

이학석사 학위논문

부산지역 하천에서 분리된
*Enterobacteriaceae*가 생성하는 ESBL
(Extended Spectrum β -lactamase)의 형별분류

지도교수 이 후 규

이 논문을 지도교수 이 후 규 선생께 제출함



2003년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

김혜진

김혜진의 이학석사학위논문을 인준함

2002년 12월 26일

주 심 농학박사 김 진 상  (인)

위 원 농학박사 이 원 재  (인)

위 원 이학박사 이 훈 구  (인)

목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 균주의 분리	7
2. β -lactamase 생성판정	7
3. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)	8
4. 최소억제농도 (MIC, Minimal Inhibitory Concentration)의 측정	8
5. 접합 (Conjugation)에 의한 내성전달	10
6. β -lactamase의 등전점 검사 (Isoelectric focusing, IEF)	10
7. PCR을 이용한 ESBL 유전자의 형별분류	12
8. PCR 산물의 클로닝 (cloning) 및 염기서열 결정	14
III. 결과	16
1. 균주의 분리와 동정	16
2. ESBL 생성균주의 확인	19
3. 항균제 감수성 검사	21
4. 접합 (Conjugation)에 의한 내성전달 시험	24

5. β -lactamase 의 등전점 유형	25
6. PCR을 이용한 ESBL의 형별분류	31
7. 염기서열 분석	39
IV. 고 찰	54
V. 요 약	59
VI. 감사의 글	61
VII. 참고문헌	62

Typing of ESBL(Extended Spectrum β -lactamase) in Enterobacteriaceae Isolated from rivers in Busan

Hye-Jin Kim

Abstract

The aim of this study is an investigation of the biological characters for fifty-three isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) from river waters in Busan. Species of fifty-three isolates of *Enterobacteriaceae* were *Enterobacter cloacae* (12 strains), *Escherichia coli* (12 strains), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (26 strains), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (1 strain), *K. oxytoca* (1 strain), *K. planticola* (1 strain). As a result of the susceptibility test about antimicrobial drugs, all of the strains appeared to have the resistances in penicillin, 1st, 2nd, 3rd generation cephalosporin. But resistant patterns of the other antimicrobial drugs were various. In the double disk synergy test, then disk intervals are 10mm (*E. cloacae*), 20mm (*E. coli*, *Klebsiella* spp.). and all of strains shown synergic zone about 3rd generation cephalosporin more than one. Twenty-eight strains of fifty-three strains shown transfer of

resistant by conjugation test with *Escherichia coli* J 53 Azid^R. Isoelectric focusing (IEF) was examined to observe the isoelectric point (pI), and PCR was examined to determine the type of β -lactamases gene in this study. Twelve strains of ESBL producing *E. cloacae* could be divided by PCR, such as TEM type (8 strains), non-TEM non-SHV non-CMY-1 type (4 strains). *E. coli* could be divided such as TEM type (7 strains), CMY-1 type (1 strain), TEM+SHV type (1 strain), non-TEM non-SHV non-CMY-1 type (3 strains). *Klebsiella* spp. could be divided such as TEM type (11 strains), SHV type (2 strains), TEM+SHV type (15 strains) and non-TEM non-SHV non-CMY-1 type (1 strain). In the conjugants obtained the same result of PCR as donor. In the isoelectric focusing test, TEM type shown pI 5.4, 5.9 and SHV type shown pI 7.7, 8.2. As a result of the sequencing analysis, β -lactamase of pI 5.4 value was assumed that is TEM-1 type β -lactamase. And, β -lactamase of pI 5.9 value was TEM-52 type β -lactamase, β -lactamase of pI 7.7 value was SHV-2a type β -lactamase, β -lactamase of pI 8.2 value was SHV-12.

