

임상에서 분리된 CTX-M형 Extended-Spectrum β -Lactamases를 생산하는 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 유행

김윤태 · 김태운*

부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과

Prevalence of CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in General Hospitals in 2005. Kim, Yun-Tae and Tae-Un Kim*. Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea – The aim of this study was to survey susceptibilities of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates against cefotaxime and to determine the prevalences of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Korea. During the period of February to July, 2005, 153 *E. coli* and 52 *K. pneumoniae* isolates were collected from 2 hospitals in Busan. Antimicrobial susceptibilities to cefotaxime were tested by the disk diffusion method. ESBL production of *E. coli* and *K. pneumoniae* was determined by the double disk synergy test. MICs of β -lactam antibiotics were determined by the agar dilution method. *bla*_{CTX-M} genes of the organism were detected by PCR. Among 153 isolates of *E. coli* and 52 isolates of *K. pneumoniae*, 27 (17.6%) and 25 (48.0%) were intermediate or resistant to cefotaxime, respectively. Twenty-three (15.0%) isolates out of 153 *E. coli* and 13 (25.0%) out of 52 *K. pneumoniae* isolates showed positive results for ESBL by the double disk synergy test. Twenty isolates out of 23 ESBL producing *E. coli* and 12 out of 13 ESBL producing *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{CTX-M} gene, 11 of ESBL producing *E. coli* and 2 of ESBL producing *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{TEM} gene, and 1 of the ESBL producing *E. coli* and 12 of ESBL producing *K. pneumoniae* isolates harbored *bla*_{SHV} gene. *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates producing CTX-M-type ESBLs were not uncommon in Korea. It is thought that continuous survey are necessary for inspecting the spread and novel variants of CTX-M-type ESBL genes. Further more investigation and research on ESBL producing strains are needed in order to prevent the spread of resistant bacteria.

Key words: CTX-M type, extended-spectrum β -lactamases, *E. coli*, *K. pneumoniae*, double disk synergy test

*E. coli*와 *Klebsiella pneumoniae*는 장내세균과에 속하는 세균으로서 자연계에 널리 분포되며 사람의 대장내 상재균총을 형성하며 상기도, 구강 등에도 존재한다[27]. 또한 이들 균주는 병원감염의 흔한 원인균이며 요로감염, 패혈증, 창상감염 등을 유발한다[11]. 이러한 세균의 감염증 치료에 현재 임상에서 β -lactam 항균제로서 cephalosporin계 항생제가 많이 사용되고 있다. 특히 광범위 항생제라 불리며 3세대 cephalosporin으로서 그람음성간균의 감염증에 많이 사용되고 있는 데 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 등이 여기에 속한다[14, 15]. 그런데 이들 광범위 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한 *E. coli*나 *K. pneumoniae* 등이 출현하여 감염증치료가 어려워져 심각한 사회 문제가 되고 있다[16]. 최근에 이러한 광범위 β -lactam 항균제에 내성을 일으키는 원인이 ESBL(Extended spectrum β -lactamase)이라는 효소인 것이 밝혀졌다. ESBL이란, 세균이 생성하는 효소로

서 Extended spectrum(광범위) β -lactam 항생제를 무력화시킨다[4]. 1980년대에 ESBL을 생성하는 균주가 처음 보고된 이후로 현재까지 꾸준히 증가하고 있다[25]. ESBL을 생성하는 균주가 항생제 대한 내성을 획득 하는 기전은 다양한데, plasmid에 매개되는 Ambler class A extended-spectrum β -lactamase(ESBL)의 생성에 관한 것이 가장 흔한 기전이다[36]. Ambler class는 80년대에 들어서 아미노산 서열에 근거해서 A부터 D까지의 네 가지로 대별한 Ambler의 분류법이다. 이 분류법은 β -lactamase의 분류법으로서 표준으로 인정되고 있는 Bush 분류법과 대부분이 일치함을 보이고 있지만 아미노산 서열과 효소유전자의 상동성으로 분류한다는 것이 큰 차이점이다[5]. 가장 널리 알려진 Ambler class A ESBL인 TEM형 및 SHV형 효소는 TEM-1, TEM-2와 SHV-1 효소의 아미노산에 1개 이상의 치환이 생성됨으로써 나타나며, 현재까지 100가지 이상의 TEM형 ESBL과 50가지 이상의 SHV형 ESBL이 보고 되었다[16, 23]. 그 후 현재까지 다양한 ESBL유전형이 보고 되고 있고 앞으로도 계속 변이된 효소가 생길 것으로 생각되며, 최근에는 그 분리빈도가 우리나라를 포함한 세계 여러 나라에서 증가하고 있어

*Corresponding author

Tel: 82-51-510-0562, Fax: 82-51-510-0568

E-mail: tukim@cup.ac.kr

서 문제가 되고 있다[6, 7, 19]. TEM형은 1960년대 초에 그리스에서 Temoniera라는 폐혈증환자의 검체에서 분리된 *K. pneumoniae*로 부터 처음으로 검출되어 보고 되었다. 그래서 이 환자의 이름을 따서 TEM형이라고 불려졌다[4]. SHV형은 sulphhydryl variable의 약자로 표시한 것인데 주로 *K. pneumoniae*의 chromosome에 존재한다. 하지만 plasmid에 매개되어 자주 *E. coli*에서 발견된다[4]. 또한 근래에는 CTX-M형에 대한 보고도 증가되고 있다[9]. CTX-M형은 1986년에 일본에서 non-TEM, non-SHV형이 처음 발견 되었는데 이때 β -lactam 항생제를 연구하기 위해 사용한 개의 변이로부터 분리한 *E. coli* 균주에서 처음으로 검출되었다. 이 CTX-M형 ESBL은 cefotaxime에 강한 내성을 보였다. 그래서 이 cefotaxime 항생제의 이름을 따서 CTX-M이라고 명명하였다[2].

