

Multiplex Polymerase Chain Reaction을 이용한 Extended-Spectrum β -Lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주의 검출

진주보건대학 임상병리과

양 병 선

Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Byoung-Seon Yang

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is the main mechanism of bacterial resistance to third-generation cephalosporins and monobactams, whose prevalence varies depending on the different geographical areas. In the last years it has increased notably to the point of being considered a health problem of great importance. The characterization of the ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* strains present in clinical isolates is time-consuming. I describe here the development of a new system, which consists of a multiplex PCR. I found 51 *K. pneumoniae* strains to be presumptive strains ESBLs producers by clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. The double disc synergy test showed 47 positive *K. pneumoniae*, which were *K. pneumoniae* isolates. All ESBLs producing *K. pneumoniae* strains were resistant to antibiotic amikacin, gentamicin and ciprofloxacin. By multiplex PCR analysis, *bla*_{TEM} gene in 17 strains 44 *bla*_{SHV} genes and *bla*_{CTX} genes in 33 strains were identified.

In this study, the multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay was a good method to detect and differentiate ESBLs producing *K. pneumoniae* strains in clinical isolates.

Key words : *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum β -lactamases, Multiplex polymerase chain reaction

I. 서 론

광범위 내성 β -lactamases 세균은 extended spectrum cephalosporin(cefotaxime, ceftazidime 등), aztreonam 및 oxyimino- β -lactams 뿐만 아니라, 이전 세대의 penicillin 과 cephalosporins 항생제에 내성을 나타내는 세균이다. *Klebsiella pneumoniae*는 2%에서 5%정도가 원내감염의

원인균으로 잘 알려져 있으며, 특히 하부 호흡계와 비뇨계에 감염을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Gazouli 등, 1997; Kil 등, 1997; Pnaiara 등, 2000; Silva 등, 2001). *K. pneumoniae*가 cephalosporins계에 다제 내성을 나타내는 것은 1980년대 초에 발견되었으며(Bingen 등, 1993), 1986년에 그 추세가 점점 더 증가하였다. ESBL 생성균주의 역학적 조사는 이미 실시해오고 있으며, 광범위 내성 *K. pneumoniae* 분리 균주의 감염과 집락화에 관여하는 몇몇 위험 인자들의 연구도 시행되어져 왔다(Macrae 등, 2001).

교신저자 : 양병선, (우)660-757 경남 진주시 상봉서동 1142 진주보건대학 임상병리과
Tel : 055-740-1851, 016-835-7191
E-mail : ybseon@jhc.ac.kr

PCR을 기초로 하는 다른 typing 방법으로 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석은 보다 더 빠르고, 수행이 수월한 방법이다. 그러나, typing에 있어 비교성이나, 재현성, 분석력 그리고 이러한 방법의 효율성의 전반적인 조사는 아직 이루어지지 않고 있다. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) 분석에 따른 유전자의 분석 방법으로 다른 균주로부터의 *K. pneumoniae*의 균주를 비교 동정할 수 있다. 그러나 이 방법은 기술적으로 어려움이 있으며, 시간이 많이 소모되고, 특수한 장비를 필요로 한다. 그러므로, 이러한 방법들이 널리 이용되고 있기는 하지만, ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 typing에 있어, 제일 좋은 분석력이나 재현성을 나타내는 방법을 확립하여야만 한다(Monica 등, 2004). Multiplex PCR 방법을 이용한 ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 typing 방법은 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 임상 분리균주의 검출과 분석의 기술적인 어려움이나, 시간적인 소모 그리고 특수한 장비가 있어야

되는 문제점을 보완하고, 분석력이나 재현성이 좋은 방법으로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주를 대학병원으로부터 분리하여 double disc synergy test(DDST)를 실시하고 TEM, SHV, CTX 유전자를 대상으로 하여 multiplex PCR을 실시하여 표현형과 유전자형을 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

3개의 대학병원(충북, 충남 그리고 경상대학병원)에서 VITEK기기(BioMerieux, Marcy, France)로 ESBL 생성 *K. pneumoniae*로 동정된 51개의 균주를 대상으로 하였다 (Table 1).

