Biomedical Science Letters 2019, 25(3): 288~292
https://doi.org/10.15616/BSL.2019.25.3.288
eISSN : 2288-7415

Brief Communication

# Antimicrobial Activities of Extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae

**Jong Hwa Yum†,***

*Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 47340, Korea*

*In vitro* antimicrobial activities of hot water extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) were compared to commonly used conventional antimicrobial agents. CRE was not only resistant to imipenem, meropenem or ertapenem, but also to various antimicrobial agents, such as amikacin (> 128 μg/mL). The hot water extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze had the lowest MIC (0.06~0.5 μL/mL) of the carbapenem-resistant *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *Enterobacter* spp. tested, and it was possible more potent than various conventional antimicrobial agents. Synergistic combinations of the extract with used commonly antimicrobial agents might even improve its antimicrobial chemotherapy property.

**Key Words:** *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Enterobacteriaceae, Carbepenem resistant, Catechin, Antimicrobial agent

Carbapenem은 그람음성 세균에 우수한 약제로 알려져 있다. 국내에서 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)는 흔히 검출되는 Enterobacteriaceae 중 위중한 감염증을 일으키기도 하며, CRE 감염환자의 치료가 어렵다(Shin et al., 2018; Kim and Park, 2018; Kang et al., 2019). 적절한 치료가 시행되지 않은 것도 문제가 되지만, 원내감염의 증가 등의 이유로 다양한 약제 내성 Enterobacteriaceae 감염환자의 사망율도 증가하고 있다(Tellado et al., 2007; Raman et al., 2015; Bonine et al., 2017; Zilberberg et al., 2017). 따라서, 새로운 약제 탐색 및 병합요법 등의 방법 개발이 필요하다.

*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze는 catechins (C), (−)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (−)-epigallocatechin (EGC), (−)-epicatechin-3-gallate (ECG) 그리고 (−)-epicatechin (EC)과 같은 주요 플라보노이드를 갖고 있다(Cabrera et al., 2006; Zaveri, 2006). 이들 catechin 화합물은 열을 가하면, (−)-catechin (c), (−)-gallocatechin (GC), (−)-catechin gallate (CG), 그리고 (−)-gallocatechin gallate (GCG)와 같은 이성체가 되기도 한다(Ikeda et al., 2005). 이들 폴리페놀 화합물과 플라보 화합물은 흔히 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Sajilata et al., 2008). 특히, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze의 (−)-epigallocatechin gallate와 (−)-epicatechin gallate는 그람음성 세균과 그람양성 세균에 성장을 억제한다고 알려져 있다(Gulati et al., 2003; Taylor et al., 2005).

본 연구에서는 국내에서 분리된 carbapenem 내성 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* 및 *Enterobacter* spp.에 대한 항균제 내성 양상을 분석하고, 이들 세균에 대한 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze로부터 얻은 열수추출물의 항균 효과를 분석하고자 하였다.

임상에서 분리된 carbapenem 내성인 *E. coli* 7주, *K. pneumoniae* 16주, *Enterobacter cloacae* 4주 그리고, *Enterobacter aerogenes* 1주를 대상으로 시험하였으며, 균종 동정은 전통

Received: August 20, 2019 / Revised: September 2, 2019 / Accepted: September 9, 2019

*Professor.
†Corresponding author: Jong Hwa Yum. Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 47340, Korea.
Tel: +82-51-890-2682, Fax: +82-505-182-6877, e-mail: auxotype@deu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

적인 방법과 16S rDNA 염기서열분석을 이용하였다(Loffler et al., 2000). *E. coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853를 항균제 감수성 시험에 참조 균주로 사용하였다.

건조 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 잎 300 g을 3 L DW.에 50~70℃에서 24시간 동안 열수추출한 후, 100 mL로 농축한 열수추출물을 -70℃에 보관하여 시험에 사용하였다. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 열수추출물을 빈 디스크에 0 μL, 1 μL, 3 μL, 5 μL, 10 μL, 15 μL, 그리고 20 μL 씩 적시고 건조시켜 시험 세균에 대한 항균력 시험에 사용하였다.

Carbapenem 내성 Enterobacteriaceae (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae; CRE)의 검출은 디스크확산법으로 imipenem, meropenem, 혹은 ertapenenm에 내성인 균주를 선별하였다. 이들 CRE 중 carbapenemase에 의한 내성균과 porin 소실이나, efflux pump에 의한 내성균을 구별하기 위해 Lee 등이 보고한 방법으로 Hodge 변법을 시행하였고, metallo-β-lactamases (MBLs) 생성 균주와 serine-carbapenemases 생성 균주를 구별하기 위해 sodium mercaptopropionic acid (SMA) double disc synergy (DDS) 시험을 시행하였다 (Lee et al., 2004).