CTX-M형 ESBL 역시 plasmid에 매개되며, 가수분해 기질특이성 및 억제특이성이 TEM형이나 SHV형 ESBL과 유사하지만, cefotaxime에 대한 가수분해활성이 ceftazidime에 비해 상대적으로 강한 특성이 있다[4]. 1996년 Bauernfeind 등[1]에 의해 CTX-M-1과 CTX-M-2가 보고된 이후 현재까지 30여종이 알려졌다[4]. 국내에서는 2001년 CTX-M-14 생성 *K. pneumoniae*, *E. coli* 및 *Shigella sonnei*가 보고되었으며[33], 2002년 전국의 13개 병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 한 CTX-M형 ESBL의 생성빈도 조사에서 CTX-M-3 생성 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 2주, CTX-M-15 생성 *E. coli* 2주, CTX-M-14 생성 *E. coli* 2주와 *K. pneumoniae* 2주가 분리된 바 있다[18].

CTX-M형 ESBL은 TEM형이나 SHV형 ESBL과 구분되는 새로운 효소군으로 분리빈도와 유형이 증가하고 있고 국내에서의 연구도 일부에서 진행되고 있다. 본 연구에서는 2005년 부산의 종합병원에서 분리된 cefotaxime 중간 혹은 내성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 대상으로 CTX-M형 ESBL의 생성현황을 조사하고 효소의 유전형질을 규명 하였다. 그리고 이 효소를 생성하는 균주의 항생제 내성 특성을 분석하여 이들 균주로 인한 감염증치료와 역학적 조사연구에 도움이 되고자 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

대상 균주

2005년 7월-12월에 부산에 소재하고 있는 2개의 종합병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 각각 153주, 52주를 수집하였는데, 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 그 중에서 ESBL을 생성 하는 *E. coli* 23주와 *K. pneumoniae* 13주를 분리하여 실험하였다. 균주의 동정은 Vitek system GNI card(bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., U.S.A.)로 확인하였다.

Antimicrobial Susceptibility Test by Disk Diffusion Method

미국의 National Committee for clinical Laboratory clinical Standards(NCCLS)의 기준에 따라서 cefotaxime에 대한 감수성을 디스크 확산법[28]으로 확인하였다. 결과의 정확성을 위하여 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

Double Disk Synergy Test

Cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주를 대상으로 double disk synergy법으로 확인하였다[17]. 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton한천에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 amoxicillin-clavulanic acid(20/10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BBL, Cockeysville, Mich., U.S.A.), 주위에는 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 cefotaxime, ceftazidime 및 ceftriaxone 디스크를 놓았다. 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 2 cm가 되게 하였다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였는데, 두 디스크 사이에서 상승효과에 의한 억제대의 확장현상이 관찰되면 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

Measurement of Minimal Inhibitory Concentration by Agar Dilution Method

NCCLS 한천희석법으로 시험하였다[29]. 시험 항균제로는 cefotaxime(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), ceftazidime(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Glaxo Wellcome, Stevenage, United Kingdom), ceftriaxone(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Betchworth, United Kingdom)을 사용하였다. 시험균주 105 colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 mg/L 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 Steers replicator(Craft Machine, Chester, Pa.,

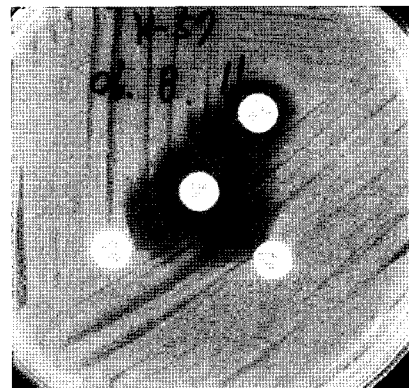


Fig. 1. Double disk synergy test of strain 50836. Assessment of antimicrobial synergy of ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone (three disk of the periphery) and clavulanic acid (disk of the center). ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* strain shows positive double disk synergy between disks containing three antibiotics.

U.S.A.)로 접종하였다. 37°C 호기성 환경에서 18시간 배양 후 항균제 농도에 따른 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 정도관리를 위해서 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

Measurement of *pl* by Isoelectric Focusing (IEF)

세균 추출액 10 µL와 동량의 sample buffer(TEFCO Corporation, Tokyo, Japan)를 섞어 agarose gel(pH 3-10, TEFCO Corporation)에 100 V로 1시간, 200V로 1시간 및 300 V로 40분간 전기영동하였다. Nitrocefin(Oxoid, Hampshire, England)에 적신 여과지로 gel을 덮고 20초간 염색하였다. Gel에 나타난 붉은색의 band를 관찰하여 β-lactamase의 *pl*를 확인하였다.

ESBL Gene Detection by PCR (Polymerase Chain Reaction)

ESBL 효소를 생성하는 유전형을 분석하기 위하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 시험균주를 TSB 액체배지 (tryptic soy broth)에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였으며, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 AccPrep® plasmid extraction kit(Bioneer Seoul Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 사용한 primer는 Table 1에 나타내었고 시약은

AccuPower[®]PCR Premix kit(BIONEER Co. Ltd. Seoul, Korea)를 사용하였다. Primer(10 pmol)를 각각 1 µL, template DNA 8 µL, 3차 증류수 10 µL를 가하여 총량이 20 µL 되게 맞춘 후 사용하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400(Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., U.S.A.)를 사용하였다. TEM type의 PCR 반응 조건은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 45°C에서 90초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. SHV type은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. CTX-M type은 predenaturation 94°C에서 5분간 시행 후 denaturation 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 60초, extension 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72°C에서 3분으로 하였다. 반응이 끝난 PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 100 volt로 30분간 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 U.V. transilluminator로 생성분획을 확인하였다(Fig. 2).