Table 1. List of ESBL producing *K. pneumoniae* isolates used in this study

Strains	Source	AST					Strains	Source	AST				
		ATM	CIP	CRO	CAZ	CF			AZT	CIP	CRO	CAZ	CF
CB1	CBUH	R	I	S	R	R	CN14	"	R	R	S	R	R
CB2	"	R	S	S	R	R	CN15	"	R	R	I	R	S
CB3	"	R	R	S	R	S	CN16	"	R	I	I	R	R
CB4	"	R	R	R	R	R	CN17	"	R	R	I	R	R
CB5	"	R	R	S	R	R	CN18	"	R	R	S	R	S
CB6	"	R	R	S	R	R	CN19	"	R	R	S	R	S
CB7	"	R	S	I	R	R	CN20	"	R	S	S	R	S
CB8	"	R	I	R	R	R	CN21	"	R	R	I	R	S
CB9	"	R	R	S	R	R	KS1	KSUH	R	R	I	R	S
CB10	"	R	R	S	R	S	KS2	"	R	R	R	R	S
CB11	"	R	I	I	R	R	KS3	"	R	R	R	R	S
CB12	"	R	R	R	R	R	KS4	"	R	S	R	R	S
CB13	"	R	R	I	R	R	KS5	"	R	S	R	R	S
CN1	CNUH	R	R	I	R	R	KS6	"	R	R	R	R	S
CN2	"	R	R	I	R	R	KS7	"	R	R	R	R	S
CN3	"	R	R	I	R	R	KS8	"	R	R	R	R	R
CN4	"	R	R	I	R	R	KS9	"	R	R	R	R	R
CN5	"	R	R	S	R	R	KS10	"	R	R	R	R	S
CN6	"	R	R	S	R	S	KS11	"	R	R	R	R	S
CN7	"	R	R	S	R	S	KS12	"	R	R	R	R	S
CN8	"	R	R	I	R	S	KS13	"	R	R	R	R	S
CN9	"	R	I	S	R	R	KS14	"	R	R	R	R	S
CN10	"	R	S	S	R	R	KS15	"	R	R	R	R	S
CN11	"	R	S	I	R	R	KS16	"	R	R	R	R	S
CN12	"	R	S	S	R	R	KS17	"	R	R	R	R	S
CN13	"	R	R	S	R	R							

CBUH, Chungbuk University Hospital; CNUH, Chungnam University Hospital; KSUH, Kyoungsang University Hospital; AST, antibiotic susceptibility test; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CF, cephalothin; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive.

2. 균주로부터의 DNA 분리

51개의 *K. pneumoniae* 균주를 QIAamp DNA Mini kit(Cat. No. 51304)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

순수 분리된 51개 균주를 LB media(BD, Detroit, USA)를 이용하여 37°C shaking incubator에서 하루 동안 진탕 배양 하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 후 상등액은 버리고 침전물을 이용하여 QIAamp DNA Mini Kit가 제시한 방법으로 DNA를 추출하였다.

3. Double disc synergy 시험

세균 부유액을 Mueller-Hinton 한천(BD, Detroit, USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 ticarcillin-clavulanic acid(TIM) 또는 cefotaxime-clavulanic acid(CTX/CLA)를, 주위에는 30 µg의 cefotaxime(CTX), ceftaxidime(CAZ) 및 aztreonam(ATM) 디스크를 놓되, 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 2 cm가 되도록 하였다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독 하였다. CTX, CAZ 및 ATM 디스크에 의한 억제대가 TIM 또는 CTX/CLA 디스크 쪽으로 커지거나 없던 억제대가 새로 생기면 양성으로 판정하였다.

4. Multiplex PCR을 위한 primer의 합성

β-lactamase의 특성을 분석하기 위한 primer를 다음과 같이 제작하였다(Table 2).

5. Multiplex PCR을 이용한 ESBL 유전자의 증폭

Multiplex PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각기 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 µL, primer 3쌍(TEM, SHV, CTX) 10 pmol 각각 1 µL씩 넣었고, genomic DNA(25 µg) 1 µL, Taq DNA polymerase(2 unit) 1 µL, 최종 반응액의 총량은 증류수로 20 µL 되게하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer, Wellesley, USA)에서 94°C에서 1분 간 변성, 58°C에서 1분 간 접합, 72°C에서 1분 간 확장의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 10분 간 최종확장 하였다.