I. 서론

β -lactam 항균제는 전세계적으로 임상에서의 세균감염 치료에 가장 널리 사용되고 있는 항균제의 하나로서 (이 등, 2000), 분자 구조는 amide 결합을 한 β -lactam ring을 형성하고 있으며, 이 환상구조가 세포벽 합성에 관여하는 transcarboxylase 와 transpeptidase와 같은 penicillin binding protein (PBP)과 결합하여 세균의 세포벽 합성을 억제함으로써 항균력을 발휘하게 한다 (Jet, *et al.* 1995; Pitout, *et al.* 1997). 세균의 β -lactam 항균제에 대한 내성기전 중 가장 문제되는 것은 β -lactamase의 생산으로 인한 항균제의 불활화이다 (Mabilat and Gaussard, 1993; 배 등, 1997; Pai, 1998; 송 등, 1999). β -Lactamase (EC 3.5.2.6)는 amide, amidine, 기타 C-N결합을 가수분해 하는 효소로서 (Bush, *et al.* 1995; Bush, 1989), β -lactam 항균제의 amide bond인 β -lactam ring을 가수분해 함으로써 약제를 불활성화 시킨다 (이, 2001; Bush, *et al.* 1995). Cephalothin을 비롯한 초기의 cephalosporin은 *Pseudomonas*, *Enterobacter* 및 다른 Gram 음성 간균이 생성하는 chromosomal β -lactamase와 plasmid에 의해 매개되는 β -lactamase에 의해 쉽게 분해되었다. 이를 극복하기 위하여 1세대 cephalosporin류의 구조를 변형시켜 기존의 β -lactamases 생성균주에 의해서 β -lactam 구조가 분해되지 않는 새로운 유형의 항균제를 만들게 되었다. 이들은 합성 시기에 따라 제 2 세대, 제 3 세대의 항균제로 명명 되었다. 특히, 제 3 세대 항균제는 Gram 음

성균과 양성균 모두에게 폭 넓게 작용함으로서 광범위 β -lactam 항균제 (Extended spectrum β -lactam antibiotics)라고 명명하게 되었고, 이들은 제 1 세대, 제 2 세대 β -lactam 항균제에 내성을 나타내는 균주에 탁월한 치료효과를 나타내었다(김 과 이, 2000). 그러나 병원에서 치료제로서 이 새로운 항균제들을 집중적으로 사용하게 되자 1983년 독일에서 plasmid에 매개된 광범위 β -lactam 항균제 분해효소 (plasmid-mediated oxyimino β -lactam extended spectrum β -lactamase) 생성 균주가 처음 발견되어 급속하게 전 세계로 확산되었다(Medeiros, 1993; Mabilat and Goussard, 1993; Bradford, *et al.* 1995). 이와같이 제 3세대의 새로운 cephalosporin 계통의 항균제를 분해하는 β -lactamase를 ESBL (extended-spectrum β -lactamase)라고 한다 (김 과 이, 2000).

ESBL은 penicillin은 물론, 좁은범위의 cephalosporin 뿐만 아니라 cefotaxime, ceftazidime과 같은 extended-spectrum cephalosporin과 aztreonam과 같은 monobactame도 분해하지만 cefoxitin과 같은 cephamycin에 불활성이며, clavulanic acid와 같은 β -lactamase 억제제에 의해 효소의 활성이 억제되는 특성을 가지고 있다 (김 등, 1999; 이 등, 2000).

β -lactamase는 크게 Ambler와 Bush등에 의해 제안된 두 가지 분류체계를 가진다 (Jacoby, 1994; 이 등, 2000). Bush 등은 β -lactamase의 기질특이성과 억제특이성을 기준으로하여 새로운 분류를 하였다 (Bush, *et al.* 1995). 그러나 이러한 기능에 의한 분류는 내성유전자가 점돌연변이 (point mutation)를 일으킬 경우 기질특이성과 억제제에 대한 반응이 달라져서 효소가 속한 형이 달라질 수 있다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 β -lactamases의 아미노산 서

열 또는 효소 유전자의 염기배열 상동성을 기준으로 하는 Ambler의 분류가 널리 이용되고 있다 (이 등, 2000). Ambler는 β -lactamase를 A, B, C, D의 4 group으로 구분하였는데, Ambler class A, C, D는 serine β -lactamase이고, Ambler class B는 zinc β -lactamase이다 (Jacoby, 1994).