DNA Sequencing

PCR에 의하여 증폭된 산물의 염기서열을 분석하여 유전

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used PCR in this study.

Name	Nucleotide Sequence	product size (bp)	GenBank Accession
TEM F ¹⁾ TEM R ²⁾	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	A13194682
SHV F SHV R	5'-TCGTTATGCGTTATATTCGCC 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	861	AY826416
CTX-M F CTX-M R	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG 5'-ACCGCGATATCGTTGGT	551	X92506

¹⁾Forward; ²⁾Reverse

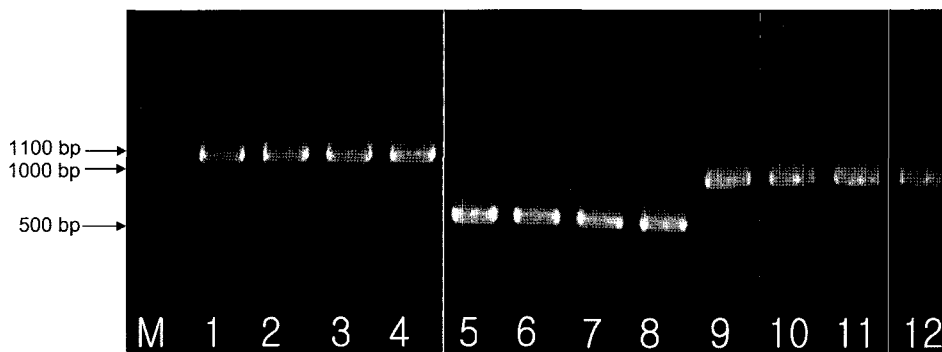


Fig. 2. Detection of amplified products of *bla*_{TEM} genes, *bla*_{SHV} genes and *bla*_{CTX-M} genes. Lanes 1~4; *bla*_{TEM} genes, Lanes 5~8; *bla*_{CTX-M} genes, Lanes 9~12; *bla*_{SHV} genes. Lane 1; 50806, lane 2; 50812, lane 3; 50814, lane 4; 50839, lane 5; 50805, lane 6; 50810, lane 7; 50815, lane 8; 50821, lane 9; 50804, lane 10; 50807, lane 11; 50808, lane 12; 50809, M; size marker.

형을 규명하였다. PCR에 의한 증폭산물을 DNA extraction kit(Qiagen, Hiden, Germany)로 agarose gel에서 분리 후, dideoxy-mediated chain termination법[21]으로 fully automatic ABI PRISM 3730 DNA analyzer(Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

항균제 감수성 양상

부산시내에 있는 2개 일반종합병원에서 수집한 *E. coli* 153주와 *K. pneumoniae* 52주 중 *E. coli* 23주(15.0%)와 *K. pneumoniae* 13주(25.0%)가 cefotaxime에 중간 혹은 내성이 있었다(Table 2).

ESBL 생성 확인

A병원의 13주와 B병원의 10주로 총 23주의 *E. coli* (15.0%)와 A병원의 7주와 B병원의 6주로 *K. pneumoniae* 13주(25.0%)가 double disk synergy test 양성으로 ESBL 생성균주로 판정하였다(Table 2). 근래 중증감염을 일으키는 *E. coli*나 *K. pneumoniae* 중에 ESBL 생성균이 증가하고 있으며, ESBL 유전자는 plasmid에 의해 다른 균종으로 전달될 수 있고 원내감염을 일으킬 수 있기 때문에 심각한 문제가 되고 있다[10]. 송 등[37]의 전국적인 조사에 의하면 우리나라의 ESBL생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*도 중환자실 환자에서 분리율이 높았고, 다른 항균제에 대한 내성률이 ESBL 비생성 균주에 비해 높다고 하였다. 임상 분리주에서 ESBL 생성률과 유형은 나라 및 조사기관에 따라 다르다. 네덜란드의 경우 1999년도의 발표에 의하면 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 1%만이 ESBL 유전자를 가지고 있었고[38], 미국은 기관에 따라 0-25%로 다양하나 전체적으로 3%의 장내세균이 ESBL을 생성하였으며, 반면 프랑스의 경우는 분리된 *K. pneumoniae*의 약 40%가 ceftazidime에 내성을 보인다고 하였다[41]. 우리나라와 인접한 일본은 *E. coli*의 0.1%, *K. pneumoniae*의 0.3%만이 ESBL을 생산하였다고 보고하였다[42]. 병원의 규모가 크거나 대학병원일수록 ESBL 생성균주의 분리율이 높다는 보고가 있다[13]. 우리나라의

경우 그 비율은 균종, 병원 및 분리연도에 따라 달랐지만, 대체로 *E. coli*는 9.1%, *K. pneumoniae*는 29.2%로 적지 않게 보고되었다[13]. 본 연구에서는 대학병원이 아닌 500병상 정도의 2개의 일반종합병원 환자에서 분리된 *E. coli* 와 *K. pneumoniae* 중 ESBL 생성균주의 비율이 *E. coli* 15.0 %로 전국 평균보다 높았고, *K. pneumoniae*는 25.0%로 전국 평균보다 약간 낮게 나타났다. Cefotaxime에 강한 내성을 보이는 CTX-M형 ESBL은 주로 *E. coli* 에서 많이 검출된다[26]. 본 연구에서 *E. coli* 가 전국 평균보다 다소 높게 나타난 것은 cefotaxime에 내성인 균주를 우선적으로 선택한 결과가 아닌가 생각된다.