항균제 최소억제농도 시험(Minimal inhibitory concentration; MIC)은 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017)의 권장에 따라, 항균제 감수성 시험은 $10^4$ colony forming units의 접종액을 Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, USA)에 접종하고 18시간 동안 배양하여 고체한천희석법으로 시험하였다. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 열수추출물의 MIC 시험은 고체한천희석법으로 시행하였으며, Mueller-Hinton agar 당 8 μL 열수추출물을 제조하여 0.008 μL/mL까지 2단계 연속 희석하여 시행하였다. 그 외 방법은 CLSI의 권장에 따라 시행하였다.

시험에 사용한 항균제는 amoxicillin (Kun Wha Pharmaceuticals, Korea), piperacillin (Wyeth, USA), cephalothin (Sigma Chemical Co., USA), ceftazidime (GlaxoSmithKline, UK), cefotaxime (Handok, Korea), cefoxitin과 imipenem (Merck Sharp & Dohme, USA), aztreonam과 cefepime (Bristol-Myers Squibb, USA), meropenem (Sumitomo, Japan), tetracycline (Sigma Chemical, St. Louis, MO), amikacin (Dong-A Pharmaceutical, Seoul, Korea), gentamicin과 chloramphenicol (Chong Kun Dang, Seoul, Korea), 그리고 ciprofloxacin (Bayer Korea, Seoul, Korea)이다.

*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 열수추출물을 디스크확산법을 이용한 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대한 감수성 시험에서 농도가 증가함에 따라 시험 세균의 억제대가 증가하여 이들 세균에 대한 항균력을 확인하였다(Fig. 1).

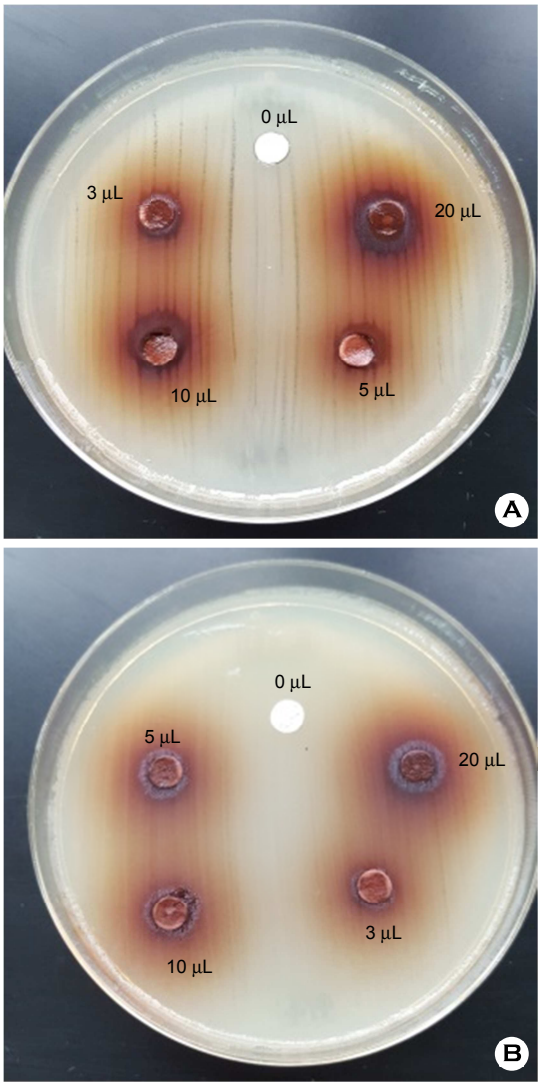


**Fig. 1.** The result of antibacterial effect screen test for water extracts of *Camellia sienensis* (L.) O. Kuntze for *E. coli* (A), and *K. pneumonia* (B) using disk diffusion test.

임상에서 분리된 CRE 28주는 소변 검체에서 *E. coli* 2주와 *K. pneumoniae*가 8주로 총 10주가 분리되어 가장 많은 분리율을 보였고, 다음으로 객담 검체에서 *E. coli* 1주, *K. pneumoniae* 5주, *E. cloacae* 4주, *E. aerogenes*가 1주로 총 8주가 분리되었고, 그 외 혈액 검체 등에서 10주가 분리되었다(Table 1). Hodge 변법 시험에서 *E. coli* 1주, *K. pneumonia* 6주, 그리고 *Enterbacter* spp. 4주로 총 11주가 양성으로

