

# SHV ESBL생성 *Klebsiella pneumoniae* 균주의 실시간중합효소반응분석

진주보건대학 임상병리과<sup>1</sup>, 대전보건대학 임상병리과<sup>2</sup>

양 병 선<sup>1</sup> · 육 근 돌<sup>2</sup>

## Real-Time PCR Analysis of SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae*

Byoung-Seon Yang<sup>1</sup> and Keun-Dol Yook<sup>2</sup>

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea<sup>1</sup>

Department of Clinical Laboratory Science, Daejeon Health Science College, Daejeon 300-711, Korea<sup>2</sup>

The production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) of the TEM or SHV type by bacterial pathogens is a major threat to the use of the clinically important expanded-spectrum cephalosporins. The characterization of the SHV ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* strains present in clinical isolates is time-consuming processes. We describe here in the development of a novel system, which consists of a real time PCR. We found 11 *K. pneumoniae* strains to be presumptive strains ESBLs producers by clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. The double disk synergy test showed 8 ESBL positive and conventional PCR showed 10 SHV ESBL positive, which were *K. pneumoniae* strains isolates. By real time PCR analysis, SHV gene in 11 of 11 strains were identified. When sequencing analysis was compared with real time PCR, both analysis were presented 99% similarity. In this study, we used a rapid, sensitive, and specific real-time PCR (RT-PCR) method for detection of the assay SHV ESBL producing *K. pneumoniae* strains in clinical isolates.

Received 2 NOV 2009 / Returned for modification 11 DEC 2009 / Accepted 16 DEC 2009

**Key Words** : *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, Real-time polymerase chain reaction

### I. 서 론

Extended spectrum  $\beta$ -lactamase(ESBL)을 생성하는 세균은 penicillin류, 제 1, 2 및 3세대 cephalosporin(oxyimino- $\beta$ -lactams제)과 aztreonam을 분해하고 clavulanic

acid 등 저해제에 의해서 그 활성이 저해되며, cephamycin이나 carbapenem은 분해하지 못하는  $\beta$ -lactamase를 뜻하며, Bush, Jacoby 및 Medeiro의 기능 분류군 2be와 2d에 속하는 것으로 알려져 있다. *Klebsiella pneumoniae*는 2~5%정도가 원내감염의 원인균이며, 특히 하부 호흡계와 비뇨기계에 감염을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Gazouli 등, 1997; Kil 등, 1997). *K. pneumoniae*가 cephalosporins계에 다제 내성을 나타내는 것은 1980년대 초에 보고되었으며(Bingen 등, 1993), 그 추세가 점점 더

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

증가되고 있다. ESBL 생성균주의 유전형과 광범위 cephalosporin 내성 *K. pneumoniae*의 감염과 집락화에 관여하는 몇몇 위험 인자에 관한 것도 알려지고 있다 (Macrae 등, 2001).

ESBL 유전형 검사에 일반 PCR 방법들이 널리 이용되고 있기는 하지만 PCR을 수행하는 시간이 많이 소요되고 증폭 후 전기영동으로 확인하고 사진 촬영하는 작업이 필요하다(Karch 등, 1989). ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 typing에 있어, 분석력 뛰어나고 빠르며, 재현성을 나타내는 방법이 필요하다(Monica 등, 2004). Real-time PCR 방법을 이용한 ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 유전자형 검출 방법은 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 임상 분리균주의 검출과 분석의 기술적인 어려움이나, 시간적인 소모되는 문제점을 보완하고, 빠르고, 감수성이 좋은 방법으로 잘 알려져 있다(Fortin 등, 2001; Mckillip 등, 2000). 본 연구에서는 *K. pneumoniae*균주를 대상으로 ESBL 검출법에 대해서 double disk synergy(DDS) 시험법과, real-time PCR법의 비교 및 염기서열을 규명하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

2009년 7월부터 10월까지 대전에 있는 S 대학병원에서 VITEK(Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France)로 동정된 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 11 균주를 대상으로 실험하였다 (Table 1).

### 2. Double disk synergy 시험

세균 부유액을 Mueller-Hinton 우무(BBL Microbiology systems, Cockeysville, MD., USA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 ticarcillin-clavulanic acid(TIM)또는 cefotaxime-clavulanic acid(CTX/CLA)를, 주위에는 30 µg의 cefotaxime(CTX), ceftazidime(CAZ) 및 aztreonam (ATM) 디스크를 놓되, 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 2 cm가 되도록 하였다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였다. CTX, CAZ 및 ATM 디스크에 의한 억제대가 TIM 또는 CTX/CLA 디스크 쪽으로 상승작용에 의해 억제대의 크기가 증가하였을

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

Strains	AST		Genotype	
	FOX	DDST	PCR	RT-PCR
A1	R	+	+	+
A2	R	+	+	+
A3	S	-	-	+
A4	S	-	+	+
A5	R	+	+	+
A6	S	-	+	+
A7	R	+	+	+
A8	R	+	+	+
A9	R	+	+	+
A10	R	+	+	+
A11	R	+	+	+

AST, antibiotic susceptibility test; FOX, cefoxitin; DDST, double disk synergy test; R, resistance; S, sensitive

때 양성으로 판정하였다(Table 1).