Double disk synergy 시험은 TEM 및 SHV형 ESBL이 clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성을 이용한 것으로, 이 효소를 생성하는 세균의 검출에 널리 사용되고 있다[8]. 본 연구에서는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 디스크와 clavulanic acid 디스크를 사용하여 double disk synergy 시험을 시행하여 ESBL 생성 균주의 동정을 확인하였다. 위의 3세대 cephalosporin 디스크 중 한 가지 디스크에서라도 synergy 현상이 나타난 균주를 양성으로 판정하였다. 실험한 결과는 실험 대상 36균주 모두가 double disk synergy 시험 양성으로 나타났다.

***bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} Gene Detected by Polymerase Chain Reaction**

ESBL 생성 36균주를 대상으로 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 유전자 검출을 위한 PCR을 시행한 결과 *bla*_{TEM} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{SHV} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{CTX-M} 유전자는 32주(88.9%)가 양성반응을 보였다. 36균주 중 *bla*_{TEM} 만 가지고 있는 균주는 2주(5.6%), *bla*_{SHV}만 가지고 있는 균주는 1주(2.8%), *bla*_{CTX-M} 만 가지고 있는 균주는 12주(33.3%), 그리고, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 1주(2.8%), *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 9주(25.0%), *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 10주(27.8%) 였고, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 유전자 세 가지를 모두 가지고 있는 균주는 1주(2.8%)였다(Table 3).

현재까지 알려진 장내세균이 생성하는 ESBL의 유형은 매우 다양하게 나타나지만 대체적으로 TEM형과 SHV형이 주로 검출되며 그 다음으로 CTX-M형이 많이 검출된다[22]. 국내에서 분리되는 ESBL 생성 장내세균 중에는 SHV형을 생성하는 세균이 많았다는 김 등의 보고가 있다[20]. 2005년의 김 등의 보고[20]에서는 *bla*_{TEM} 64.6%(42/65), *bla*_{SHV} 70.8%(46/65), *bla*_{CTX-M} 44.6%(29/65)로 나타나서 *bla*_{SHV} 유전자가 가장 많이 검출되었다. 본 연구에서는 *bla*_{TEM} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{SHV} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{CTX-M} 유전자는 32주(88.9%)가 양성반응을 보여서 *bla*_{CTX-M} 유전자가 가장 많이 나타나서 2005년의 보고와는 다른 양상을

Table 2. Rates of ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates.

Locations	species	No. of Isolates	No.(%)	
			CTX ¹⁾ I/R ²⁾	DDS ³⁾ positive
A hospital	<i>E. coli</i>	78	14(17.9)	13(16.7)
	<i>K. pneumoniae</i>	27	7(25.9)	7(25.9)
B hospital	<i>E. coli</i>	75	10(13.3)	10(13.3)
	<i>K. pneumoniae</i>	25	6(24.0)	6(24.0)

¹⁾Cefotaxime; ²⁾Intermed/resistant; ³⁾Double disk synergy

Table 3. The presence of ESBL genes and pI in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates.

ESBL gene type	Number of isolates (%)	Number of strains	pI ¹⁾
only TEM	2(5.6)	50814, 50837	5.4, 6.0
only SHV	1(2.8)	50821	7.6
only CTX-M	12(33.3)	50804, 50807, 50808, 50809, 50811, 50813, 50816, 50822, 50825, 50826, 50827, 50838,	8.4, 8.6
TEM+SHV	1(2.8)	50828	5.4, 7.6,
TEM+CTX-M	9(25.0)	50806, 50812, 50829, 50831, 50832, 50833, 50834, 50835, 50839,	5.4, 8.4, 8.6
SHV+CTX-M	10(27.8)	50805, 50810, 50815, 50817, 50818, 50819, 50820, 50823, 50824, 50830	7.6, 8.6
TEM+SHV+CTX-M	1(2.8)	50836	5.4, 7.6, 8.6
Total		36	

¹⁾Protein isoelectric focusing

보였다. 또한, 2005년의 보고[20]에서는 단일 유전자만을 가진 균주가 29.2%(19/65)였고, 두 가지이상의 복합내성유전자를 가진 균주가 66.2%(43/65)로 많이 나타났다고 하였는데 본 연구에서는 *bla*_{CTX-M}의 단일 유전자를 가지고 있는 균주가 12주(33.3%)로 가장 많이 나타났다. 이는 *bla*_{CTX-M}의 내성유전자가 빠른 속도로 확산되고 있음을 나타내는 것이라고 생각된다. 그리고, 복합내성유전자를 가진 균주 중에서도 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 1주(2.8%)만 나타났고 *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 9주(25.0%), *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주가 10주(27.8%)로 나타나 *bla*_{CTX-M}을 포함하는 복합유전자가 많이 증가함을 알 수 있었다.

ESBL 유전형과 Isoelectric Focusing

ESBL유전형의 검출을 위한 PCR에 *E. coli* 23주 중 TEM형이 11주, SHV형이 1주, CTX-M형이 21주가 양성으로 나타났다. *K. pneumoniae*는 13주 중 TEM형이 2주, SHV형이 12주, CTX-M형이 11주가 양성으로 나타났다. TEM형 PCR에 양성인 *E. coli* 11주와 *K. pneumoniae* 2주의 증폭 산물 중 *E. coli* 9주와 *K. pneumoniae* 2주의 증폭 산물은 *bla*_{TEM-52}와 염기서열이 일치하였고, 나머지 *E. coli* 2주는 ESBL이 아닌 *bla*_{TEM-1}이었다(Table 4). SHV형 PCR에 양성인 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 12주의 증폭산물 중 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 11주가 *bla*_{SHV-12}와 염기서열이 일치하였고 *K. pneumoniae* 1주만이 *bla*_{SHV-2a}와 염기서열이 일치하였다(Table 5). CTX-M형 PCR에 양성인 *E. coli* 21주와 *K. pneumoniae* 11주의 증폭 산물 중 *E. coli* 1주에서 *bla*_{CTX-M-3}과 염기서열이 일치하였고, 나머지 *E. coli* 20주와 *K. pneumoniae* 11주는 *bla*_{CTX-M-15}와 염기서열이 일치하였다(Table 6). Isoelectric focusing을 통하여 TEM-1, TEM-52, SHV-12, CTX-M-3 및 CTX-M-15에 해당하는 pI 5.4, 6.0, 7.6, 8.4 및 8.6의 band를 확인할 수 있었다(Table 3). TEM형과 SHV형은 TEM-1, TEM-2, SHV-1의 아미노

Table 4. Amino acid substitutions of TEM type β -lactamase of ESBL producing strains.

