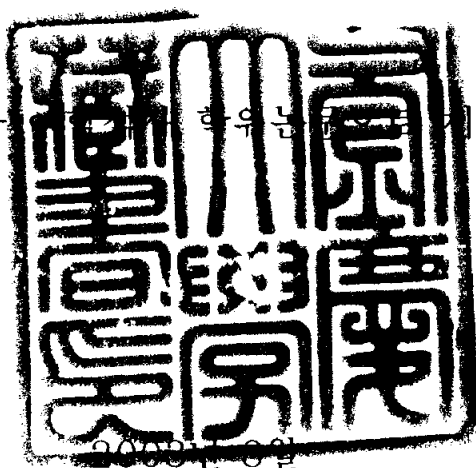


이학석사 학위논문

부산 도축장에서 분리된 *E. coli*의
ESBL(Extended-spectrum
 β -lactamase) 성상 연구

지도교수 이 훈 구

이 논문을 학위논문으로 제출함



부경대학교 대학원

미 생 물 학 과

이 종 호

이종호의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 6월 26일

주 심 농학박사 이 원 재 (인) 

위 원 이학박사 최 태 진 (인) 

위 원 이학박사 이 훈 구 

Typing of ESBL(Extended-spectrum β -lactamase) in *Escherichia coli*
Isolated from abattoir in Busan, Korea.

Jong-Ho Lee

*Department of Microbiology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

An extended spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* strain (HA-61) was isolated by double disk synergy, PCR, and isoelectric focusing (IEF) test from abattoir in Pusan. The pI value of β -lactamase from this strain was 5.0, which is different from known pI value of β -lactamase. A 1,080bp-DNA fragment encoding this gene was amplified only with TEM specific primers. The β -lactamase gene of this strain was successfully transferred to *E. coli* RG 176 Nal^R by conjugation. Nucleotide sequencing analysis of the gene encoding the pI 5.0 β -lactamase from this strain revealed a novel gene different from TEM-1. There was nucleotide deletions at position 1049 and 1053, which resulted in the substitution: Val-Leu-Thr-Asx for Gly-Ala-Ser-Leu-Ile-Lys-His-Trp from amino acid 279. From these results, it was concluded that this strain is a novel TEM type. This is the first study on the ESBL producing bacteria from abattoir in Pusan, Korea.

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법		4
1. 균주의 분리		4
2. β -lactamase 생성판정		4
3. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)		5
4. 접합 (Conjugation)에 의한 내성전달		5
5. β -lactamase의 등전점 검사 (Isoelectric focusing, IEF)		6
6. PCR을 이용한 ESBL 유전자의 형별분류		8
7. PCR 생성물의 elution과 cloning 및 염기서열 분석		9
III. 결	과	12
1. 균주의 분리와 동정		12
2. 이중 디스크 확산법(Double disk synergy test)시험결과		14
3. 접합(Conjugation)에 의한 내성전달 시험)		14
4. β -lactamase의 등전점 및 PCR 분석		15
5. 접합자 형성 균주의 염기 서열 분석		17
IV. 고	찰	22
V. 요	약	25
VI. 감사의 글		26
V. 참고문헌		27

I. 서 론

β -lactam 항균제는 β -lactam ring을 가지고 있는 항균제이며, 곰팡이의 일종인 *Penicillium* 屬과 *Cephalosporium* 屬 등에서 생산되고, 대표적으로, penicillin과 cephalosporin 계열의 항균제가 포함되어진다 (이, 1982). 이 항균제의 기작은 β -lactam ring이 세균 세포벽의 peptidoglycan 생합성을 방해함으로써 균을 치사시키는 bactericidal 항균제로서, 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 항균제이다 (이, 2002; Medeiros, 1997).

그러나, 1983년 독일에서 plasmid에 의해서, 매개되어진 extended - spectrum - β - lactamase (ESBL) 생성균주가 출현됨으로, 기존의 β -lactam 항균제와 제 3 세대 β -lactam 항균제들이 무력화되어지고 있다 (Medeiros, 1997). ESBL은 penicillin 계와 협범위 cephalosporin 뿐만 아니라 제 3 세대 cephalosporin 계, 그리고 monobactam 계 등의 광범위 항균제 등을 가수분해하는 효소(oxyimino-cephalosporin)를 말한다 (Carter, 2000).

이 기작은 β -lactam 항균제의 ring에 있는 carbonyl moiety에 공유결합을 하여, ring의 amide 결합을 가수분해 시킴으로서, 항균제를 무력화시키며 (Medeiros, 1997), 한 두 곳의 유전자가 돌연변이(point mutation)되어, 아미노산이 변형(mutation)되어, 다양한 등전점 (pI) 값을 가진다 (Medeiros, 1997; Pai *et al.*, 1999). 이 결과 현재 여러 종류의 ESBL이 보고되고 있으며, 초기에는 명명체계의 많은 혼란이 있었지만, Bush와 Jacoby에 의해서 체계화 된

TEM 형과 SHV 형이 주종을 이룬다 (Karen and George, 1997; 이, 2000). Lahey clinical studies의 2003년 현재 보고는 TEM 형은 TEM-122 형, SHV 형은 SHV-51 형, OXA 형은 OXA-51 형까지 분류되어 있다 ([http:// www.lahey.org/studies/temtable.asp](http://www.lahey.org/studies/temtable.asp)).

ESBL 연구는 대부분 장기입원환자, 중환자실, 화상환자들의 임상가검물로부터 분리되었으며, 균종들은 주로, *Klebsiella*, *Escherichia* 및 *Pseudomonas* 속의 균들이었다 (김 과 이, 2000; Haluk *et al.*, 2001; Medeiros, 1997).

한국의 경우, 1990년대 초반이후, 임상가검물로부터, ESBL 생성 균주가 보고되었으며, 현재 그 수가 증가하고 있다 (Pai *et al.*, 1999; 이 등., 1994; 정 등., 1997).

ESBL 생성균에 대한 보고와 임상양상에 관해서는 앞서 언급한 바와 같이 거의 세계 모든 나라에서 분리되고 있지만, 자연환경 (해수, 강물 등), 식품, 인간의 주거환경 등에서 보고된 바는 아주 극소수에 지나지 않는다 (김 과 이, 2000; 이, 2001; 김, 2003).