### 3. 균주로 부터의 DNA 분리

*K. pneumoniae* 11 균주를 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

순수 분리된 11개 균주를 LB media(BD, Detroit, USA)를 이용하여 37°C shaking incubator에서 하루 동안 진탕 배양 하였다. 배양액을 13,000×g에서 3분간 원심 후 상등액은 버리고 침전물을 이용하여 키트가 제시한 방법으로 DNA를 추출하였다.

### 4. PCR을 위한 Primer의 합성

SHV ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주의 특성을 분석하기 위한 primer(Bioneer Co. Daejeon, Korea)를 다음과 같이 제작하였다(Table 2).

### 5. 일반 PCR을 이용한 ESBL 유전자의 증폭

유전자 증폭을 위한 PCR 반응액은 HotStart PCR PreMix(Bioneer Co.)에 10 pmol primer와 1 µL DNA를

**Table 2.** Primer sets used in this study

Gene	Primer sequence	PCR product (bp)
SHV	5'-TGGTTATGCGTTATATTCGC-3' 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'	870

포함하여 총 20  $\mu$ L를 PCR기기에서 증폭시켰다. SHV 유전자 증폭을 위한 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성을 시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 50초, 60 $^{\circ}$ C에서 50초, 72 $^{\circ}$ C에서 50초 30 cycle을 반응시키고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

**6. Real-Time PCR을 이용한 ESBL 유전자의 증폭**  
 임상검체에서 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 균주를 종 특이적(species specific) 유전자인 SHV 유전자의 존재를 확인하기 위하여 SYBR Green I을 이용한 real-time PCR을 실시하였다. PCR 반응은 cuvette(Smart cycler, TaKaRa)에 25  $\mu$ L 반응액을 기준으로 870 bp의 SHV 특이 유전자를 다음과 같은 조건에서 증폭하였다. 12.5  $\mu$ L의 SYBR premix Ex Taq(TaKaRa), 10  $\mu$ M 각각의 primer(SHV F, SHV R), 2  $\mu$ L DNA를 혼합하여 총 25  $\mu$ L로 cuvette에 분주 후 마개를 닫은 후 500  $\times$ g에서 30초간 spin-down 후 Smart Cycler를 이용하여 반응을 실시하였다. 95 $^{\circ}$ C, 10초간 polymerase 활성화를 실시한 후, shuttle PCR 30회 반복 반응(95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 10초)하여 목적 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA는 SYBR Green I의 결합으로 특유의 형광을 발하게 되어 이 형광의 발생 정도를 Smart Cycler software v. 2.0으로 분석하였다. 이때 얻어지는 melting peak는 증폭된 DNA의 GC%에 따라 특이적으로 나타내었다.

**7. PCR 산물의 확인**  
 PCR 증폭산물을 2% agarose gel에 1 $\times$  TAE buffer에서 70 volt, 100 mA로 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/mL) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진 촬영 하였다.

**8. 염기서열분석**  
 임상검체에서 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae*에서 real-Time PCR법으로 증폭된 DNA 절편이 SHV 유전자인지 확인하기 위하여 DNA 염기서열을 확인하였다. PCR 반응 후 전기영동을 실시하여 870 bp 크기의 DNA 절편을 agarose gel에서 잘라낸 후 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)을 이용해 agarose gel에서 DNA를 유출 후 SolGent(Daejeon)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

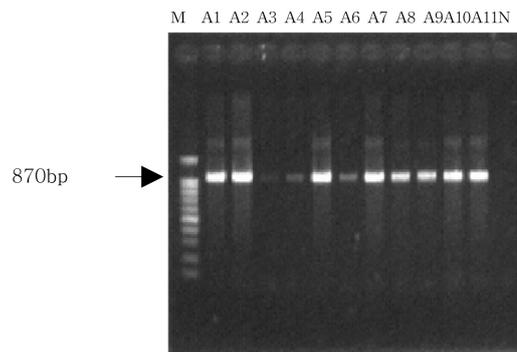
### III. 결 과

#### 1. Double disk synergy 시험

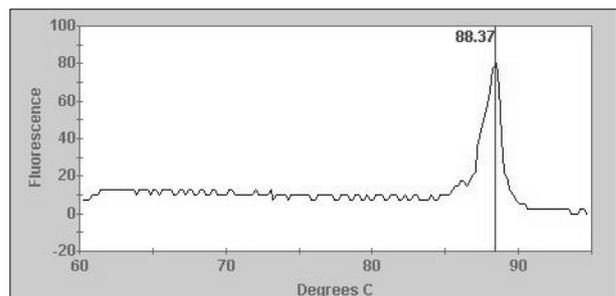
Double disk synergy 확인 시험에서는 A3균주, A4균주, A6균주가 음성으로 나타나 총 8균주가 양성으로 판명되었다(Table 1).