β -lactamases	Number of isolates	Positions at amino acid		
		104	182	238
TEM-1	2	Glu	Met	Gly
TEM-52	11	Lys	Thr	Ser

Table 5. Amino acid substitutions of SHV type β -lactamase of ESBL producing strains.

β -lactamases	No. of isolates	Positions at amino acid			
		7	35	238	240
SHV-1	ND ¹⁾	Tyr	Leu	Gly	Glu
SHV-2a	2	Tyr	Gln	Ser	Glu
SHV-12	18	Tyr	Gln	Ser	Lys

¹⁾Not detected

Table 6. Amino acid substitutions of CTX-M type β -lactamase of ESBL producing strains.

β -lactamases	No. of isolates	Positions at amino acid				
		114	140	177	240	288
CTX-M-1	ND ¹⁾	Asp	Ser	Val	Asn	Asn
CTX-M-3	1	Asn	Ala	Ala	Asn	Asp
CTX-M-15	32	Asn	Ala	Ala	Gly	Asp

¹⁾Not detected

산 중 1-4개가 유전자의 점 변이(point mutation)에 의하여 다른 아미노산으로 치환됨으로써 TEM-1, TEM-2, TEM-3, SHV-1, SHV-2, SHV-3 등으로 새로운 형들이 출현하는 것으로 보고되었다[24]. ESBL 유전형은 국가에 따라 다른데, 프랑스에는 TEM-3, 미국에는 TEM-10, TEM-12 및 TEM-26, 그리스에는 SHV-5가 많은 것으로 알려졌으며[4], 우리나라에서는 TEM-52, SHV-2a, SHV-5, SHV-1 등이 많이 보고되었다[13].

TEM-52는 TEM-1의 세 군데의 아미노산(Glu104Lys, Met182Thr, Gly238Ser) 부위가 치환됨으로써 나타나는 형이며[34], 프랑스에서 분리된 *K. pneumoniae*에서 처음 검출되었으며, 국내에서 분리되는 장내세균에서도 흔히 나타나는 것으로 알려졌다[33]. 이번 연구에서는 TEM형 ESBL을 가진 13균주 중에서 11균주가 TEM-52로 나타나 상당히 많이 검출되었다. 이러한 결과는 본 연구자가 2004년도에 검출하였던 TEM형 9주 중에서 bla_{TEM-1} 을 가진 균주가 7주로 나타났었고, 2균주만이 bla_{TEM-52} 이었던 결과와는 다른 양상을 보였다. SHV-2a는 SHV-1의 아미노산 2개가 치환된(Leu35Gln, Gly238Ser) 것이며, 국내에서도 자주 보고되고 있는 데[21], 본 연구에서는 *K. pneumoniae* 1균주에서만 나타났다. SHV-12는 스위스에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에서 처음 검출되었다[31]. 이 효소는 SHV-1의 아미노산 3개가 치환된(Leu35Gln, Gly238Ser, Glu240Lys) 것이며, SHV-2a와는 아미노산 1개(Glu240-Lys)의 차이가 있다. SHV-12는 국내에서 분리되는 장내세균이 흔히 생성하는 것으로 알려졌는데[21], 본 연구에서도 *K. pneumoniae* 12균주가 이 효소를 생성하는 것으로 나타나 아직도 우리나라에서는 흔하게 보고되는 ESBL유전형이었다. CTX-M- β -lactamases는 TEM, SHV형 ESBL과는 다소 연관이 적은 것으로 보고되고 있으며, TEM, SHV형 ESBL gene과는 40% 이하의 homology를 갖고 있는 것으로 보고되었다[26]. CTX-M형 ESBL은 1989년 독일에서 분리된 *E. coli*에서 처음 발견되었으며, 이후 유럽, 남아메리카, 동아시아, 아프리카 등 전 세계 여러 국가에서 보고되었다[26]. CTX-M-3 ESBL은 1996년 폴란드에서 분리된 *E. coli*에서 처음 알려졌다[12]. 유럽, 동아시아, 남아메리카 등지에서 분리가 보고[40]된 바 있으며, 국내에서는 2003년에 *E. coli* 1주와 *K. pneumoniae* 2주에서 보고되었다[18]. 이 효소는 CTX-M-1의 아미노산 4개(Asp-114 Asn, Ser-140 Ala, Val-177 Ala, Asn-288 Asp)가 치환된 것이며, pI는 8.4이다. CTX-M-3 ESBL은 국내에서도 여러 번 보고[33]되었는데 이번 연구에서는 *E. coli* 1균주에서 나타났다. 본 연구자의 2004년도 연구에서는 $bla_{CTX-M-3}$ 은 검출되지 않았다.

CTX-M-15 ESBL은 2001년 인도에서 처음 분리된 것으로 아시아와 유럽을 중심으로 보고되고 있다[30]. 이 효소는 CTX-M-3의 240번째 아미노산 asparagine이 glycine으로 치환된 것[35]으로 β -lactamase의 pI는 8.6 이고, 국내에서 여러 번 발견된 바 있다[33].

