60', 35 cycles
-TEM: 94°C 30', 45°C 90', 72°C 60', 35 cycles

연쇄중합반응 후 중합산물의 검색은 ethidium bromide가 포함된 0.7% 아가로즈젤에서 전기영동한 후 자외선하에서 판독하였다.

결 과

전체 *E. coli* 55균주 중 45균주가 ampicillin에 내성인 균주였고, *K. pneumoniae*는 총 92균주 중 87균주가 내성을 보여 내성율은 각각 82%와 94.6%였다. *K. pneumoniae* 92균주 중 cefotaxim 혹은 ceftazidim에 내성을 보인 균주는 22.8%였고 *E. coli*

Table 1. Frequences of TEM- or SHV-type Beta-lactamase Genes in Ampicillin-resistant *E. coli* & *K. pneumoniae* Isolates

Species (No. tested)	Amp. R* (%)	No.(%) of ampicilline-resistance isolates with			
		TEM	SHV	TEM & SHV	TEM/SHV(-)
<i>E. coli</i> (55)	45 (82.0)	24 (53.0)	1 (2.0)	0 (0)	20 (44.0)
<i>K. pneumoniae</i> (92)	87 (94.6)	1 (1.1)	77 (83.7)	9 (9.8)	4 (4.3)

*: Ampicillin resistance

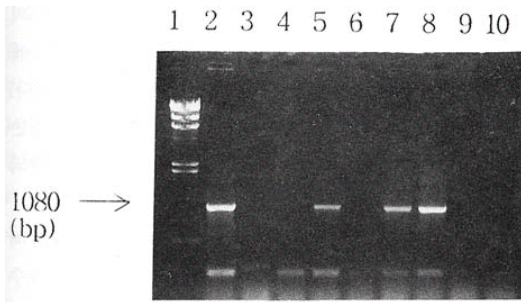


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA by TEM-specific PCR of *E. coli* isolates. Lane 1, molecular weight marker (λ DNA Hind III digest); Lane 2, positive control; Lane 3-9, Clinical isolates of *E. coli*; Lane 10, negative control. TEM-1 (pBR 322) was used as positive control, and negative control was bacteria-free reaction mixture.

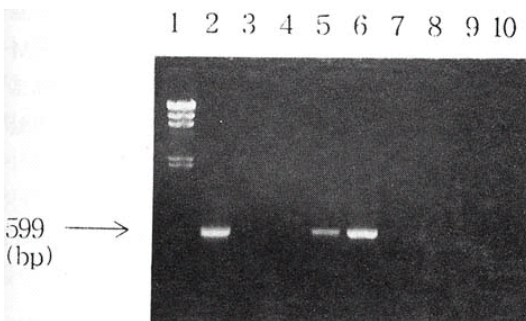


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA by SHV-specific PCR of *K. pneumoniae* isolates. Lane 1, molecular weight marker (λ DNA Hind III digest); Lane 2, positive control; Lane 3-9, Clinical isolates of *K. pneumoniae*; Lane 10, negative control.

에서는 ceftazidim 감수성 검사가 시행되지 않았으나 cefotaxime에 내성을 보인 균주는 12.7%였다. TEM과 SHV 특이 연쇄중합반응 결과 각각 1080 bp와 599 bp의 중합산물이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

*E. coli*의 ampicillin 내성 균주중, 24균주 (53%)가 TEM-type 중합산물 양성이었다고 단 한균주만이 SHV-type 중합산물 양성이었다. TEM과 SHV-type 중합산물이 모두 양성인 균주는 없었으며 모두 음성이면서 ampicillin에 내성을 보인 균주는 20균주로 44%였다(Table 1).

*K. pneumoniae*는 내성균주 중 *E. coli*와는 달리 SHV-type 중합산물 양성균주가 86균주로 가장 많았고 SHV-type 중합산물만 양성인 균주는 77균주로 83.7%, TEM과 SHV-type 중합산물 모두 양성인 균주는 9균주로 9.8%를 차지했다. 반면 TEM-type 중합산물만 양성인 균주는 1균주로 1%였고 둘 다 음성이면서 ampicillin에 내성을 보인 균주는 4균주였다 (Table 1).