ESBL은 plasmid에 의해서 전달되며 Ambler class A serine β -lactamase에 속한다. Bush등의 분류에 의하면 group 2be에 포함되는 β -lactamase로서 크게 TEM 형과 SHV 형의 두 계열로 나누어지며 이들은 TEM-1, TEM-2 또는 SHV-1 의 β -lactamase 구조 gene 에서 point mutation이 일어나 1~4개의 아미노산의 치환이 일어남으로서 새로운 변종이 나타나고 있으며, 현재 180여 가지가 보고되고 있다 (김 과 이, 2000; 이 등, 2000; 송 등, 1999). 최근에는 TEM이나 SHV로 유도된 효소가 아닌 새로운 plasmid 매개성의 효소가 출현하고 있는데 이는 class C β -lactamase로, AmpC type의 효소로서 광범위 cephalosporin뿐만 아니라 cefoxitin과 같은 cephamycin에도 활성을 나타내며, β -lactamase inhibitor에도 억제되지 않는 특징을 가진다 (이 등, 2000; Pitout, *et al.* 1998). 이들의 초기 명명은 기질 반응성, 억제제에 대한 반응, pI, 내성표현형, 발견장소, 발견자 등을 따라 이루어졌기 때문에 매우 혼란스러웠으며 이러한 명명체계의 혼란을 바로잡기 위하여 숫자를 붙일 것을 제안하고 있다 (Bush, *et al.* 1995; Bush and Jacoby, 1997).

현재까지 국내외에서 많이 보고된 ESBL 생성 균주의 연구는 대부분 임상가검물을 중심으로, 장기입원환자들의 원내감염원으로 중요시되었고, *Klebsiella*, *Escherichia* 및 *Pseudomonas* 속의 균들에서 빈번하게 발생되었다(김 등, 1999; 설 등, 1998; 배 등, 1997; 정 등,

1997; 이 등, 1994). 그러나 ESBL 생성균주의 중요성은 임상적인 문제만으로 국한될 시기는 이미 지났다고 생각되며, 우리나라의 경우, 축산분야, 양식분야에서 이미 많은 종류의 항균제를 오래전부터 사용해 오고 있었기 때문에 임상이외의 하천등 자연환경으로부터 ESBL 생성균주들이 분리될 많은 개연성을 가지고 있다. 이 문제의 중요성은 일단 제 3세대 약제내성을 획득한 균주가 분변이나 생활하수를 통하여 자연계로 유입될 경우 plasmid의 전파에 의해 여러 종류의 세균군에 내성을 전달시킬수 있는 위험성을 가지고 있으며(이, 2001), 또한 자연계에서 이 능력을 획득한 세균이 인체로 재유입의 위험성을 가지고 있기 때문에 자연계내에서 분리되는 ESBL 생성균종에 대한 현황파악과 분리원에 대한 연구가 이루어져야할것으로 생각된다. 본연구자는 이러한 문제의 중요성을 감안하여 부산시내 하천을 대상으로 환경검체로부터 이중디스크 확산법과 항균제 감수성 시험을 실시하여 ESBL을 생성하는 장내세균 군의 존재유무를 확인하고 , ESBL 생성 장내세균이 존재할 경우 이를 분리하여 등전점 과 PCR 시험, 염기서열 분석을 실시하여 생성되는 ESBL의 유형과 성상을 분석하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 균주의 분리

2001 년 4 월부터 2002 년 2 월까지 부산의 낙동강 2 곳, 동천 3 곳, 수영강 3곳, 온천천 8곳 그리고 광안리 오수펌프장 등 부산 지역의 하천수로부터 매월 1 회씩 멸균된 채수병으로 물을 채취한 후 실험실로 옮겨와 각각 0.1 ml을 취하여 제 3 세대 cephalosporin 계열 항균제인 ceftazime (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 만든 장내세균 선택배지인 MacConkey Agar (Difco)에 도말한 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 17 시간 배양하여 성장된 균집락을 얻었다. 이로부터 얻어진 단일 집락을 취하여 2 회에 걸쳐 Trypicase soy agar (Difco)상에서 순수분리 하였다. 이렇게 분리된 균주들은 생화학 검사를 실시하여 종 수준까지 최종 동정 하였다. 배지조제와 균주의 동정은 일반 장내세균 동정법을 따랐다 (Ewing, 1986; Holt, *et al.* 1994).

2. β -lactamase 생성판정

β -lactamase 생성확인 은 Trypicase soy broth (Difco)에 균주를 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18 시간 배양한 배양액을 plate위에 한 방울 놓고 nitrocefin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in phosphate buffer pH 7.0, Galaxo)용액 한 방울을 떨어뜨려 5 분이내에 붉은 색으로 발색되는 균주를 β -lactamase 양성으로 판정하였다 (김 과 이. 2000).

3. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)

시험균주를 TSB에 접종하여 MacFarland nephelometer 제 0.5 판의 탁도로 맞춘 균 부유액을 멸균된 면봉으로 적셔 미리 만든 3 mm 두께의 Muller-Hinton Agar (Difco)에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 ticarcillin/calavulanate (75/10 μ g, BBL)를 놓고 디스크의 가장자리 사이의 간격이 *E. coli* 와 *Klebsiella*의 경우 20 mm, *Enterobacter*의 경우 10 mm 가 되도록 cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g) disk를 놓았다. 37 $^{\circ}$ C에서 18 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. 최소억제농도 (MIC, Minimal Inhibitory Concentration)의 측정

이중 디스크 확산법 시험결과 양성인 균주를대상으로 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 단계적인 한천희석법 (NCCLS, 1998)에 의하여 시험하였다. 시험에 사용된 항균제는 penicillin 계열의 항생제인 ampicillin (Sigma), amoxicillin (동화제약), 제 1 세대 cephalosporin인 cephalothin (대웅제약), cefazolin (동아제약), 제 2 세대 cephalosporin인 cefoperazone (한국 화이자), 제 3 세대 cephalosporin인 ceftriaxone (동광약품), cefotaxime (한미약품), ceftazidime (한국그락소웰컴)등 8 종의 β -lactam 항균제와 β -lactamase 억제제인 ampicillin/sulbactam (한국 화이자), quinolon 계열의 nalidixic acid (UBS), aminoglycoside 계열

의 tobramycin (동화제약), amikacin (동아제약), gentamycin (중외제약), cephamycin 계열인 cefoxitin (중외제약), cefotetan (제일약품)으로 총 15 종류였다. 시험균주를 TSB에 풀어서 MacFarland nephelometer 제 0.5 관의 탁도로 맞춘 후, Steers replicator (Craft Machine)를 이용해 시험항균제가 포함된 Mueller-Hinton Agar에 접종하였다. 37 °C에서 17 시간 배양 후 접종부위의 균 발육유무를 관찰하여 MIC를 판독하였다 (설 등, 1998). 대조균주로는 *E. coli* ATCC 25922를 사용였고, 각 약제의 최소억제 농도는 NCCLS의 기준에 따랐다(Table 1).

Table1. Interpretation of MIC results

	Interpretive Breakpoints ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32
Amoxicillin	"	"	"
Cephalosporin	≤ 8	16	≥ 32
Cefazolin	"	"	"
Cefoperazone	≤ 16	32	≥ 64
Ceftriaxone	≤ 8	16 ~ 32	≥ 64
Cefotaxime	≤ 8	16 ~ 32	≥ 64
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Ampicillin/Sulbactam	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Nalidixic acid	≤ 8	16	≥ 32
Tobramycin	≤ 4	—	≥ 8
Amikacin	≤ 16	—	≥ 32
Gentamycin	≤ 4	—	≥ 8
Cefoxitin	≤ 8	16	≥ 32
cefotetan	≤ 16	32	≥ 64

* Based on interpretive Breakpoints as indicated in NCCLS Document M100-S5 (NCCLS, 1994).

5. 접합(Conjugation)에 의한 내성전달

ESBL생성이 확인된 53 균주를 전달균주로 하고 Sodium azide에 내성인 *Escherichia coli* J 53 Azid^R를 피전달 균주로 하여 교차접합 시험을 실시하였다. 내성전달 확인을 위한 선택배지로는 50 µg/ml 농도의 sodium azide (Sigma)와 32 µg/ml 농도의 ceftazidime을 포함한 MacConkey Agar를 이용하였다. 시험균주들을 Brain Heart Infusion broth (Difco)에 접종하여 37 °C에서 배양한후 그 배양액을 새로운 BHI broth에 100 µl 접종하여 4 시간동안 진탕배양하였다. 전달균주 배양액과 피전달균주 배양액을 1:10 의 비율로 새로운 BHI broth에 혼합하여 37 °C에서 18 시간 정지배양시켰다. 이 배양액을 멸균된 먼봉을 이용하여 선택배지에 도말하고 37 °C에서 18 시간 배양하여 균집락 생성유무를 조사하였다 (이 등, 2000; Pai, *et al.* 1999; 김 등, 1999). MacConkey Agar에서 자란 균집락은 분리하여 내성전달의 확인을 위하여 항균제 감수성검사를 실시하였고, 등전점 조사와 PCR을 수행하였다.