본 연구에서는 CTX-M형으로 분류된 32주 중 31주가 CTX-M-15로 나타나서 2004년도에 10균주에서 나타났던 것보다 훨씬 많이 검출되었다. 이는 국내에서도 이 효소의 증가가 빠르게 진행되고 있음을 나타내주는 것 같다. Isoelectric focusing(IEF) 측정은 세균의 효소를 추출하여 단백전기영동을 실시하여 β -lactamase와 특이적으로 반응하는 nitrocefim으로 발색시켜 등전점을 관찰하는 것인데 각각의 유전형을 추

정할 수 있는 실험이다[32]. β -lactamase의 등전점(isoelectric point)은 각 유전형에서 다양하게 나타났는데 각 형별간의 등전점이 모호하여 분류하는 데 어려움이 있었지만 각 유전형간의 특징이 비교적 잘 나타났다.

ESBL 생성균주의 MIC 특성

TEM-52만을 생성하는 *E. coli*나 *K. pneumoniae*에 대한 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone의 MIC 범위는 각각 16 μ g/mL, 128 μ g/mL, 128 μ g/mL이었고, SHV-12만을 생성하는 *K. pneumoniae*는 위의 세 가지 약제에 대한 MIC 범위는 각각 16 μ g/mL, 256 μ g/mL 이상, 128 μ g/mL 이었다. CTX-M-15만을 생성하는 균주의 MIC 범위는 cefotaxime이 128-256 μ g/mL, ceftazidime이 8-128 μ g/mL이었고 ceftriaxone의 MIC 범위는 16-128 μ g/mL 이었다. TEM-52와 SHV-12의 두 가지의 유전자를 생성하는 *K. pneumoniae* 균주에 대한 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone의 MIC 범위는 각각 64 μ g/mL, 256 μ g/mL, 256 μ g/mL이었다 (Table 7).

CTX-M-15와 TEM-1의 두 가지 유전자를 가지는 균주의 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone에 대한 MIC 범위는 각각 256 μ g/mL, 8-16 μ g/mL, 16 μ g/mL이었고, CTX-M-15와 TEM-52의 두 가지 유전자를 가지는 균주의 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone에 대한 MIC 범위는 각각 256 μ g/mL, 64-256 μ g/mL, 32-256 μ g/mL이었다 (Table 7). 그리고 CTX-M-15와 SHV-12의 두 가지 유전자를 가지는 균주의 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone에 대한 MIC 범위는 각각 128-256 μ g/mL, 256 μ g/mL, 64-256 μ g/mL 이었고, CTX-M-15와 SHV-2a의 두 가지 유전자를 가지는 *K. pneumoniae*균주의 MIC 범위는 각각 128 μ g/mL, 128 μ g/mL, 64 μ g/mL 이었다(Table 7). CTX-M-3과 TEM-52의 두 가지 유전자를 가지는 균주의 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone에 대한 MIC 범위는 각각 256 μ g/mL, 128 μ g/mL, 32 μ g/mL이었고, CTX-M-15와 TEM-52, SHV-12의 세 가지 유전자를 동시에 가지는 균주의 cefotaxime과 ceftazidime 및 ceftriaxone에 대한 MIC 범위는 세 가지 항생제에 모두 256 μ g/mL 이상을 나타내었다 (Table 7). Plasmid 매개 CTX-M형 ESBL은 cefotaxime을 선택적으로 가수분해하며, *Salmonella*와 *E. coli*를 비롯한 장내세균에서 주로 발견된다[3]. 이 효소는 penicillin보다 cephalosporin에 대한 가수분해 활성이 강하며, cefotaxime에 대한 가수분해 활성이 ceftazidime에 비해 상대적으로 강한 특징이 있다[39].

본 연구에서는 부산의 2개 종합병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 CTX-M형 ESBL 생성균주의 선별대상을 cefotaxime에 중간 혹은 내성인 균주로 한정하였는데, 이는 이 효소를 생성하는 균주 대부분이 cefotaxime에 고도내성인 것으로 보고되었기 때문이다. 본 연구에서 검출된 CTX-

Table 7. MICs of CTX-M-type β -lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates.

No. of strains	CTX-M gene	Other gene product	MIC ¹⁾ (μ g/ml)			Identification of strains
			CTX ²⁾	CAZ ³⁾	CRO ⁴⁾	
50804	CTX-M-15 only		≥ 256	64	64	<i>E. coli</i>
50805	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50806	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	64	64	<i>E. coli</i>
50807	CTX-M-15 only		≥ 256	32	64	<i>E. coli</i>
50808	CTX-M-15 only		≥ 256	32	128	<i>E. coli</i>
50809	CTX-M-15 only		128	16	32	<i>E. coli</i>
50810	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50811	CTX-M-15 only		≥ 256	16	32	<i>E. coli</i>
50812	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	64	32	<i>E. coli</i>
50813	CTX-M-15 only		≥ 256	8	16	<i>K. pneumoniae</i>
50814		TEM-52 only	16	128	128	<i>E. coli</i>
50815	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	≥ 256	<i>K. pneumoniae</i>
50816	CTX-M-15 only		≥ 256	16	32	<i>E. coli</i>
50817	CTX-M-15	+SHV-12	128	≥ 256	≥ 256	<i>K. pneumoniae</i>
50818	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	≥ 256	<i>K. pneumoniae</i>
50819	CTX-M-15	+SHV-2a	128	128	64	<i>K. pneumoniae</i>
50820	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50821		SHV-12 only	16	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50822	CTX-M-15 only		≥ 256	32	16	<i>E. coli</i>
50823	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	64	<i>E. coli</i>
50824	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50825	CTX-M-15 only		≥ 256	32	32	<i>E. coli</i>
50826	CTX-M-15 only		≥ 256	64	16	<i>E. coli</i>
50827	CTX-M-15 only		≥ 256	32	16	<i>E. coli</i>
50828		+SHV-12, TEM-52	64	≥ 256	≥ 256	<i>K. pneumoniae</i>
50829	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	≥ 256	≥ 256	<i>E. coli</i>
50830	CTX-M-15	+SHV-12	≥ 256	≥ 256	128	<i>K. pneumoniae</i>
50831	CTX-M-15	+TEM-1	≥ 256	8	16	<i>E. coli</i>
50832	CTX-M-15	+TEM-1	≥ 256	16	16	<i>E. coli</i>
50833	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	64	64	<i>E. coli</i>
50834	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	64	32	<i>E. coli</i>
50835	CTX-M-15	+TEM-52	≥ 256	64	32	<i>E. coli</i>
50836	CTX-M-15	+SHV-12, TEM-52	≥ 256	≥ 256	≥ 256	<i>K. pneumoniae</i>
50837		TEM-52 only	16	128	128	<i>E. coli</i>
50838	CTX-M-15 only		≥ 256	32	16	<i>E. coli</i>
50839	CTX-M-3	+TEM-52	≥ 256	128	32	<i>E. coli</i>