고 찰

*E. coli*는 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 위장염, 비뇨기계 감염, 간담도 감염, 복막염, 폐혈증 등 여러 질환의 원인균이다¹⁰. *E. coli*는 본래 ampicillin에 감수성이 있는 균주로, 이 균주의 ampicillin에 대한 내성은 항균제 선택에서 오는 내성의 지표가 될 수 있다⁷. 1971년에서 1982년까지 미국의 Atkinson과 Lorian이 조사한 바에 따르면 *E. coli*의 내성율은 26%로 12년간 큰 변화가 없었다⁷. 또 중유럽에서 시행된 한 연구에서도 1975년부터 1984년 사이에 분리된 균주의 내성율은 22%로 몇 년간 큰 변화가 없었다^{7, 12}. 그러나 그 이후 조사에서 내성율은 증가하여 1980년대 말에는까지 약 50%가 넘게 보고되고 있다^{7, 13, 14}. 국내에서는 1994년부터 1995년 사이의 조사에 의하면 약 77%에서 78%정도로 보고되고 있고⁸⁻¹⁰ 본 연구에서는 82%였다.

Beta-lactam 항균제에 대한 내성은 약제의 표적의 변화나 침투성의 감소 또는 불활성화 효소의 생성에 의한다. 이 중 불활성화 효소인 beta-lactamase의 생

성이 가장 일반적인 내성이다¹⁵⁾. 과거 20-50년간 plasmid 매개성 beta-lactamase는 75가지 이상 밝혀져 왔다. 일반적으로 plasmid 매개성 beta-lactamase는 chromosomal beta-lactamase와 구별되나 몇 가지의 공통되는 것들이 있다. SHV 1 beta-lactamase는 대개 plasmid 매개성 효소이지만 동시에 *K. pneumoniae*의 전형적인 chromosomal beta-lactamase이기도 하다. BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1, LAT-1, MIR-1과 MOX-1 등의 plasmid 매개성 beta-lactamase도 *Enterobacter*와 *Citrobacter*의 chromosomal beta-lactamase와 거의 유사한 AmpC-type 효소들이다. 따라서 많은 plasmid 매개성 beta-lactamase는 chromosome에서 유래되었을 가능성이 있다^{6, 16, 17)}. Chromosomal beta-lactamase는 *Salmonellae*를 제외한 모든 장내세균에 대부분 존재하여 그 양과 표현방법에 따라 내성을 달리한다^{1, 6, 7)}.

*E. coli*의 chromosomal beta-lactamase는 uninducible type의 class C 효소로 (AmpC-type) 아주 소량이 생산되어 ampicillin과 제 1세대 cephalosporin계 항균제 내성은 본래 없다⁶⁾. 반면에 *Klebsiellae species*의 경우는 class A type의 chromosomal beta-lactamase - *K. pneumoniae*는 SHV-1, *K. oxytoca*는 K1 또는 KOXY type beta-lactamase를 생산하여 ampicillin, amoxicillin, carbenicillin과 ticarcillin 및 제 1세대 cephalosporin에 내성을 나타낸다⁶⁾. 따라서 *E. coli*의 여러 항균제 내성은 모두 plasmid 매개성 beta-lactamase에 의한다.

장내세균에서 처음 분리되었고 가장 흔히 분포된 plasmid 매개성 beta-lactamase는 TEM-1이다. 1979년 Matthew는 10개국의 *E. coli* 84균주에서 TEM-1 type 효소의 빈도를 71.4%로 보고 하였고 그 다음으로 OXA-1 type 효소를 11.9%로 보고하였다¹⁶⁾. 또 1989년 Medeiros의 연구에서는 TEM-1이 77%, OXA-1이 6%, SHV-1이 4%였고 chromosomal beta-lactamase만 생성하는 균주는 9%였다¹⁸⁾. 1983년부터 1990년까지 이루어진 조사를 종합해보면 가장 흔한 효소는 TEM-1 type이었고 *E. coli*의 ampicillin 내성의 대부분의 원인이었다⁷⁾. 본 연구에서는 ampicillin 내성 *E. coli* 중 53%만이 TEM-type 효소를 생성하는 것으로 나타났는데 이는 지금까지의 다른 보고보다 훨씬 적은 빈도이다. beta-

lactamase 생성의 빈도는 지역에 따라 아주 다양한데 일반적으로 상대적 빈도는 절대적 빈도보다 더 일정하다. 예를 들어 독일과 오스트리아에서 분리된 *H. influenza*균주에서의 beta-lactamase의 생성은 대만이나 스페인에서 분리되는 균주에서보다 훨씬 적다^{6, 19-21)}. 그러나 그 중에도 TEM-1 type 효소가 어디에 서건 빈도가 높다. 이와 같이 본 연구에서도 TEM-type 효소의 빈도가 가장 많긴하지만 그 빈도가 다른 나라의 보고에 비해 비교적 적어 이는 TEM과 SHV-type 효소가 아닌 OXA-1 등의 다른 유형의 beta-lactamase 생성 균주이거나 혹은 이번 연구에 이용한 연쇄중합반응의 민감도의 문제일 수도 있겠다. 따라서 이를 확인하기 위해서 대상 균주가 생성하는 beta-lactamase의 표현형 등의 연구가 좀더 진행되어야 하겠다.