한국의 축산 농가는 가축의 질병예방과 치료를 목적으로 항균제를 사용해 왔기 때문에 그 분변이나 도축물로부터 ESBL 생성 균주가 분리될 개연성을 가지고 있으며, 내성 유전자를 획득한 균주는 여러 경로를 통하여 인체로 재유입 될 가능성도 내포하고 있어 중요성이 크나 (이, 2001; 김, 2003; 가축통계, 2003).

주요 단백질 공급원으로 사육되는 가축은 정육과 육가공품으로 연간 소는 10만두, 돼지는 1300만두 도축되어 우리의 식탁에 공급

되고 있다 (가축통계, 2003; 한국 축산 연감, 2001).

이와 같은 중요성을 감안하여 검체 분리장소를 부산 도축장으로 선정하였다.

국내에서는 도축장환경과 도축된 육류에서는 아직 약제내성유형과 ESBL 생성균주에 관한 연구 보고가 없다. 이에 본 연구자는 도축되는 소와 돼지의 장내에서 항균제 내성을 가지는 균 특히, 제 3 세대 cephalosporin 항균제 내성균주 출현 유무를 확인하고, 그 성상에 대해서 조사하고자 하였다.

본 연구는 도축장의 도축된 육류 및 도축장의 환경으로부터, ESBL 균주의 형별을 분류한 국내 첫 번째 이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 균주의 분리

2002 년 2 월부터 동년 3 월까지 부산 북구 소재 동원산업 도축장을 연구지역으로 선정하여 균주 수집을 하였다. 소와 돼지의 장, 또는 분변을 멸균된 면봉에 묻힌 후 이를 BHI (brain heart infusion, Difco)에 넣어 실험실로 운반하였다. 증균과정을 거친 후, 증균액 0.1 ml를 제 3 세대 cephalosporin 계열 항균제인 ceftazidime ($2 \mu\text{l/ml}$)이 첨가된, 장내세균 선택배지인 MacConkey (Difco) 평판배지에 고르게 도말한 다음 37°C 에서 17 시간 배양하여 성장된 균집락을 얻었다 (Pai *et al.*, 1999). 얻어진 단일 집락은 BHI 평판배지에서 순수 분리하였다. 배지조제와 균주의 동정은 표현형을 중심으로 한 일반 장내세균 동정법을 따랐다 (Ewing, 1986; Holt, *et al.* 1994).

2. β -lactamase 생성판정

β -lactamase 생성 확인은 BHI에 균주를 접종하여 37°C 에서 17 시간 배양하여, 배양액을 유리평판 위에 한 방울 놓고 nitrocefin ($500 \mu\text{g/ml}$ in phosphate buffer pH 7.0, Galaxo) 용액 한 방울을 떨어뜨려 5 분 이내에 붉은 색으로 발색되는 균주를 β -lactamase 양성으로 판정하였다 (김 과 이. 2000).

3. 이중디스크 확산법(Double disk synergy test)

Nitrocefin 반응 양성 균주를 BHI에 접종하여 MacFarland nephelometer 제 0.5 관의 탁도로 맞춘 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 Mueller-Hinton (Difco) 평판배지에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/clavulanate (75/10 μg , BBL)를 놓고 디스크의 중심과 중심사이의 간격이 18 mm가 되도록 cefotaxime (30 μg), ceftazidime (30 μg), ceftriaxone (30 μg) disk를 놓았다. 37°C 에서 17 시간 배양한 후에 두 디스크 사이에서 나타나는 억제대의 양상을 가지고 상승효과(synergism)를 판정하였다 (이, 2001; 김 과 이, 2000; Pai *et al.*, 1999; 배 등., 1997).

4. 접합(Conjugation)에 의한 내성전달

ESBL 생성이 확인된 균주를 전달균주 (donor)로 하고 sodium azide에 내성인 *Escherichia coli* J53 Azid^R 과 nalidilic acid에 내성인 *Escherichia coli* RG176 Nal^R을 피전달 균주 (recipient)로 하여 교차접합시험을 실시하였다. 교차 항균제의 내성을 확인하기 위하여 해당 항균제들에 대한 MIC (minimal inhibitory concentration)를 측정하였다 (서 등, 1992; 설 등, 1998). 이 후, 장내세균 1 차 선별 배지인 MacConkey 평판배지에 nalidilic acid (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Mersham Life Science)와 ceftazidime (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 sodium azide (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma)와 ceftazidime (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 MacConkey 평판배지를 이용하였다. 시험균주들을 BHI에 접종하여 37°C에서 배양한

후, 그 배양액을 새로운 BHI에 100 μl 접종하여, 4 시간 동안 진탕배양하였다. 전달균주 배양액과 피전달균주 배양액을 1:10의 비율로 새로운 BHI에 혼합하여 37°C에서 17 시간 정치 배양시켰다. 이 배양액을 앞서의 선택배지에 도말하여, 37°C에서 17 시간 배양하여 균집락 생성유무를 조사하였다 (이 등, 2000; Pai *et al.*, 1999; 김 등, 1999). 접합자 명명은 공여균주의 균주번호 앞에 접합 (conjugant)을 의미하는 “C”를 첨가 시켰다.

5. β -lactamase의 등전점 검사(Isoelectric focusing, IEF)

접합이 이루어진 공여모균주와 접합자(Conjugant)를 각각 5 ml BHI에 접종하여 37°C 에서 18 시간 진탕 배양하였다. 이를 원심 (5,000 rpm, 10 min)하여 균체를 얻은 다음 멸균된 0.85% 생리 식염수로 3 회 세척 (5,000 rpm, 10 min) 후, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 그 침사를 멸균된 3 차 증류수 750 μl 에 재부유하였다. 이것을 초음파 파쇄기(Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument)를 이용하여 30 초간 4 회 분쇄하였다. 이를 12,000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후, 시험전까지 -20°C에 보관하였다 (이 등, 2000).

등전점은 ampholine polyacrylamide gel을 사용하여 측정하였다. Ampholine polyacrylamide gel은 monomer ampholyte solution (H_2O 5.5 ml + N,N'-tetramethylene-ethylenediamine 3 μl + 0.1 riboflavin-5'-phosphate 50 μl)을 혼합하여 제조하였으며, monomer

조성은 acrylamide 24.5 g 과 bis 0.75 g 을 혼합하여 증류수 100 ml에 녹인 후 0.45 μ m filter로 여과시킨 후 갈색병에 넣어 4℃ 에서 보관하여 사용하였다 (김 과 이, 2000).