6. PCR 산물의 확인

PCR 증폭산물을 2% agarose gel에 1× TAE buffer에서

Table 2. Primer sets used in charactering β-lactamases

Gene	Primer sequence	PCR product (bp)
TEM	5'-ATAAAATTCCTGAAGACGAA-3' 5'-GACAGTTACCAATGCTTAAT-3'	1080
SHV	5'-TGGTTATGCGTTATATTCGC-3' 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'	870
CTX	5'-TTTGCATGTGCAGTACCAG-3' 5'-GATATCGTTGGTGGTGCCAT-3'	543

70 volt, 100 mA로 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 ethidium bromide(0.5 µg/mL) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분 간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진 촬영 하였다.

III. 결 과

1. Double disk synergy 시험

Double disk synergy 확인 시험에서는 충북대병원의 경우 CB5 균주, 충남대병원의 경우 CN5 균주, 경상대병원의 경우 KS11, KS14 균주가 음성으로 나타나 총 47 균주가 양성으로 판명되었다(Fig. 1).

2. ESBL 유전형

Multiplex PCR에서는 충북대 병원의 경우 CB5 균주, 경상대병원의 경우 KS7, KS11 균주가 음성으로 나타나 총 48균주가 양성으로 나타났고, 33%가 TEM으로, 86%가 SHV 그리고 67%가 CTX로 분류할 수 있었다 (Table 3. Fig. 2-4).

IV. 고 찰

최근에 β-lactam 항균제에 내성인 세균에 의한 감염의 증가가 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 밖으로의 항균제 유출 등 다양 하며, 장내세균은 흔히 β-lactamase 생성에 의하여 β-lactam

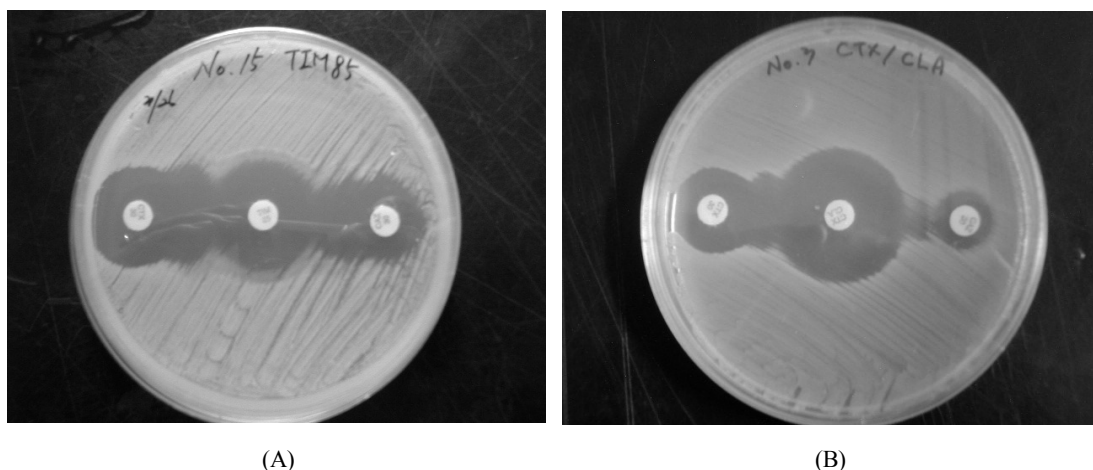


Fig. 1. Detection of ESBL production of CB1 strain in double disc synergy tests.
 (A) discs. left, CTX; centre, TIM; right, CAZ
 (B) discs. left, CTX; centre, CTX/CLA; right, CAZ

Table 3. Genotyping of ESBL producing *K. pneumoniae* from university hospital isolates

Strains	TEM/SHV/CTX type	DDST (CAZ+TIM)	Strains	TEM/SHV/CTX type	DDST (CAZ+TIM)
CB1	TEM, SHV, CTX	+	CN14	SHV, CTX	+
CB2	TEM, SHV, CTX	+	CN15	SHV, CTX	+
CB3	SHV, CTX	+	CN16	SHV	+
CB4	SHV, CTX	+	CN17	SHV, CTX	+
CB5	-	-	CN18	TEM	+
CB6	SHV	+	CN19	SHV, CTX	+
CB7	SHV, CTX	+	CN20	SHV, CTX	+
CB8	SHV, CTX	+	CN21	SHV, CTX	+
CB9	SHV	+	KS1	TEM, SHV, CTX	+
CB10	SHV, CTX	+	KS2	TEM, SHV, CTX	+
CB11	TEM, SHV, CTX	+	KS3	SHV	+
CB12	SHV	+	KS4	TEM, SHV, CTX	+
CB13	TEM	+	KS5	TEM, SHV, CTX	+
CN1	TEM, SHV, CTX	+	KS6	TEM, SHV, CTX	+
CN2	TEM, SHV, CTX	+	KS7	-	+
CN3	SHV, CTX	+	KS8	TEM, SHV, CTX	+
CN4	SHV, CTX	+	KS9	SHV	+
CN5	SHV	-	KS10	SHV	+
CN6	TEM, CTX	+	KS11	-	-
CN7	SHV, CTX	+	KS12	TEM, SHV, CTX	+
CN8	SHV, CTX	+	KS13	TEM, SHV, CTX	+
CN9	SHV, CTX	+	KS14	SHV	-
CN10	SHV	+	KS15	TEM, SHV, CTX	+
CN11	SHV, CTX	+	KS16	TEM, SHV, CTX	+
CN12	SHV, CTX	+	KS17	SHV	+
CN13	SHV, CTX	+			