SHV-1 type 효소는 TEM beta-lactamase와 비슷한 기질 특이성을 가지고 있으나 ampicillin을 가수분해 시키는 능력이 훨씬 크다는 점에서 차이가 있다¹⁶⁾. *Klebsiella species*에 대한 대부분의 조사에서 가장 흔한 효소는 SHV 1 beta-lactamase였으나 몇몇 조사에서는 TEM-1 type이 많은 비율을 차지했는데 네덜란드와 스페인의 경우가 그러했다^{7, 22-24)}. 또 많은 예에서 두 가지의 효소를 생성했는데 가장 흔한 조합이 TEM과 SHV-type이었다^{7, 22, 25, 26)}. 본 연구에서는 SHV-type 중합산물 양성 균주가 93.5%로 지금까지의 보고보다 좀더 많은 빈도를 보였고, TEM과 SHV-type 중합산물 모두 양성인 균주는 9.8%로 TEM-type 중합산물만 양성인 균주(1%)보다 많았다.

요 약

목적: *E. coli*는 전세계적으로 50% 이상이 ampicillin에 내성이 있는 것으로 보고되었고 이 내성균주 중 61-94%가 TEM-1 type의 beta-lactamase를 생성한다. *E. coli*와는 달리 *K. pneumoniae*는 class A의 chromosomal beta-lactamase인 SHV type을 대부분이 생산하는 것으로 알려져있다. 국내에서는 대표적인 병원균인 두 균주의 ampicillin의 내성율은 대단히 높지만 beta-lactamase 유형에 관한 보고가 거의 없다. 이에 저자들은 국내에서 분리되는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 ampicillin 내성에 관여하는

beta-lactamase의 유형을 연쇄중합 반응을 이용하여 분석하고자 하였다.

방 법 : 1996년 4월부터 9월까지 단국대 병원의 입원 및 외래 환자에서 분리된 *E. coli* 55균주와 국내 2개의 대학병원 환자에서 분리된 *K. pneumoniae* 92균주를 대상으로 하였다. 감수성 검사는 NCCLS에 따른 디스크 확산법 (*E. coli*)과 한천희석법 (*K. pneumoniae*)을 이용하였고 각각 SHV & TEM 특이 primer를 이용해 연쇄중합반응을 시행하였다.

결 과 : 전체 *E. coli* 55균주 중 45균주가 ampicillin에 내성인 균주였고, *K. pneumoniae*는 총 92균주 중 87균주가 내성을 보여 내성율은 각각 82%와 94.6%였다. *E. coli*의 ampicillin 내성 균주중, 24균주 (53%)가 TEM-type 중합산물 양성이었고 TEM과 SHV-type 중합산물 모두 음성인 반면 ampicillin에 내성을 보인 균주는 20균주로 44%를 차지했다.

*K. pneumoniae*의 경우 내성균주 중 SHV-type 중합산물 양성균주가 86균주로 가장 많았고 SHV-type 중합산물만 양성인 균주는 77균주로 83.7%, TEM과 SHV-type 중합산물 모두 양성인 균주는 9균주로 9.8%를 차지했다. 반면 TEM-type 중합산물만 양성인 균주는 1균주로 1%였고 둘 다 음성인 반면 ampicillin에 내성을 보인 균주는 4균주였다.