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

혈액한천배지에서 자란 균을 5 ml BHI broth에 접종하여 37 °C에서 24 시간 진탕 배양하였다. 이를 원침하여 균체를 얻은 다음 0.85 % 생리 식염수로 3 회세척한후, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 그 침사를 멸균된 3 차 증류수 750 µl에 재부유하였다. 재부유물이 담긴 시험관을 얼음에 꽂은 채 초음파 파쇄기 (Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument)를 이용하여 30 초간 4 회 분쇄하였다. 이를 12,000 rpm, 4 °C에서 15 분간 원심분리하여 상

층액을 새 시험관으로 옮긴 후 시험전까지 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다 (이 등, 2000).

등전점 검사는 ampholine polyacrylamide gel을 제조하여 실시하였다. Ampholine polyacrylamide gel은 monomer ampholyte solution (H_2O 5.5 ml + monomer concentrate 2.0 ml + 25 % glycerole 2.0 ml + ampholyte 0.5 ml)과 catalyst solution (10 % ammonium persulfate $15\ \mu\text{l}$ + 0.1 % riboflavin-5'-phosphate $50\ \mu\text{l}$ + N,N'-tetramethylene-ethylenediamine $3\ \mu\text{l}$)을 혼합하여 제조하였으며, monomer concentrate는 acrylamide 24.5 g 과 bis 0.75 g을 혼합하여 증류수 100 ml에 녹인 후 $0.45\ \mu\text{m}$ filter를 이용하여 여과시킨 후 갈색병에 넣어 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 사용하였다 (김 과 이, 2000).

등전점검사는 Mini IEF cell system (Bio-Rad)을 이용하여 시행하였다. Glass plate에 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 시간동안 중합시킨 후 유리판을 casting tray에서 분리하여 뒤집어 형광등 아래에서 15 분동안 다시 중합시켰다 (이, 2001; 김 과 이, 2000).

Glass gel plate에 sample template를 놓고 분리한 crude β -lactamase를 $2\ \mu\text{l}$ loading 한 후 5 분정도 방치한 후 sample template를 제거하였다. Isoelectrofocusing 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in phosphate buffer pH 7.0, Glaxo)으로 적신 여과지 (Whatman No. 54 paper)를 gel 위에 덮어서 band를 관찰하였다 (Pai, *et al.* 1999). pI 값 판독을 위한 표준 β -lactamase 로는 pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pMG229 (SHV-2, pI 7.6), pUD21 (SHV-4, pI 7.8), pAFF2 (SHV-5, pI 8.2)과 CMY-1(pI 8.0)을 사용하였다(이 등, 2000).

7. PCR을 이용한 ESBL 유전자의 형별분류

실험에 사용한 균주는 BHI 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 진탕 배양하였으며, alkaline method (Sambrook, *et al.* 1989)에 의해 plasmid를 분리하였다. ESBL유전자의 형별분류를 위하여 사용된 primer는 각각 TEM, SHV, CMY-1 type의 공통적인 보존적 염기서열을 이용하여 제작하였다.

TEM 형 primer는

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

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

를 이용하였고 (김 과 이, 2001), 예상되는 PCR products는 1,080 bp이며,

SHV 형 primer는

Foward ; 5' - CAC TCA AGG ATG TAT TGT G - 3'

Reverse ; 5' - TTA GCG TTG CCA GTG CTC G - 3'

를 이용하였고, 예상되는 PCR products는 880 bp였다.

CMY-1 형 primer는

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

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

를 이용하였고 (이 등, 2000), 예상되는 PCR products는 1,097 bp였다.