등전점 검사는 Mini IEF cell system (Bio-Rad)을 이용하여 시행하였다. 유리판에 gel support film의 소수성 부분을 부착시키고, 제조한 ampholine polyacrylamide gel 용액을 casting tray에 적당량 (3 ml) 분주하고, 분주된 gel 위에 gel support film의 친수성 부분을 부착시킨 후, 형광등 아래에서 1 시간 동안 중합시키고, 유리판을 casting tray에서 분리하여 뒤집어 형광등 아래에서 15 분 동안 다시 중합시켰다 (이, 2001; 김 과 이, 2000).

Glass gel plate에 sample template를 놓고 분리한 crude β -lactamase를 2 μ l loading 후, 5 분 정도 방치하고, sample template를 제거하였다. Isoelectricfocusing chamber의 흑연전극을 습윤한 상태로 유지시키고 유리판의 gel 부분이 흑연전극에 닿도록하여 100 V에서 15 분, 200 V에서 15 분, 450 V에서 60 분간 전기영동하였다 (이, 2001; 김 과 이, 2000).

전기영동이 끝난 glass plate로부터 gel support film을 분리하여 nitrocefin 용액 (500 μ g/ μ l in phosphate buffer pH 7.0, Glaxo) 으로 적신 여과지(Whattman No. 54 paper)를 gel 위에 덮어서 band를 관찰하였다 (Pai, *et al.*, 1999). pI 값 판독을 위한 ladder는 IEF marker 3-10 (Serva liquid mix)를 사용하였다.

6. PCR(Polymerase chain reaction)을 이용한 ESBL 유전자의 형별분류

실험에 사용한 균주는 BHI에 접종하여 37℃에서 진탕배양 후, alkaline 방법 (Sambrook, *et al.*, 1989)을 따라 plasmid를 분리하였다. ESBL 유전자의 형별분류를 위하여 사용된 primer는 각각 TEM 형(1080bp), CMY-1 형(1097bp)의 특이 primer (specific primer)였다 (이 등, 2000; 김 과 이, 2001; 김, 2003).

TEM 형 primer

Foward : 5' - ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA - 3'

Reverse : 5' - GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC - 3'

CMY-1 형 primer

Foward : 5' - ATG CAA CAA CGA CAA TCC ATC - 3'

Reverse : 5' - GTT GGG GTA GTT GCG ATT GG - 3'

PCR은 Pre-mix (Bioneer)를 사용하였고, template 1 μl , primer (10 pmol) 각각 2 μl , 증류수 15 μl 를 넣어서, total volume 20 μl 로 반응시켰다. TEM 형 확인을 위한 PCR 반응조건은 denaturatuion 은 94℃에서 30 초, annealing은 45℃에서 90 초, extention은 72℃에서 60 초로 30 cycle을 중합하였고 (이, 2001; 김 과 이, 2001), CMY-1 형의 확인을 위해서는 denaturation은 94℃에서 30 초, annealing은 60℃에서 60 초, extention은 72℃에서 90 초로 30

cycle을 중합하였다 (이 등, 2000, Table 1). PCR은 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)을 이용하였다. PCR 생성물은 0.8% agarose gel을 이용하여 0.5X TBE Buffer에서 100 V로 30 분간 전기영동 하였으며, ethidium bromide로 염색하고 증류수로 세척하여 U.V. transilluminator에서 확인하였다.

Table 1. PCR Program and Electrophoresis Conditions

			TEM	CMY-1
P C R	Primers: (5'→3')	Foward	ATAAAATTCCTGAAGACGAAA	ATGCAACAACGACAATCCATC
		Reverse	GACAGTTACCAATGCTTAATC	GTTGGGGTAGTTGCGATTGG
P R O G R A M	Denaturation		94℃, 30 second	94 ℃, 30 second
	Annealing		45℃, 90 second	60 ℃, 60 second
	Extention		72℃, 60 second	72 ℃, 90 second
	Cycles		30 Cycles	30 cycle
	Amplified Products		1080bp	1097

7. PCR 생성물의 elution과 cloning 및 염기서열 분석

PCR 생성물 아래에 DE 81 filter paper (ion-exchange paper, wattman)를 삽입하고 10 분간 다시 전기영동을 실시하였다. DNA가 전이된 DE 81 filter paper를 Magic buffer (2X Tris-EDTA with 1.5 M NaCl, 20 mM Tris · HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 1.5 M NaCl) 400 μ l에 10 분간 담귀 filter paper에 부착되어 있는 DNA를 buffer로 전이시킨 후 filter paper를 제거하고 ethanol로 정제하였다.

이를 T-easy vector에 ligation 시켰다. 반응 조건은 T4 DNA ligase 2X buffer 5 μl , pGEM[®] T easy vector 1 μl , PCR product 3 μl , T4 DNA ligase 1 μl 을 섞은 다음 4°C에서 17 시간 반응시켰다.

ligate는 *E. coli* XL-1 blue (F⁺:Tn10 · *proA*⁺B⁺ *lacIq* Δ (*lacZ*)M15/*recA1 endA1 gryA96* (Nal^r) *thi* *hadR*17 (rk⁻mk⁺) *supE*44 *relA1 lac*)에 형질 전환 시켰다. 형질전환방법은 다음과 같았다. XL-1 blue를 DYT (bacto-tryptone 16 g, bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g/liter) 액체 배지에서 흡광도(OD₆₀₀) 값이 0.5가 되도록 배양하였다. 배양액 1 ml을 1.5 ml microcentrifuge tube에 분주한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 그 침사를 100 mM CaCl₂ 용액 750 μl 에 부유시킨 다음 얼음에 10 분간 정치하고, 다시 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 제거하였다. 이를 100 mM CaCl₂ 용액 200 μl 에 재 부유시켜 얼음에 10 분간 정치 후 ligate를 가하여 얼음에 30 분간 처리시키고 42°C에서 90 초 동안 heat shock 시켰다. 여기에 DYT broth 800 μl 를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 동안 배양 후, 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 제거하고 여액을 가라앉은 세포와 잘 섞은 다음 ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ 함유된 MacConkey 평판배지에 도말하여, 17~18 시간 배양 후 백색집락을 분리하였다. 분리된 백색집락을 ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ 함유된 DYT broth에 접종하여 배양 후, plasmid DNA는 Wizard[®]plus SV minipreps DNA purification system (Promega)을 사용하여 plasmid를 분리하였다 (Sambrook, et al. 1989). Cloning 여부를 확인하기 위하여 해당 ESBL 특이 유형의 primer로 PCR을 실시하였다.