**Table 1.** Specimens with isolates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

| Isolates (No. of isolates) | No. of specimens | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sputum | Urine | Blood | Catheter tip | Bile | Fluid |
| *E. coli* (7) | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| *K. pneumoniae* (16) | 5 | 8 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| *E. cloacae* (4) | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| *E. aerogenes* (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Total | 8 | 10 | 5 | 1 | 2 | 2 |

**Table 2.** MICs of antimicrobial agents and *Camellia sienensis* (L.) O. Kuntze hot water extract for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates

| Isolates (No. of isolates) | MIC range (μg/mL)[a] | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Camellia sienensis* (L.) O. Kuntze hot water extract (μL/mL) | IPM | MEM | AZT | CEP | CTX | CAZ | FEP |
| *E. coli* (7) | 0.12~0.5 | 1~64 | 0.12~8 | 128~>128 | >128 | >128 | 128~>128 | 16~>128 |
| *K. pneumoniae* (16) | 0.12~0.5 | 1~64 | 0.25~32 | 64~>128 | >128 | 128~>128 | 128~>128 | 32~>128 |
| *Enterobacter* spp. (5) | 0.06~0.25 | 1~8 | 0.25~2 | 128~>128 | >128 | 32~>128 | 128 | 2~>128 |
| Total (28) | 0.06~0.5 | 1~64 | 0.12~32 | 64~>128 | >128 | 32~>128 | 128~>128 | 2~>128 |

| Isolates (No. of isolates) | MIC range (μg/mL)[a] | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | FOX | PIP | TET | AMK | GM | CM | CIP |
| *E. coli* (7) | >128 | 256~>256 | 1~>128 | >128 | ≤0.5~>128 | 8~128 | 64~>128 |
| *K. pneumoniae* (16) | 64~>128 | 256~>256 | 2~>128 | >128 | ≤0.5~>128 | 8~128 | 32~>128 |
| *Enterobacter* spp. (5) | >128 | 16~>256 | 1~>128 | >128 | ≤0.5~>128 | 8~64 | 1~128 |
| Total (28) | 64~>128 | 16~>256 | 1~>128 | >128 | ≤0.5~>128 | 8~128 | 1~128 |

[a] IMP, imipenem; MEM, meropenem; AZT, aztreonam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CEP, cephalothin; FOX, cefoxitin; AMX, amoxicillin; PIP, piperacillin; TET, tetracycline; AMK, amikacin; GM, gentamicin; CM, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin

나타나, 시험에 사용한 균주는 효소에 의한 carbapenem 내성을 보이는 균주가 11주(39.3%)이고, porin 소실이나, efflux pump에 의한 내성 균주는 17주(60.7%)로 나타났다 (data not shown). Sodium mercaptopropionic acid (SMA) double disc synergy (DDS) 시험에서는 양성을 보이는 균주가 없어 MBL에 의한 carbapenem 내성 균주는 없었다. Lee 등의 의하면 국내 MBL 생성 *P. aeruginosa*와 *A. baumanni*가 높은 비율로 검출되는 것으로 보고하였으나(Lee et al., 2004), 이들 Enterobacteriaceae 간에 MBL에 의한 내성 수평전달은 아직 드문 것으로 보이며, CRE가 검출된 이래로 시기와 지역에 따라서는 CPE 출현율에 차이가 있을 수 있는 것으로 보인다.

CRE에 대한 항균제의 MIC는 imipenem 1~64 μg/mL, meropenem 0.12~32 μg/mL를 보였고, cephalothin >128 μg/mL, ceftazidime은 128~>128 μg/mL, cefotaxime 32~>128 μg/mL로 나타나, carbapenem에 내성일 뿐 아니라, 다른 종류의 β-lactam제제에도 높은 MIC를 보였다. 또한 다른 계열의 항균제의 MIC도 amikacin >128 μg/mL, ciprofloxacin 1~128 μg/mL로 나타나 비교적 높은 MIC 값을 보였고 (Table 2), 따라서 다제 내성 Enterobacteriaceae가 출현하는 것을 알 수 있었다. 한편, *E. coli* 7주와 *K. pneumoniae* 16주에 대한 *Camellia sienensis* (L.) O. Kuntze 열수추출물의 MIC는 0.12~0.5 μl/ml, *Enterobacter* spp. 5주에 대해서는 0.06~0.25 μL/mL로 나타나 비교적 낮은 값을 보였다.