PCR 에 사용된 시약 조성은 다음과 같다. 10X PCR buffer 5 μ l (Bioneer), 2.5 mM dNTP 4 μ l, 2 U Taq DNA polymerase (Bioneer) 0.5 μ l, primer (30 pmol) 각 1 μ l, template 2 μ l, 증류수 36.5 μ l이었다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)를 사용하였다. TEM 형 확인을 위한 PCR 반응조건은 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, annealing은 45 $^{\circ}$ C에서 90 초, extention은 72 $^{\circ}$ C에서 60 초로하여 30 cycle을 중합하였고 (이, 2001; 김 과 이, 2001), SHV 형 확인을 위해서는 denaturation은 96 $^{\circ}$ C에서 30 초, annealing은 50 $^{\circ}$ C에서 15 초, extention은 72 $^{\circ}$ C에서 120 초로하여 35 cycle을 중합하였다. CMY-1 형의 확인을 위해서는 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 60 초, extention은 72 $^{\circ}$ C에서 90 초로 30 cycle을 중합하였다(이 등, 2000). PCR 생성물은 1.0 % agarose gel을이용하여 0.5X TBE buffer에서 100 V로 30 분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 U.V. transilluminator에서 확인하였다.

8. PCR 산물의 클로닝(cloning) 및 염기서열 결정

ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elemer)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. PCR product는 pGEM[®] - T easy vector systems (Promega)를 이용하여 cloning 하였다. Cloning을 하기 위한 target DNA의 추출방법은 다음과 같았다. PCR 반응물을 1.0 % agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하고 U.V. transilluminator에서 확인하여 gel 상에서 원하는 band 아래에 DE 81 filter papaer (Wattman)를 삽입하고 10분간 다시 전기 영동을 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 전이 시킨후 filter paper를 제거하고 ethanole 침전하여 정제하였다.

분리된 DNA를 pGEM[®] - T easy vector systems protocol에 따라 결찰 (ligation) 반응을 실시하였다. 즉, T4 DNA ligase 2X buffer 5 μ l, pGEM[®] - T easy vector 1 μ l, PCR product 3 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l을 섞은 다음 16 °C에서 4 시간 이상 결찰하였다.

ligates 는 *E. coli* XL-1 blue {F::Tn10 · *proA*⁺*B*⁺ *lacI*_q Δ (*lacZ*)M15/*recA1 endA1 gryA96* (Nal^r) *thi hadR17* (*rk*⁻*mk*⁺) *supE44 relA1 lac*}에 형질 전환하였다. 형질전환방법은 다음과 같았다. XL-1 blue를 DYT (bacto-tryptone 16g, bacto-yeast extract 10g, NaCl 5g /liter) broth에서 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.5가 되도록 배양하였다. 배양액 1 ml을 1.5 ml microcentrifuge tube에 분주한후 원심분리하여 그 침사를 100 mM CaCl₂ 용액 750 μ l에 pipette을 이용하여 부유시킨다음 얼음에 10 분간 정치하였다. 이를 원심분리하여 상층액을 제거하고 다시 100 mM CaCl₂ 용액 200 μ l에 재 부유하여

열음에 10 분간 정치시킨후 ligate를 가하여 열음에 30 분간 정치시키고 42 °C에서 90 초 동안 heat shock하였다. 여기에 DYT broth 800 μ l를 첨가하여 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 이를 원심분리하여 상층액 800 μ l를 제거한후 여액을 가라앉은 세포와 잘 섞은 다음 ampicillin 50 μ g/ml 이 포함된 MacConkey Agar plate에 도말하였다. 17 시간 배양한 뒤 white colony를 분리하여 이들을 ampicillin 50 μ g/ml 이 포함된 DYT broth에 배양한뒤 alkaline method (Sambrook, *et al.*1989)에 의해서 plasmid를 분리하였다.

분리된 plasmid가 클로닝이 제대로 되었음을 확인하기 위하여 EcoR1 (Promega)을 이용하여 enzyme digestion을 실시하였다. 10X H buffer 1 μ l, EcoR1 0.5 μ l, plasmid 2 μ l, 멸균된 증류수 6.5 μ l 조성으로 37 °C 에서 1 시간 반응시킨 후, 1 % agarose gel에서 전기 영동하여 유전자의 삽입여부를 확인하였다.