¹⁾Minimal inhibitory concentration; ²⁾ cefotaxime; ³⁾ ceftazidime; ⁴⁾ ceftriaxone

M형 ESBL생성균주에 대한 cefotaxime의 MIC는 2균주만이 128 μ g/mL 이었고 나머지 30균주 모두는 256 μ g/mL 이상으로 높았다(Table 7). 그리고 CTX-M형 ESBL 유전자를 지닌 균주에 대한 cefotaxime의 MIC는 ceftazidime의 MIC에 비해서 상대적으로 높은 양상을 보였다.

CTX-M과 SHV-12형 ESBL을 동시에 생성하는 균주에 대한 cefotaxime과 ceftazidime의 MIC 범위는 대부분이 256 μ g/mL 이상으로 높았다(Table 7).

CTX-M과 TEM-52형 ESBL을 동시에 생성하는 균주는 cefotaxime에 대한 MIC는 높게 나타났으나 ceftazidime과 ceftriaxone의 MIC 범위는 CTX-M과 SHV-12형 ESBL을

동시에 생성하는 균주에 비해 상대적으로 낮았다. CTX-M형 ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대한 cefotaxime의 MIC는 256 μ g/mL 이상으로 ceftazidime의 16-256 μ g/mL 이상보다 높은 분포를 보였다. 즉 CTX-M-15를 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대한 cefotaxime의 MIC는 128 μ g/mL 이상으로 TEM 혹은 SHV형 ESBL을 생성하는 균주에 비해 높은 분포를 보였다. 이러한 결과는 CTX-M형 ESBL을 생성하는 균주가 cefotaxime항생제를 가수분해하는 능력이 다른 항생제에 비해 높다는 것을 증명해 준다.

또한, 본연구의 결과는 국내의 대학병원 뿐 만 아니라 일

반중합병원에서도 CTX-M형 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 존재하며 빠른 속도로 확산 중임을 시사해 주는 것 같다. 앞으로 CTX-M형 ESBL의 만연과 변종 CTX-M형 ESBL의 출현을 감시하기 위한 정기적인 연구와 조사가 필요한 것으로 생각한다.

요 약

병원내 항생제 다제 내성을 일으키는 CTX-M형 ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 생성현황을 조사하고 이들 균주로 인한 감염증치료와 역학적 조사연구에 도움이 되고자 효소의 유전형질을 규명 하였다. 2005년 7월-12월에 부산에 소재하고 있는 2개의 종합병원에서 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 각각 153주, 52주를 수집하였다. 그 중에서 ESBL을 생성 하는 균주를 검출하기위해 Double disk synergy test를 시행하여서 *E. coli* 23주와 *K. pneumoniae* 13주를 분리하였다. 균주의 동정은 Vitek system GNI card(bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., U.S.A.)로 확인하였고, 항생제감수성시험은 disk diffusion method 와 agar dilution method를 사용하였다. 분리된 균주들의 내성을 일으키는 ESBL 유전형을 규명하기위하여 Isoelectric focusing(IEF), polymerase chain reaction test, DNA sequencing을 시행하였다.

A병원의 13주와 B병원의 10주로 총 23주의 *E. coli* (15.0%)와 A병원의 7주와 B병원의 6주로 *K. pneumoniae* 13주(25.0%)가 double disk synergy test 양성으로 ESBL 생성균주로 판정하였다. ESBL 생성 36균주를 대상으로 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 유전자 검출을 위한 PCR을 시행한 결과 *bla*_{TEM} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{SHV} 유전자는 13주(36.1%), *bla*_{CTX-M} 유전자는 32주(88.9%)가 양성반응을 보여서 *bla*_{CTX-M} 유전자를 가진 균주가 가장 많이 나타났다. 그리고, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 1주(2.8%)만 나타났고 *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주는 9주(25.0%), *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 두 가지 유전자를 가지고 있는 균주가 10주(27.8%)로 나타나 *bla*_{CTX-M}을 포함하는 복합유전자가 많이 증가함을 알 수 있었다. 또한 CTX-M형 ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대한 cefotaxime의 MIC는 256 µg/mL 이상으로 ceftazidime의 16-256 µg/mL 이상보다 높은 분포를 보였다. 즉, CTX-M형 ESBL 유전자를 지닌 균주에 대한 cefotaxime의 MIC는 ceftazidime의 MIC에 비해서 상대적으로 높은 양상을 보였다.