Carbapenem은 그람음성 막대균에 우수한 약제로 알려져 있으나, carbapenem에 내성을 보이는 *E. coli*, *K. pneumonia* 그리고 *Enterobacter* spp.와 같은 CRE는 흔히 요로감염 등 감염환자 치료에 어려움을 보인다. Friedman과

Toda 등은 그람양성 세균과 그람음성 세균은 catechin에 감수성이 있음을 시사한 바 있다(Toda et al., 1989; Toda et al., 1990; Friedman et al., 2006). 본 연구에서 CRE는 imipenem과 meropenem뿐 아니라 다양한 약제에 대해 내성을 보이고 있으나, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 열수추출물에 대해 낮은 MIC를 보이고 있어 치료 효과가 다소 있을 것으로 기대된다. 또한, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze의 플라보 화합물은 매우 높은 농도에서 동물에 대한 독성이 없음을 밝힌 바 있다(Bandyopadhyay et al., 2005).

*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze에서 얻은 열수추출물에는 catechin 등과 같은 페놀 화합물들을 함유하고 있고, catechin 화합물과 열을 가하면 생성되는 이들 이성체들이 CRE에 대한 항균력을 보이므로, 이들 유도체에 의한 높은 항균활성 물질을 탐색하거나, 상품화된 항균제와 병합요법을 사용한다면 난치성 CRE 감염 치료에 도움이 될 것으로 보인다.

**ACKNOWLEDGEMENT**

균주 수집에 도움을 주신 김윤식 선생님에게 감사드립니다.

**CONFLICT OF INTEREST**

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## REFERENCES

Bandyopadhyay D, Chatterjee TK, Dasgupta A, Lourduraja J, Dastidar SG. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial action of tea: The commonest beverage of asia. Biol Pharm Bull. 2005. 28: 2125-2127.

Bonine NG, Berger A, Altincatal A, Wang R, Bhagnani T, Gillard P, Lodise T. Associations between timeliness of therapy and clinical and economic outcomes among patients with serious infections due to gram-negative bacteria (GNB): how much does delayed appropriate therapy (DAT) matter? Open Forum Infect Dis. 2017. 4: S283-284.

Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea - A review. J Am Coll Nutr. 2006. 25: 79-99.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; approved standards M2-A8, 27th ed. Wayne PA: CLSI. 2017.

Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against Bacillus cereus. J Food Protect. 2006. 69: 354-361.

Gulati A, Rawat R, Singh B, Ravidranath SD. Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea. J Agri Food Chem. 2003. 51: 4764-4768.

Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Unno T, Tomoyori H, Goto H, Kawata Y, Imaizumi K, Nozawa A, Kakuda T. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. J Nutr. 2005. 135: 155-159.

Kang JS, Yi J, Ko MK, Lee SO, Lee JE, Kim KH. Prevalence and Risk Factors of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Acquisition in an Emergency Intensive Care Unit in a Tertiary Hospital in Korea: a Case-Control Study. J Korean Med Sci. 2019. 34: e140.

Kim YA, Park YS. Epidemiology and treatment of antimicrobial resistant gram-negative bacteria in Korea. Korean J Intern Med. 2018. 33: 247-255.

Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, Yong D, Chong Y; Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance (KONSAR) group. Metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseodomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004. 50: 51-58.

Loffler F, Sun Q, Li J, Tiedje JM. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating Desulfuromonas and Dehalococcoides species. Appl Environ Microbiol. 2000. 66: 1369 -1374.

Raman G, Avendano E, Berger S, Menon V. Appropriate initial antibiotic therapy in hospitalized patients with gram-negative infections: systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2015. 15: 395.

Sajilata MG, Bajaj PR, Singhal RS. Tea polyphenols as nutraceuticals. Comp Rev Food Sci Food Safety. 2008. 7: 229-254.

Shin S, Jeong SH, Lee H, Hong JS, Park MJ, Song W. Emergence of multidrug-resistant *Providencia rettgeri* isolates co-producing NDM-1 carbapenemase and PER-1 extended-spectrum β-lactamase causing a first outbreak in Korea. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2018. 17: 1-6.

Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci Technol Bull. 2005. 2: 71-81.

Tellado JM, Sen SS, Caloto MT, Kumar RN, Nocea G. Consequences of inappropriate initial empiric parenteral antibiotic therapy among patients with community-acquired intra-abdominal infections in Spain. Scand J Infect Dis. 2007. 39: 947-955.

Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. Lett Appl Microbiol. 1989. 8: 123 -125.

Toda M, Okubo S, Ikigai H, Shimamura T. Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives. Jap J Bacteriol. 1990. 45: 561-566.

Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and non cancer applications. Life Sci. 2006. 78: 2073-2080.

Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. BMC Infect Dis. 2017. 17: 279.

https://doi.org/10.15616/BSL.2019.25.3.288

**Cite this article as:** Yum J. Antimicrobial Activities of Extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze and Profile of Antimicrobial Agents Resistance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Biomedical Science Letters. 2019. 25: 288-292.