확인된 plasmid DNA는 DE 81 paper를 사용하여 DNA elution을 실

시하고, ethanol로 정제하였다. 염기서열 결정을 위한 전처리는 ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elemer)를 이용하였고, 그 방법은 다음과 같다. Terminator ready reaction mix 4 μl , template (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 3 μl , primer (1 pmole) 3 μl 조성으로 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 sequencing PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 96°C에서 denaturation 10 초, 50°C에서 annealing 5 초, 60°C에서 extention 4 분으로 25 cycles을 실시하였다. PCR 생성물은 ethanol 침전으로 정제한 후 Template Suppressing Reagent (Perkin Elmer) 25 μl 에 녹인 후 95°C에서 2 분간 denaturation 시키고 얼음에 식힌 후, ABI 3700 Genetic Analyzer을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 서열 결정 후, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast 검색을 통해, 본 연구에 얻어진 서열과 기존에 보고된 서열들을 비교분석하고, 염기서열에 대한 아미노산 변환분석도 하였다. ESBL의 형별 분류는 Bush와 Jacoby에 의해서 제공되는 lahey clinical study (<http://www.lahey.org/studies/table.asp>)의 분류체계를 따랐다 (Patricia A. Bradford, 1995).

Ⅲ . 결 과

1. 균주의 분리와 동정

Ceftazidime ($2 \mu\text{g/ml}$)이 첨가된 MacConkey 평판배지 상에서 형성된 균 집락을 항균제가 첨가되지 않은 BHI배지에 3 차 계대하여 순수분리 후 생화학 검사를 통한 일반 장내세균 동점법을 따라 동정한 결과, *Escherichia coli*가 동정되었다 (Table 2). Gram negative이고, Indole, Methyl Red (MR), Catalase 및 운동성 시험에서 전 균주가 양성반응을 보였고, Voges-Proskauer (VP) Simmons-Citrate 및 Oxidase 시험에서는 전균주가 음성반응을 보였다. 11 개의 당(glucose, lactose, sucrose, mannitol, dulcitol, sorbitol, arabinose, raffinose, rhamnose, maltose 및 trehalose)에서는 50% 이상 발효반응이 있었고, glucose에서는 전 균주가 gas를 생성하였다. 반면에, adonitol, inositol에서는 전 균주가 음성반응을 보였으며, cellobiose와 salicin에서는 낮은 비율로 양성반응이 있었다. 아미노산(lysine, arginine, ornithine)의 decarboxylase와 dihydrolysis 시험에서는 전 균주가 양성반응을 나타내었다. 이들 중 ESBL 추적시약인 nitrocefin 용액을 떨어뜨려 5 분 이내에 붉은색으로 발색되는 31 균주를 ESBL 생성 생성균주로 1 차 선별하였다. 이들에 대한 분리원은 Table 3과 같았다.

Table 2. Biochemical reactions of isolated *Escherichia coli*.

Test	% Positive for <i>Escherichia coli</i>
Gram stain(24h)	0
Oxidase(24h)	0
Catalase(24h)	100
Hydrogen sulfide	0
Indole	100
MR	100
VP	0
Simmons Citrate	0
Lysne decarboxylase	100
Arginine dihydrolysis	100
Ornithine decarboxylase	100
Glucose acid	100
gas	100
Motility	100
Lactose	100
Sucrose	61
Mannitol	94
Dulcitol	77
Salicin	35
Adonitol	0
Inositol	0
Sorbitol	100
Arabinose	100
Raffinose	87
Rhamnose	90
Maltose	90
Xylose	100
Trehalose	100
Cellobiose	3

Table 3. The origins of isolates.

Origin	Strain No.	Total
Pig	IIA-1, HA-2, HA-3, HA-4, HA-6, HA-7, HA-11, HA-123, HA-125, HA-129, HA-134, SC-1, SC-2, SC-3, SC-4, P7-1, P7-2, P7-3, P7-4, HUA-7, HUA-8, HUA-9, HUA-10, HUA-11, HUA-13	25
Cattle	HA-48, HA-50, HA-51, HA-61, IIA-66, HA-93	6

2. 이중 디스크 확산법(Double disk synergy test) 시험 결과

이중 디스크 확산법(Double-disk synergy test)에 의한 synergy 현상은 아래와 같았다 (Fig 1).

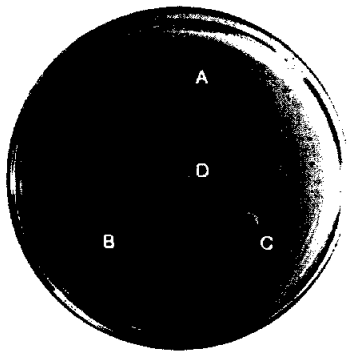


Fig 1. Double disk synergy test.

A: ceftazidime, B: ceftriaxone, C: cefotaxime, D: ticarcillin/clavulanate.
The distance between clavulanic acid and 3rd generation cephalosporin is 18mm.

이중 디스크 확산 시험에서 항균제 synergy 반응이 나타난 것은 22 균주 였다. 나머지 9 균주는 synergy 반응이 일어나지 않아서, 차후 진행된 IEF, PCR 시험에서 제외시켰다.

3. 접합(Conjugation)에 의한 내성전달 시험

ESBL 생성 균주의 제 3 세대 항균제 내성 획득 원인이 plasmid 매개에 의한 것임을 확인하기 위하여 시행한 교차접합 결과는 다

음과 같았다. 22 균주 중 1 균주(*E. coli* HA-48)는 sodium azide (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 nalidilic acid (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 동시에 내성을 가져 공여 균주(donor)로 부적합하여 교차접합 시험에서 제외 시켰다. 나머지 21 균주를 공여균주(donor)로 하였다. *E. coli* RG176 Nal^R에 3 균주(CHA3, CHA50, CHA61), *E. coli* J53 Azid^R에 2 균주(CHA6, CP7-3)가 접합자(conjugant)를 형성하였다 (Table 4).

Table 4. Conjugation result.