클론된 plasmid DNA는 Wizard[®]plus SV minipreps DNA purification system (Promega)로 정제한후 ABI 310 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정을 위한 전처리는 ABI PRISM BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)를 이용하였고, 그 방법은 다음과 같다. Terminator ready reaction mix 4 μ l, template (0.2 μ g/ μ l) 3 μ l, primer (1 pmole) 3 μ l 조성으로 GeneAmp PCR system 2400 을 이용하여 sequencing PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 96 °C 에서 denaturation 10 초, 50 °C에서 annealing 5 초, 60 °C에서 extention 4 분으로 25 cycles을 실시하였다. PCR 생성물은 ethanol 침전으로 정제한후 Template Suppressing Reagent (Perkin Elmer) 25 μ l에 녹인 뒤 95 °C에서 2 분간 denaturation 시키고 열음에 식힌 후, ABI 310 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

Ⅲ. 결과

1. 균주의 분리와 동정

제 3 세대 cephalosporin계 항균제인 ceftazidime ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 장내세균 1 차 분리배지 MacConkey Agar상에서 집락을 형성한 균주중 241균주를 순수분리 배양하였고, 그 배양액 한방울을 plate에 놓고 β -lactamase 추적시약인 nitrocefin 용액 한방울을 떨어뜨려 5 분이내에 붉은색으로 발색되는 184 균주를 1 차 선별하였다 (Fig. 1).

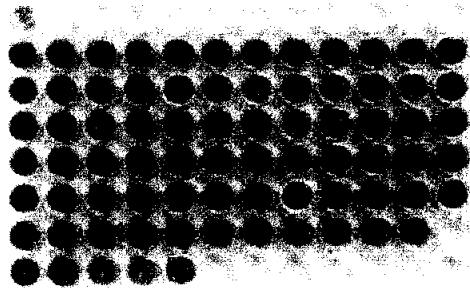


Fig. 1. Conform for the production of β -lactamase.

1 차 선별한 184 균주를 생화학적 시험을 실시한 결과 (Table 2) 종 수준까지 동정된 총 53 균주를 최종 시험균주로 선정하였다. 동정된 균종은 *Enterobacter cloacae* (12 균주), *E. coli* (12 균주),

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* (26 균주), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (1 균주), *K. oxytoca* (1 균주), *K. planticola* (1 균주)등 3 종이였다.

장소별로 분리된 균종은 광안리에서 *Enterobacter cloacae* 6 균주, *E. coli* 5 균주, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 4 균주, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* 1 균주 였고, 동천에서는 *Enterobacter cloacae* 3 균주, *E. coli* 2 균주, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 11 균주, *K. planticola* 1 균주였다. 온천천에서는 *Enterobacter cloacae* 3 균주, *E. coli* 4 균주, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 11 균주였으며, 수영의 경우 *K. oxytoca* 1 균주, 낙동강에서는 *E. coli* 1 균주였다 (Table 3).

Table 2. Biochemical characteristics of *Enterobacteriaceae* isolated from river waters in Busan.

Test	% Positive for <i>Enterobacteriaceae</i> species					
	<i>E.clocae</i> (12)	<i>K.pneumoniae</i> (26)	<i>K.ozzaenae</i> (1)	<i>K.oxytoca</i> (1)	<i>K.planticola</i> (1)	<i>E. coli</i> (12)
Gram stain(24h)	0	0	0	0	0	0
Oxidase(24h)	0	0	0	0	0	0
Catalase(24h)	100	100	100	100	100	100
Hydrogen sulfide	0	0	0	0	0	0
Indole	0	0	0	100	0	100
MR	0	0	100	0	100	100
VP	100	100	0	100	100	0
Simmons Citrate	100	100	100	100	100	0
Lysine	0	96.2	100	100	100	100
Arginine	100	0	0	0	0	75
Ornithine	100	0	0	0	0	66.7
Glucose acid	100	100	100	100	100	100
gas	100	100	100	100	100	100
Motility	100	0	0	0	0	100
Lactose	100	100	100	100	100	100
Sucrose	91.7	100	100	100	100	66.7
Mannitol	100	100	100	100	100	100
Dulcitol	0	0	0	100	0	58.3
Salicin	91.7	100	100	100	100	100
Adonitol	8.3	80.8	100	100	100	0
Inositol	0	92.3	100	100	100	0
Sorbitol	100	100	100	100	100	100
Arabinose	100	100	100	100	100	100
Raffinose	100	100	100	100	100	58.3
Rhamnose	100	100	100	100	100	100
Maltose	100	100	100	100	100	100
Xylose	100	100	100	100	100	100
Trehalose	100	96.2	100	100	100	100
Cellobiose	100	100	100	100	100	0