결 론 : 국내 분리 *E. coli*의 beta-lactam 항생제에 대한 내성은 주로 TEM-type 효소에 의해 발현되나 이 효소의 빈도는 다른 나라보다 비교적 낮았다. *K. pneumoniae*의 경우는 SHV-type 효소의 빈도가 훨씬 많았고 다른 다라의 빈도보다도 비교적 높은 편이었다. *E. coli*에서 TEM-type 효소의 빈도가 낮은 것은 추시가 필요할 것으로 생각되며 내성균주 중 TEM과 SHV-type 효소를 모두 생성하지 않는 균주들에 대해서는 연구가 좀더 진행되어야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) 정석훈, 서철송, 신희봉, 이경원, 정윤섭, 권오현, 고신옥 : Extended-Spectrum beta-lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 감염의 Pulsed-Field Gel Electrophoresis를 이용한 역학적 분석. 감염 28: 405-412, 1996
- 2) Davies J : Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 264:375-382, 1994
- 3) 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현 : Extended Broad-spectrum beta-lactamase 생성 *E.coli*와 *K. pneumoniae*. 감염 26:341-348, 1994
- 4) Liu PYF, Deniz Gur, Lucinda M. C. Hall, Livermore DM : Survey of the prevalence of beta-lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. J. of Antimicrobial Chemother 35:429-447, 1992
- 5) Thomson CJ, Amyes SG B. : Molecular epidemiology of the plasmid-encoded TEM-1 beta-lactamase in Scotland. Epidemiol Infect 110:117-125, 1993
- 6) Livermore DM : beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiol Rev 8:557-584, 1995
- 7) Sanders CC, Sanders WE : beta-lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Global Trends and Clinical Impact. Clinical Infectious diseases 15:824-839, 1992
- 8) 정윤섭, 이경원, 서진태, 김의종, 배직현, 이규만, 최태열 : 전국 주요 병원에서 분리된 호기성 그람음성 간균의 항균제 감수성. 감염 28:131-141, 1996
- 9) 균주별 항생제 내성 검사 통계. 임상미생물 검사 통계 61-63, 1996
- 10) 김구엽, 이희주, 서환조 : 세균의 항생제 감수성 변화의 추이. 감염 27:119-140, 1995
- 11) 이상민, 이상화, 조동택 : *K. pneumoniae*와 *S. marcescens*에서 확장된 내성범위의 beta-lactamase 유전자의 분자유전학적 형질분류. 대한미생물학회지 31:13-34, 1996
- 12) Atkinson BA, Lorian V : Antimicrobial agent susceptibility pattern of bacteria in hospitals from 1971 to 1982. J Clin Microbiol 20:791-796, 1984
- 13) Sadeghi E : Type, frequency, and antimicrobial sensitivity pattern of bacteria in an Iranian hospital during the 1980s. Rev Infec Dis 12:543-549, 1990
- 14) Huovinen S, Huovinen P, Tornaiainen K, Jacoby GA : Evaluation of plasmid-encoded beta-lactamase resistance in *Escherichia coli* blood culture isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7:651-655, 1988
- 15) Sanders CC : beta-lactamases of Gram-Negative Bacteria: New Challenges for New Drugs. Clinical Infectious Diseases 14:1089-1099, 1992
- 16) Matthew M : Plasmid mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: distribution and properties. J Antimicrob Chemother 5:349-358, 1979
- 17) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA : A functional classification scheme for beta-lactamses and its correlation with molecular structures. Antimicrob

- Agents Chemother* 39:1211-1233, 1995
- 18) Cooksey R, Swenson J, Clark N, Gay E, Thornsberry C : *Pattern and Mechanisms of beta-lactam resistance among isolates of Escherichia coli from hospitals in the United States. Antimicrob Agents Chemother* 34:739- 745, 1990
 - 19) Machka K, Braveny I, Davernat H, Dornsbussch K, van Dyck E, Kayser FK, Van B Klingeren, Mittermayer H, Perea E, Powell M : *Distribution and resistance patterns of Haemophilus influenzae : a European cooperative study. Eur J Clin Microbiol Infect* 7:14-24, 1988
 - 20) Powell, M, Koutsia-Carouzou C, Voutsinas D, Seymour A, Williams JD : *Resistance of clinical isolates of Haemophilus influenzae in the United Kingdom . Br Med J* 295:176-179, 1987
 - 21) Scrivener SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Bruton J, McGeer A, Moore TC, Witwicki E, Canadian Haemophilus Group, Law DE : *Detection of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of Haemophilus influenzae and characterization of their beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother* 38:1678-1680, 1994
 - 22) Rubio MC, Gil J, Castillo J, et al : *The susceptibility to amoxycillin/clavulanic acid of Enterobacteriaceae with plasmid-mediated ampicillin resistance: a twelve-year study of strains in one Spanish hospital. J Antimicrob Chemother* 24 (Suppl B):35-40, 1989
 - 23) Wiedemann B, Kliebe C, Kresken M : *The epidemiology of beta-lactamases. J Antimicrob Chemother* 24(Suppl B):1-22, 1989
 - 24) Stobberingh EE, Houben AW, van Boven CPA : *Cephalosporin resistance among gram-negative hospital strains and the prevalence of beta-lactamase types. Antonie van Leeuwenhoek* 48: 200-201, 1982
 - 25) Medeiros AA : *beta-lactamases. Br Med Bull* 40:18-27, 1984
 - 26) Reid AJ, Simpson IN, Harper PB, Amyes SBG : *Cephaloridine resistance in gram-negative bacteria isolated in Scotland. J Pharm Pharmacol* 40: 571-573, 1988
-