Donor	Recipient	Conjugant	Donor	Recipient	Conjugant
HA-1	<i>E. coli</i> J53	---	HA-129	<i>E. coli</i> J53	---
HA-3	RG 176	CHA3	HA-134	RG 176	---
HA-4	RG 176	---	P7-1	<i>E. coli</i> J53	---
HA-6	<i>E. coli</i> J53	CHA6	P7-2	<i>E. coli</i> J53	---
HA-7	<i>E. coli</i> J53	---	P7-3	<i>E. coli</i> J53	CP7-3
HA-11	RG 176	---	P7-4	<i>E. coli</i> J53	---
HA-50	RG 176	CHA50	SC-1	<i>E. coli</i> J53	---
HA-51	RG 176	---	SC-2	<i>E. coli</i> J53	---
HA-61	RG 176	CHA61	SC-3	<i>E. coli</i> J53	---
HA-66	RG 176	---	SC-4	<i>E. coli</i> J53	---
HA-93	RG 176	---			

4. β -lactamase 의 등전점 및 PCR 분석

접합이 형성된 5 균주는 plasmid 매개성 ESBL로 추정하고, 공여균주와 접합자에 대한 IEF 및 PCR 시험을 실시한 결과는 다음과 같았다. 접합된 공여균주중 3 균주(HA-50, HA-61, P7-3)는 등전

점 값을 형성하였고, 나머지 2 균주는 등전점을 형성하지 않았다. 등전점 값을 형성한 3 균주중 2균주(HA-50, HA-61)은 pI 5.0 이었고, 나머지 1 균주(P7-3)는 pI 9.7 이었다. 접합자 역시 pI 값이 공여균주와 일치되어, CHA50과 CHA61은 pI 5.0 이었고, CP7-3은 pI 9.7 이었다 (Table 5). 따라서 이 결과를 분석 하였을 때 모균주의 ESBL 유전자가 plasmid를 통하여 접합자에게 정확하게 전이된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig 2).

Table 5. pI value of β -lactamases in this study.

pI value	β -lactamase type	Strain No.
5.0	Unidentified	HA-50 ^a , HA-61 ^a , CHA50 ^b , CHA61 ^b
9.7	Unidentified	P7-3 ^a , CP7-3 ^b

* a : Donor, b : Conjugant.

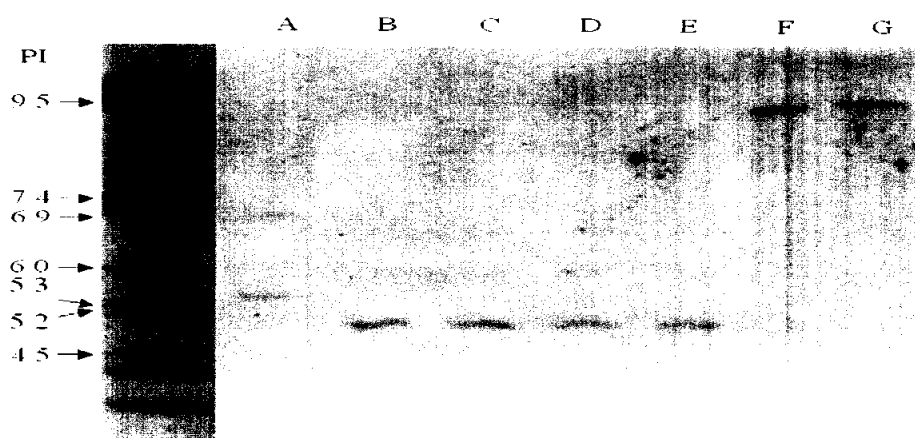


Fig 2. Isoelectric focusing value of donor and conjugant.

* line A : TEM-1, line B : HA-50, line C : HA-61, line D : CHA50,
line E : CHA61, line F : P7-3, line G : CP7-3.

pI 5.0 인 4 균주(HA-50, HA-61, CHA50, CHA61)를 TEM-specific primer로 PCR을 실시한 결과 pI 5.0은 TEM 형의 균주임을 알 수가 있었다 (Fig 3). 하지만, CHA50 균주는 형성하지 않아서, 염기서열 분석에서는 공여균주 HA-50과 접합자 CHA50 균주는 제외하였다.

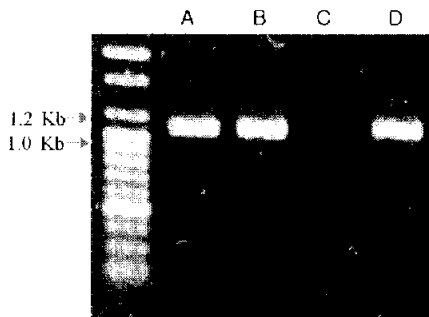


Fig 3. PCR products of HA-50, HA-61 and CHA61 produced TEM-type band on 1080 bp, but CHA50 did not.

5. 접합자 형성균주의 염기서열 분석

IEF 및 PCR 시험을 통하여 최종적으로 선정된 공여균주 HA-61과 그 접합자인 CHA61에 대한 유전자 서열을 분석하였다. 분석된 공여균주(HA-61)의 총 염기수는 1078 bp였고, 접합자 (CHA61)의 염기수도 1078 bp였으며, 염기서열 또한 일치하였다. 얻어진 염기서열을 Bush 와 Jacoby 에 의해 제공되는 Lahey Clinic

Studies site의 분류체계 기준 형인 TEM-1 형의 유전자 정보를 바탕으로 염기서열 비교 분석을 한 결과, TEM-1 형은 염기가 총 1,080 bp이지만, 시험균주(HA-61과 CHA61)는 염기가 1,078 bp로 염기 두 개가 없었다. 없는 부위는 TEM-1 형의 1,049 번째와 1,053 번째의 부위에 염기가 빠져있었다 (Fig 4). 아미노산의 변화를 확인하기 위해, NCBI의 Blast 검색에서 제공되는, 아미노산 변환분석 한 결과, 기준형인 TEM-1과는 nucleotide 1,049 와 1,053 번째의 염기가 빠져있어, TEM-1은 아미노산 279 번째가 G (glycine) - A (alanine) - S (serine) - L (leucine) - I (isoleucine) - K (lysine) - H (histidine) - W (tryptophan)로 총 286 개의 아미노산이 합성하지만, 시험균주(HA-61과 CHA61)는 아미노산 279 번째부터, V (valine) - L (leucine) - T (threonine) - D (aspartic acid)로 총 282 개의 아미노산으로 합성되어 기존에 보고된 바가 없는 새로운 성상으로 나왔다 (Fig 5).