이러한 결과는 국내의 대학병원 뿐 만 아니라 일반종합병원에서도 CTX-M형 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 존재하며 확산 중임을 시사한다. 앞으로 CTX-M형 ESBL의 만연과 변종 CTX-M형 ESBL의 출현을 감시하기 위한 정기적인 연구와 조사가 필요한 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 부산가톨릭대학교의 연구비지원에 의해 수행되었으며, 임상병리학과 미생물실험실의 학생들의 많은 도움에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas. 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 509-513.
2. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1-14.
3. Bradford, P. A., Y. Yang, D. Sahm, I. Grope, D. Gardovska, and G. Storch. 1998. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1980-1994.
4. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21th century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 933-951.
5. Bush, K. and S. B. Singer. 1989. Biochemical characteristics of extended broad spectrum -lactamases. *Infection* **17**: 429-433.
6. Canton, R., A. Oliver, T. M. Coque, C. Varela Mdel, J. C. Perez-Diaz, and F. Baquero. 2002. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1237-1243.
7. Casellas, J. M. and M. Goldberg. 1989. Incidence of strains producing extended-spectrum -lactamase in Argentina. *Infection* **17**: 434-436.
8. Coudron, P. E., E. S. Moland, and C. C. Sanders. 1997. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a veterans medical center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2593-2597.
9. David, L., L. Paterson, M. Kristine, M. Hujer, Y. Bethany, D. Michael, and D. Bonomo. 2003. Extended-Spectrum-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-Type- β -lactamases. *Antimicro. Agents Chemother.* **34**: 3554-3560.
10. Dumarche, P., C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, R. Bonnet, and J. Sirot. 2002. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1128-1131.
11. Forbes, B. A., D. F. Sahm, and A. S. Weissfeld. 2002. Enterobacteriaceae in Baily & scott's Diagnostic Microbiology.

- 11th Ed. Mosby Co. 365-375.
12. Gniadkowski, M., I. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, and A. Bauernfeind. 1998. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 827-832.
 13. Hong, S. G., J. Lee, D. Yong, E. C. Kim, S. H. Jeong, and Y. J. Park. 2004. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea. *Kor. J. Clin. Microbiol.* **7**: 171-177.
 14. Jacoby, G. A. and A. A. Medeiros. 1991. More extended-spectrum- β lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1697-1704.
 15. Jacoby, G. A. 1997. Extended spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- β -lactams. *Infect. Dis. Clin. NA.* **11**: 875-887.
 16. Jacoby, G. A. and L. S. Munoz-Price. 2005. The new β -lactamases. *New Engl. Med.* **352**: 380-391.
 17. Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier, and A. Phillippon. 1988. Extended-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 867-878.
 18. Lee, J. H., I. K. Bae, S. B. Kwon, and S. H. Jeong. 2004. Prevalence of CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea, 2003. *Korean J. Clin. Microbiol.* **7**: 111-118
 19. Kim, B. L., S. H. Jeong, J. Y. Koo, K. W. Lee, Y. S. Chong, T. J. Jeon, H. Y. Hwang, and M. H. Kim. 1999. Prevalence of Extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae and evaluation of methods for detection. *Kor. J. Clin. Microbiol.* **2**: 28-39.
 20. Kim, Y. T., T. U. Kim, and H. S. Baik. 2006. Characterization of Extended Spectrum β -Lactamase Genotype TEM, SHV and CTX-M *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 889-895.
 21. Lee, S. H., J. Y. Kim, S. H. Shin, Y. J. An, Y. W. Choi, and Y. C. Jung. 2003. Dissemination of SHV-12 and characterization of New AmpC-type β -lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2477-2482.
 22. Livermore, D. M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 557-584.
 23. Ma, L., Y. Ishii, M. Ishiguro, and H. Matsuzawa. 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1181-1186.
 24. Mammeri, H., G. Laurans, M. Eveillard, S. Castelain, and F. Eb. 2001. Coexistence of SHV-4 and TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2184-2190.
 25. Medeiros, A. A. 1984. β -Lactamases. *Br. Med. Bull.* **40**: 18-27.
 26. Moland, E. S., J. A. Black, A. Hossain, N. D. Hanson, K. S. Thomson, and S. Pottumarthy. 2003. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2382-2383.
 27. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. 1999. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia* in Manual of Clinical Microbiology, pp. 475-482. 7th Ed. Washington: American Society for Microbiology.
 28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, Tenth informational supplement, M100-S10(M2). Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
 29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th edition: approved standards. M7-A5. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
 30. Nordmann, P. 1998. Trends in β -lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 100-106.
 31. Nuesch-Inderbinen, M. T., F. H. Kayser, and H. Hachler. 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 943-949.
 32. Ouellette, M., G. C. Paul, A. M. Phillippon, and P. H. Roy. 1988. Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in β -lactamase characterization of 114 resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 397-399.
 33. Pai, H., E. H. Choi, H. J. Lee, J. Y. Hong, and G. A. Jacoby. 2001. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3747-3749.
 34. Poyart, C., P. Mugnier, G. Quesne, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1998. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 108-113.
 35. Sabate, M., R. Tarrago, F. Navarro, E. Miro, C. Verges, and J. Barbe. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1970-1973.
 36. Siro, D. 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**: 19-34.
 37. Song, W. G., K. W. Lee, S. J. Kim, S. H. Jeong, C. H. Chang, and H. J. Shin. 2000. Extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from 12 hospital in Korea. *Kor. J. Chemother.* **18**: 401-410.
 38. Stobberingh, E. E., J. Arends, J. A. Hoogkamp-Korstanje, W. H. Goessens, M. R. Visser, and A. G. Buiting. 1999.

- Occurrence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in Dutch hospitals. *Infection* **27**: 348-354.
39. Tzouveleakis, L. S., E. Tzelepi, P. T. Tassios, and N. J. Legakis. 2000. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **14**: 137-143.
40. Wang, H., S. Kelkar, W. Wu, and M. Chen. 2003. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 790-793.
41. Winokur, P. L., R. Canton, J. M. Casellas, and N. Legakis. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacificregion. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 94-103.
42. Yagi, T., H. Kruokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 53-56.

(Received Sep. 2, 2006/Accepted Nov. 16, 2006)