DDST, double disc synergy test; CAZ, ceftazidime; TIM, ticarcillin-clavulanic acid

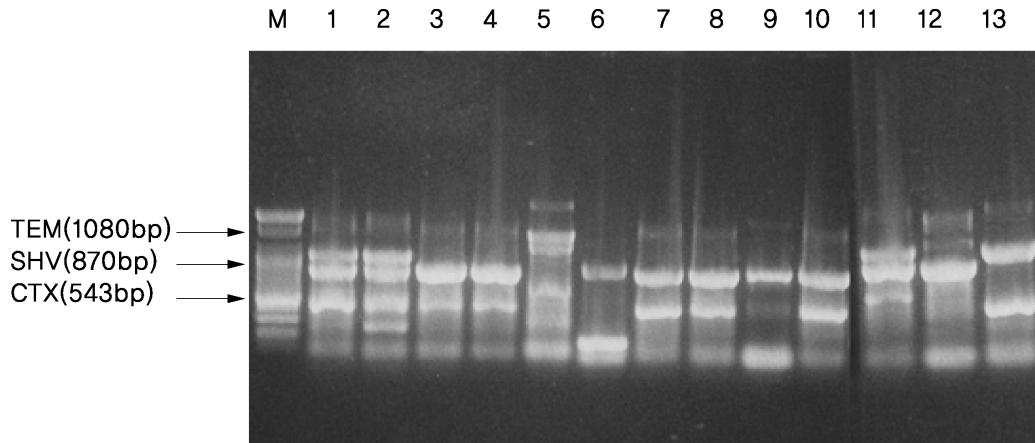


Fig. 2. Electrophoresis of the amplified products of TEM, SHV, CTX genes by a mutiplex PCR in a 2% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; Lanes 1 to 13, Chungbuk University Hospital isolates. The amplified products and their sizes are indicated on the left.

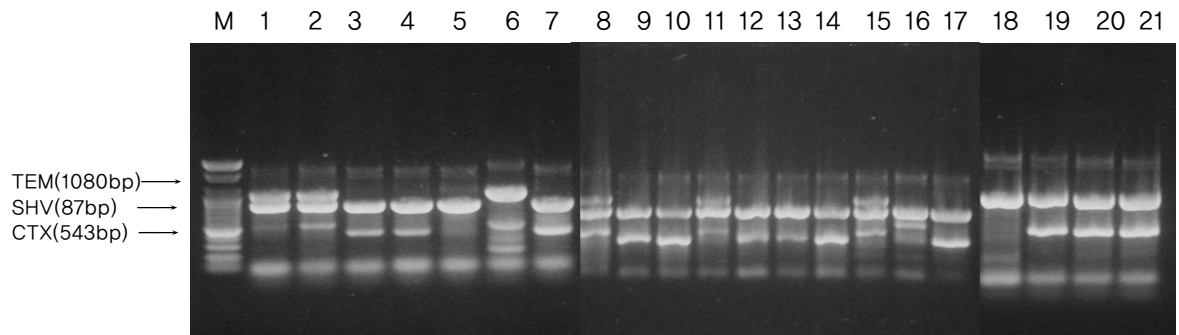


Fig. 3. Electrophoresis of the amplified products of TEM, SHV, CTX genes by a mutiplex PCR in a 2% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; Lanes 1 to 21, Chungnam University Hospital isolates. The amplified products and their sizes are indicated on the left.