TEM-1	1	ataaaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgccctattttataggtaaatgtcat	60
HA 61	1	ataaaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgccctattttataggtaaatgtcat	60
CHA61	1	ataaaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgccctattttataggtaaatgtcat	60

TEM-1	61	gataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccc	120
HA 61	61	gataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccc	120
CHA61	61	gataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccc	120

TEM-1	121	tattgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctg	180
HA 61	121	tattgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctg	180
CHA61	121	tattgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctg	180

TEM-1	181	gtaaatgcttcaataatattgaaaaggaagagatgagtattcaacattttcgtgtcgc	240
HA 61	181	gtaaatgcttcaataatattgaaaaggaagagatgagtattcaacattttcgtgtcgc	240
CHA61	181	gtaaatgcttcaataatattgaaaaggaagagatgagtattcaacattttcgtgtcgc	240

TEM-1	241	ccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggt	300
HA 61	241	ccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggt	300
CHA61	241	ccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggt	300

TEM-1	301	gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatct	360
HA 61	301	gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatct	360
CHA61	301	gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatct	360

TEM-1	361	caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcac	420
HA 61	361	caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcac	420
CHA61	361	caacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcac	420

TEM-1	421	ttttaagttctgctatgtggtgcggtattatcccggttgacgccgggcaagagcaact	480
HA 61	421	ttttaagttctgctatgtggtgcggtattatcccggttgacgccgggcaagagcaact	480
CHA61	421	ttttaagttctgctatgtggtgcggtattatcccggttgacgccgggcaagagcaact	480

Fig 4. Nucleotide sequence of TEM type β -lactamase gene in this study.

TEM-1	481	cggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaa	540
HA 61	481	cggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaa	540
CHA61	481	cggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaa	540

TEM-1	541	gcattctacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcctgccataacatgagtga	600
HA 61	541	gcattctacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcctgccataacatgagtga	600
CHA61	541	gcattctacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcctgccataacatgagtga	600

TEM-1	601	taacactgctgccaaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttt	660
HA 61	601	taacactgctgccaaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttt	660
CHA61	601	taacactgctgccaaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttt	660

TEM-1	661	ttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatga	720
HA 61	661	ttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatga	720
CHA61	661	ttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatga	720

TEM-1	721	agccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcg	780
HA 61	721	agccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcg	780
CHA61	721	agccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcg	780

TEM-1	781	caaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggat	840
HA 61	781	caaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggat	840
CHA61	781	caaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggat	840

TEM-1	841	ggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggccctccggctggctggttat	900
HA 61	841	ggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggccctccggctggctggttat	900
CHA61	841	ggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggccctccggctggctggttat	900

TEM-1	901	tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcc	960
HA 61	901	tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcc	960
CHA61	901	tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcc	960

Fig 4. – continued –

TEM-1	961	agatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatgga	1020
HA 61	961	agatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatgga	1020
CHA61	961	agatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatgga	1020

TEM-1	1021	tgaacgaaatagacagatcgctgagata gg g CC tcactgattaagcattggtaactgtc	1080
HA 61	1021	tgaacgaaatagacagatcgctgagata g g C tcactgattaagcattggtaactgtc	1078
CHA61	1021	tgaacgaaatagacagatcgctgagata g g C tcactgattaagcattggtaactgtc	1078
***** *			

Fig 4. – continued –

TEM-1	1	MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP	60
HA 61	1	MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP	60
CHA61	1	MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP	60

TEM-1	61	EERFPMMS ^T FKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL	120
HA 61	61	EERFPMMS ^T FKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL	120
CHA61	61	EERFPMMS ^T FKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL	120

TEM-1	121	CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGD ^H VTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTM	180
HA 61	121	CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGD ^H VTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTM	180
CHA61	121	CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGD ^H VTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTM	180

TEM-1	181	PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLSALPAGWFIADKSGAGERGS	240
HA 61	181	PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLSALPAGWFIADKSGAGERGS	240
CHA61	181	PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLSALPAGWFIADKSGAGERGS	240

TEM-1	241	RGIIAALGPDGKPSRI ^V VIYTTGSQATMDERNRQIAE I GASLIKHW	286
HA 61	241	RGIIAALGPDGKPSRI ^V VIYTTGSQATMDERNRQIAE I VLTD	282
CHA61	241	RGIIAALGPDGKPSRI ^V VIYTTGSQATMDERNRQIAE I VLTD	282

Fig 5. Alignment of amino acid sequence of TEM type β -lactamase gene in this study.

IV. 고찰

본 연구는 우리 식생활의 주요 부분을 차지하고 있는 육류에서, 광범위 다약제 내성 균주(Extended-spectrum β -lactamase)의 존재유무를 알아보기 위해 실시하였다.

장내세균 *Escherichia coli*는 장내세균과 기준속 기준종이다. 더구나 이 균은 1980년대 이후, *Klebsiella pneumoniae*와 함께 대표적인 ESBL생성균주로 밝혀져 중환자실과 장기입원환자의 치료에 많은 어려움을 주고 있다 (김 과 이, 2000; Ewing, 1986; Holt, 1991).

국내에서도 1990년대 이후 여러지역의 대학병원과 종합병원의 장기입원환자에서도 ESBL생성 *E. coli*가 많이 보고된 바가 있으며, 이들의 유형도 TEM, SHV 형 등 매우 다양하다 (이 등, 1994; 배 등, 1997; 정 등, 1997; 김과 이, 2000; Pai et al., 1999).

본 연구에서 분리된 균주는 ceftazidime $\geq 2\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 내성을 가지는 균주로, 부산의 도축장 환경에서 항균제 내성을 가진 균주가 첫 분리된 것이다 (Pai et al., 1999). 2000년 NCCLS의 기준안에 준한 ESBL 확인실험인, 이중디스크 상승작용 확인시험에서, 항균제 내성균주중 ESBL생성 균주도 존재함을 알수 있었다. 상승작용의 간격은 10mm~20mm까지 다양하게 기존에 보고되고 있지만, 본 연구자의 실험에서는 디스크 중심에서 다른 디스크 중심까지의 거리가 18mm로 할 때 가장 잘 확인되었다 (김, 1999; 김 과 이, 2000; 배 등., 1997; 송, 1999; 이 등., 1994; 이, 2001). 접합관(sex pili)에 의한 내성유전자의 전달확인 시험에서는 교차 항생제 내성을 조사