#### 2. 일반 PCR 및 Real-Time PCR 분석

SHV ESBL 생성 *K. pneumoniae*는 일반 PCR의 경우 A3 균주가 음성으로 나타났으나 real-Time PCR 분석 결과 11균주 모두 양성으로 나타났었다(Fig. 1, Fig. 2).



**Fig. 1.** Electrophoresis of the amplified products of SHV genes by a PCR of *K. pneumoniae* isolates. Lane M, 1Kbp DNA ladder; lanes A1 to A11 *K. pneumoniae* isolates; N, negative control.



**Fig. 2.** Smart cycler printouts showing melting peak of SHV gene by SYBR Green Real-time PCR.  $T_m$  was 88.37 $^{\circ}$ C for SHV gene (A1 strain).

```

Query 1 GCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT 60
      |||
Sbjct 36 GCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT 95

Query 61 TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT 120
      |||
Sbjct 96 TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT 155

Query 121 ATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA 180
      |||
Sbjct 156 ATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA 215

Query 181 TGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCTG 240
      |||
Sbjct 216 TGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCTG 275

Query 241 TTTTGTCTCAGGAGAAACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC 300
      |||
Sbjct 276 TTTTGTCTCAGGAGAAACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC 335

Query 301 GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCG 360
      |||
Sbjct 336 GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCG 395

Query 361 AAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGTGCAGTATTATCCC 420
      |||
Sbjct 396 AAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGTGCAGTATTATCCC 455

Query 421 GTGTTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG 480
      |||
Sbjct 456 GTGTTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG 515
    
```

Fig. 3. Sequencing and DNA BLAST results of PCR amplified SHV gene(A1 strain). from *K. pneumoniae* isolate.

### 3. 염기서열분석

SHV ESBL 생성 *K. pneumoniae* real-time균주의 PCR 염기서열분석 결과를 National Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, Md.)의 Basic Local Alignment Search(BLAST)을 이용하여 염기서열의 유사성을 비교분석하였다.

검색결과 모든 균주가 이미 보고된 균주와 SHV 유전자가 99%의 유사성을 보였다(Fig. 3).

## IV. 고찰

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 다양하며, 장내세균은 흔히 β-lactamase 생성에 의하여 β-lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다(Silva 등, 2001). 호흡기감염, 요로감염증, 패혈증, 수막염 등 다양한 감염증의 발생 원인이며, 화학요법제에 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 ESBL이 증가 되고 있는 추세이다(Galani 등, 2002). ESBL생성 *K. pneumoniae*의 검출에는 표현형 특성을 이용하여 검출하는 방법이 널리 알려져 있다. 그러나, 표현형 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(Pnaiara 등, 2000; Silva 등, 2001). *K. pneumoniae*의 ESBL 생성 유전자를 검출하는데 real-time PCR 방법을 이용하면 유전자들을 검출하는데 있어서 가장 정확하고 민감하고 또한 빠른 시간에 검사가 가능한 방법이라 하였다(Chia 등, 2005). 본 실험 결과 표현형적 방법으로 분리된 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 11균주 중 A3, A4, A6균주의 경우 DDS결과가 음성으로 나타났다. 일반 PCR결과 A3균주만 음성으로 나타났고 나머지 균주는 SHV만유전자를 가지고 있었고, real-time PCR결과 모두 양성으로 나타났다. A4, A6균주의 경우 DDS결과는 음성으로 나타났으나 SHV유전자 검출에서 양성으로 나타났고 real-time PCR에서 모두 양성으로 나타나 다른 ESBL 유전자자형에 대한 연구가 필요하다.

## 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  $\beta$ -Lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 43:4486-4491, 2005.
3. Fortin NY, Mulchandani P, Chen AW. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Biochem* 289:281-288, 2001.
4. 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.
5. 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.
6. Karch H, Meyer T. Single primer for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:2751-2757, 1989.
7. 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.
8. 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.
9. McKillip JL, Drake M. Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J Food Prot* 63:855-859, 2000.
10. 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.
11. 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.
12. 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.