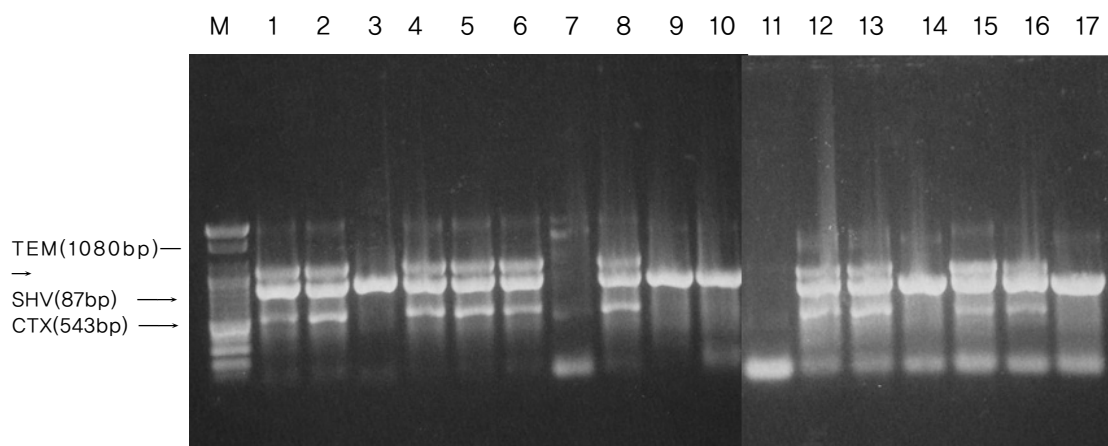


Fig. 4. Electrophoresis of the amplified products of TEM, SHV, CTX genes by a mutiplex PCR in a 2% agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder; Lanes 1 to 17, Gyoungsang University Hospital isolates. The amplified products and their sizes are indicated on the left.

항균제에 대한 내성을 획득한다. 호흡기감염, 요로감염증, 패혈증, 수막염 등 다양한 감염증의 발생 원인이며, 화학요법에 저항성이 강하기 때문에 기회감염증과 균교대증의 원인이 되는 *K. pneumoniae*는 현재 지난 20년 동안 가장 현저하게 증가한 원내감염 원인균으로 대두되고 있으며, 3세대 cephem계 다제 내성을 나타내는 ESBL로 증가되고 있는 추세이다(Galani 등, 2002).

지금까지의 ESBL생성 *K. pneumoniae*의 검출에는 표현형 특성을 이용하여 검출하는 방법이 널리 알려져 있다. 그러나, 표현형적 방법은 검출에 시간이 많이 소요된다는 것과, 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. Chia 등(2005)은 *K. pneumoniae*의 ESBL 생성 유전자를 검출하는 데 multiplex PCR 방법을 이용하면 유전자들을 검출하는 데 있어서 가장 정확하고 재현성이 있으며 또한 빠른 시간에 검사가 가능한 방법이며, 지역적인 분포도뿐만 아니라 다른 균주에서의 ESBL 생성 유전자의 검출에 적용하는 것도 아주 용이하게 접근 할 수 있는 방법이라고 주장하였다. 본 실험 결과 표현형적 방법으로 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 51 균주 중 CN5, KS14 균주의 경우 DDST 결과가 음성으로 나타났으나 SHV 유전자를 가지고 있었고, KS7 균주의 경우 DDST 결과는 양성으로 나타났으나 TEM, SHV, CTX 유전자 검출에서 음성으로 나타나 ESBL 유전자자형에 대한 보다 많은 연구가 필요하다. 그리고, 대부분의 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주에서는 SHV 유전자를 포함하고 있는 것으로 나왔으며, 이는 ESBL 유전자의 검출과 이 유전자의 monitoring에 중요한 역할을 할 것이라 생각되어진다. 따라서, 분자 생물학적 기법인 multiplex PCR을 이용한 ESBL 내성 유전자의 검출은 표현형적 방법에서의 문제점의 해결이나, 원내감염의 역학에 아주 유용한 방법이라 사료된다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF, Wu TL. Development of a Multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of Some SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 43:4486-4491, 2005.
3. 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.
4. Gazouli M, Kaufmann ME, Tzelepi E, Dimopoulou H, Paniara O, Tzouveleki LS. Study of an outbreak of cefoxitin-resistance *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Clin Microbiol* 35:508-510, 1997.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Pnaiara E, Platouka H, Dimopoulou E, Tzelepi B, Miriagou, Tzouveleki LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 12:204-207, 2000.
9. 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.