하는 중 수용균의 내성과 같은 내성을 가진 균주(HA-48)가 있어 시험에는 21 균주가 사용되었고, 또한 21균주 중에도 nalidilic acid에 내성을 가지는 균주도 있고, sodium azide에 내성을 가지는 균주가 있어, 수용체 균주를 2 균주(*Escherichia coli* J53 Azid^R와 *Escherichia coli* RG176 Nal^R)를 사용하였다. 얻어진 접합자 5 균주와 해당 공여균주의 IEF 조사에서는 공여균주 2 균주(HA-3, HA-6)와 접합자 2 균주(CHA3, CHA6)가 pI 값을 가지지 않아서, 접합에 의한 ESBL의 전이를 확인할 수 없었다. 나머지 공여 3 균주(HA-50, HA-61, P7-3)는 아직 보고가 되어 있지 않은 pI 5.0을 가지는 2 균주(HA-50, CHA50)가 존재하였고, 1 균주(P7-3)에서는 높은 pI 값 9.7을 가지고 있었다. pI 값의 결과는 각 공여균주의 접합자에서도 같은 결과를 가져와서 접합에 의한 유전자의 전이를 IEF 시험에서 간접적으로 확인할 수가 있었다. 전이된 유전자 형별 확인을 위한 PCR 시험에서는 공여균주 2 균주(HA-50, HA-61)와 접합자 1 균주(CHA61)가 TEM 형의 생산물을 생산하여, HA-50 균주의 접합자 CHA50은 TEM 형의 전이가 확인이 안되어, 염기서열 분석에서 제외되었다. pI 9.7을 가진 균주(P7-3, CP7-3)에서는 PCR 생성물이 생기지가 않아서, 실험에서 제외하였다. 따라서, 염기서열 분석에는 HA-61 균주와 CHA61 균주가 사용되었고, 동일한 염기서열을 가지고 있음을 알 수 있었다. 염기서열은 Lahey Clinic Studies 자료와 NCBI의 gene bank를 통한 TEM 형의 형별 조사에서 기준형이 TEM-1의 총 염기 1,080 bp 중, 1,049 번째와 1,053 번째의 부위에 염기가 빠져있었고, 또한, 아미노산변환 분석에서도 TEM-1은 아미노산 279 번째부터, G

(glycine) - A (alanine) - S (serine) - L (leucine) - I (isoleucine) - K (lysine) - H (histidine) - W (tryptophan)로 총 286 개의 아미노산이 합성하지만, 시험균주(HA-61과 CHA61)는 아미노산 279 번째부터, V (valine) - L (leucine) - T (threonine) - D (aspartic acid)로 총 282 개의 아미노산으로 합성되어 기존에 보고된 바가 없는 새로운 성상으로 나왔서, 새로운 것으로 확인하였다.

따라서 pI 5.0을 가진, 이 균주(*E. coli* HA-61)의 TEM 형은, 기존에 보고된 바가 없는 자료로 새로운 형별로 판단되어진다.

이상의 결과로부터, 부산의 도축장에서 ESBL을 생성하는 균주(22균주)가 존재한다는 사실을 알 수가 있었으며, 생성하는 ESBL 생성균주의 형별분류 중에, pI 5.0의 새로운 TEM 형 유형이 있음을 알 수 있었고, 이는 도축장에서 ESBL 생성균주의 첫 분리 보고이며, 내성을 가진 균주가 임상이 아닌 자연환경, 특히 도축장 환경에서 분리된다는 보고이기도 하다. 또한 앞으로 더 많은 지역의 도축장이나 사육장 및 사육장 환경에서 항생제 내성균주에 관한 조사가 필요하다는 근거를 제시한 첫 보고이다.

V. 요약

본 연구는 부산 도축장으로부터, 항균제 내성을 가지는 균주 중 plasmid mediated extended spectrum β -lactamase (ESBL) 가 존재하는지에 관해 조사한 것이다.

도축장으로부터, 33 균주의 *E. coli*를 분리동정하고, 이들에 대해 NCCLS (2000) 제공기준안에 의해 ESBL 확인 시험을 실시하였으며, 확인시험은 디스크 확산 시험을 통해 실시하였으며, 22 균주가 ESBL 임을 확인하였다. 돼지에서 많은 균주가 분리되었으며, pI 값은 5.0 과 9.5 부근의 값이 많이 존재하였다. plasmid를 매개로 한 ESBL 임을 확인하기 위한 실험에서는 5 균주 (HA-3, HA-6, HA-50, HA-61과 P7-3)가 접합자 (conjugant)를 형성하였으며, 접합자 와 공여균주 간에 IEF 조사에서는 3 균주 (HA-50, HA-61과 P7-3) 가 표현형이 전달됨을 확인 할 수 있었다. PCR조사를 한 결과 TEM 형을 가지는 균주가 존재함을 알수 있었다. TEM 형의 염기서열 분석을 통해, 기준형인 TEM-1 형의 1,049 번째와 1,053 번째의 부위에 염기가 빠져있으며, 아미노산은 TEM-1 형이 총 286 개의 아미노산을 생산하는데 비해, HA-61 균주는 총 282 개의 아미노산을 생산함을 알 수 있었다. BLAST 검색을 통해, 기존에 보고가 되지 않은 새로운 형별임을 알 수 있었다.

Ⅳ. 감사의 글

저의 미비한 실험이 이렇게 논문이 되기 까지 따뜻한 사랑과 관심으로 아낌없이 지도해 주신 이훈구 교수님의 은혜에 깊은 감사를 드립니다. 진정한 학자의 길을 가르쳐 주시고, 보잘 것 없던 저를 현재의 제가 되게 하여 주신 지도교수님 다시 한번 감사합니다. 지도 교수님 뿐만 아니라 논문수정을 봐주신 이원재 교수님과 최태진 교수님, 처음 쓰는 글이라 오타도 많고 내용이 체계가 없었는데 교수님의 지도가 논문작성에 많은 도움이 되었습니다. 감사합니다. 그 외에도, 송영환 교수님, 김영태 교수님, 이명숙 교수님 그리고 김진상 교수님 감사합니다. 교수님들의 따뜻한 지도와 가르침 감사합니다. 지금까지의 모든 교수님들의 가르침이 없었다면, 현재의 이 논문은 존재하지 않았을 것입니다. 앞으로도 건강하시길 기원합니다.

대학원 생활을 처음 시작함에 있어, 많은 두려움이 앞서고 힘들었는데, 저에게 동생같은 사랑을 주신 정민 형, 종규 형, 재형 형, 지희 누나, 무영 형, 대성 형 고맙습니다. 여러 후배님들 열심히 하면, 좋은 결과가 있을거예요. 후배님들은 2 년이라는 짧은 시간 동안 열심히해서, 좋은 결과 많이 얻기를 바랍니다. 저의 실험실 인원으로 근호, 학용, 지언이는 내가 아는 것을 가르쳐 주지 못해서, 미안하다. 너희들의 열심히 하도록 해라.

마지막으로 지금까지, 저를 정신적으로 힘을 준 부모님, 형, 동생 정말 사랑합니다. 저는 이 논문을 사랑하는 저의 가족에게 바칩니다.

V. 참 고 문 헌

- 김병렬, 정석훈, 구자영, 이경원, 정윤섭, 정태전, 황현웅, 김미향. 1999. Extended-Spectrum β -lactamase 생성 장내세균의 분리를 및 선별검사. 대한임상미생물학회지 2, 28-39.
- 김윤태, 이훈구. 2000. 부산시내 종합병원의 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae*의 형별분류. 한국미생물학회지 36, 221-227.
- 김혜진. 2003, 2. 부산지역 하천에서 분리된 *Enterobacteriaceae*가 생성하는 ESBL(Extended-Spectrum β -lactamase)의 형별분류. 부경대학교 대학원 이학석사 학위논문.
- 농림부. 2003. 3. 가축통계, p. 1-74, 국립 농수산물 품질 관리원.
- 농수축산신문. 2001. 한국축산연감, p. 716-759. 농수축산신문.
- 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정윤섭, 김의종, 조동택. 1997. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징. 감염 29, 93-103.

서병욱, 이성준, 백원기, 서성일, 서민호. 1992. 요 분리 대장균의 항균제내성과 R-plasmid 의 분자적 특성. 大韓泌尿器科學會誌 33, 396-403.

설성용, 장희경, 신행섭, 이유철, 조동택, 김경숙. 1998. 전달성 항균제 내성유전자의 분석에 의한 *Serratia*의 역학조사. 대한미생물학회지 33; 485-497.

송원근, 김현태, 이규만. 1999 Cefpodoxime 디스크를 이용한 Extended-Spectrum β -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 와 *Escherichia coli* 선별법. 대한임상병리학회지 19, 196-201.

이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현. 1994. Extended Broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli* 와 *Klebsiella pneumoniae*. 감염 26, 341-348

이광호, 장우현. 1982. β -lactamase와 세균의 내성감염 14, 9-18.

이선화, 김미나, 최수진, 정화순. 2000. 임상 검체에서 분리된 *Escherichia coli* 의 Extended-spectrum β -lactamase 성상. 대한임상병리학회지 20, 400-409.

이연희. 2002. 항생제 내성기전. The microorganisms and Industry 28-2, 39-34.

이훈구. 2001. 광안리 오수처리장에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) *Klebsiella* 와 *Enterobacter* 의 유형. 한국미생물학회지 37, 277-283.

정윤섭, 이경원, 오까모도료이찌, 이노우에 마쓰히사. 1997. 임상 검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae* 와 *Escherichia coli* 의 성상. 감염 29, 477-485.

Cartet, M.W., J. Karen, Oakton, W. Marina, and D.M. Livermore. 2000. Detection of Extended-Spectrum β -lactamase in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method. J. of Clinical Micrology 38, 4228-4232.

Ewing, W.H.H. 1986. The genus *Klebsiella*. In W. H. Ewing, Edwards and Ewings. Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, N. Y.

German Bou, O. Antonio, O. Mar, Mm. Carmelo, and M.B. Jesus.

2000. Molecular Characterization of FOX-4, a New AmpC-type Plamid-Mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* Strain Isolated in Spain. *American Society for Microbiology* 44, 2549-2553.

Haluk, Vahaboglu., F. Miklos, S. Cetin, S. Gundes, E. Ushelyi,

F. Coskunkan, and O. Tansel. 2001. Characterizatioon of Extended-Spectrum β -lactamase (TEM-52) - Producing strains of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium with Diverse Resistance phenotypes. *J. of Clinical Microbiology* 39, 791-793.

Holt, J. G., N. R. Krineg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and

S. T. Williams. 1994. Genus *Enterobacter*, p. 178. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland.

Karen, Bush. 1989. Characterization of β -lactamases.

Antimicrob. Agents Chemother. 33, 259-263.

Karen, B., and J. George. 1997. Nomenclature of TEM β -

- lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 39, 1-3.

Laura, Briñas., Z. Myriam, S. Yolanda, R.L. Fernanda, and T. Carmen. 2002. β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3156-3163.

Laurent poirel, N. Thierry, G. Michele, B. Chaibi, L. Roger, and N. Patrice. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob agent chemother* 43, 578-581.

Medeiros, A. 1997. Evolution and Dissemmination of β -lactamases Accelerated by Generation of β -lactam Antibiotics. *Clinical Infections Diseases* 245, 19-45.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS: M7-A4.

Pai, HyunJoo. 1998. The Characteristics of Extended-Spectrum β -lactamase in Korean Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Yonsei Medical Journal* 39, 514-519.

Pai Hyun. Joo., S. Lyu, J.H. Lee, J.M. Kim, Y.M. Kwon, J.W. Kim, and K.W. Choe. 1999. Survey of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klesbsiella pneumoniae* : Prevalence of TEM-52 in Korea. J. Clin. Microbiol 37, 1758-1763.

Patricia A. Bradford., Carl Urban, Arun jaiswal, Noriel Mariano, Beth A. Rasmussen, Steven J. Projan, James J. Rahal, and Karen Bush. 1995. SHV-7, a Novel Cefotazime-Hydrolyzing β -Lactamase, Identified in *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Nursing Home Patients. Antimicrobial agents and Chemotherapy 39; 899-905.

Sambrook, J., F.E. Fritsch, and T. Manilatis. 1989. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. vol I. 1.25-1.28.

Winokur, P.L, A. Brueggemann, D.L. Desalvo, L. Hoffmann, M.D. Apley, E.K. Uhlenhopp, M.A. Pfaller, and G.V. Doern. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob agent chemother* 44, 2777-2783.

Yong, Dongcun., R,J, Park, J.H. Yum, K.W. Lee, E.C. Choi, and Y.S. Choug. 2002. Further modification of the Hodge test to screen AmpC β -lactamase (CMY-1)-Producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. of Microbial Methods* 51; 407-410.