Table 3. The origins of isolates

Species	A r e a	Strain No.
<i>E. cloacae</i>	Kwangan Beach	JC - 01, 02, 05, 06, 07, 10
	Dongchun	JC - 03, 04, 08
	Onchunchun	JC - 09, 11, 12
<i>E. coli</i>	Kwangan Beach	JE - 04, 05, 06, 07, 12
	Dongchun	JE - 03, 08
	Onchunchun	JE - 02, 09, 10, 11
	Nakdong-river	JE - 01
<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	Kwangan Beach	JK - 06, 07, 15, 16
	Dongchun	JK - 03, 04, 05, 08, 09, 10, 17, 18, 19, 25, 26
	Onchunchun	JK - 01, 02, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 22, 23, 24
<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>	Kwangan Beach	JK - 28
<i>K. oxytoca</i>	Suyoungchun	JK - 27
<i>K. planticola</i>	Dongchun	JK - 29

2. ESBL 생성균주의 확인

이중디스크 확산법 (Duoble-disk synergy test)에 따라 얻은 결과는 다음과 같다. *Klebsiella* 속 (29 균주)과 *E. coli* (12 균주)의 경우 전 균주가 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxome에 대해서 synergy 양성반응을 나타내었다 (Table 4). *Enterobacter cloacae*의 경우에는 세가지 양상이 확인되었다. ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime 모두에 대해서 synergy 양성반응을 보이는 경우가 7 균주 (J-C02, J-C03, J-C07, J-C09, J-C10, J-C11, J-C12), ceftazidime과 ceftriaxone 두 약제에 synergy 양성반응 반응을 나타내는 경우가 2 균주, (J-C01, J-C08), ceftazidime에 대해서만 synergy 양성반응을 나타내는 경우가 3 균주 (J-C04, J-C05, J-C06)였다 (Fig2, Table4).

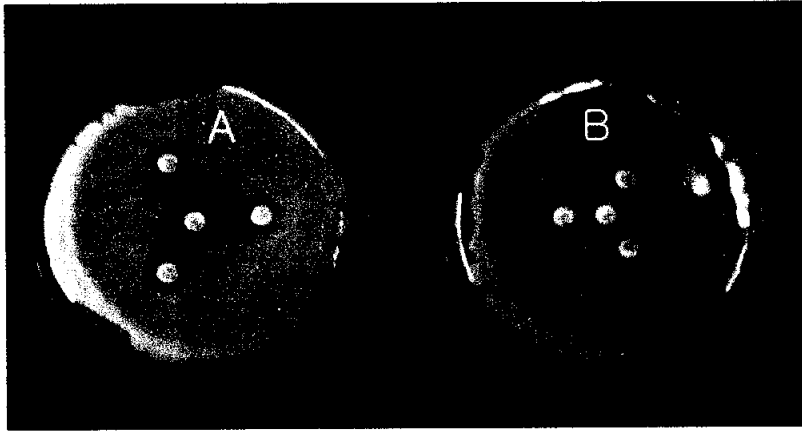


Fig. 2. Double disk synergy test. A; *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* J-K04, the distance between clavulanic acid and 3rd generation cephalosporin is 8 mm. B; *Enterobacter cloacae* HJ-C07, the distance between clavulanic acid and 3rd generation cephalosporin is 10 mm.

Table 4. Double disk synergy tests with Ticarcillin/Clavulanic acid

Species	Strain NO	Ceftaxidime	Ceftriaxone	Cefotaxime
<i>E. cloacae</i>	J-C01	+	+	-
	J-C02	+	+	+
	J-C03	+	+	+
	J-C04	+	-	-
	J-C05	+	-	-
	J-C06	+	-	-
	J-C07	+	+	+
	J-C08	+	+	-
	J-C09	+	+	+
	J-C10	+	+	+
	J-C11	+	+	+
	J-C12	+	+	+
<i>E. coli</i>	all strain	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	all strain	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	J-K28	+	+	+
<i>K. oxytoca</i>	J-K27	+	+	+
<i>K. planticola</i>	J-K29	+	+	+

3. 항균제 감수성 검사

ESBL 생성이 확인된 53 균주에 대해 15 가지 항균제로 감수성 시험을 실시한 결과 얻어진 균종별 다약제 중복내성 유형 결과는 다음과 같았다 (Table 5). *E. cloacae*의 경우 시험에 사용한 15 종의 항균제 모두에 대해서 내성을 나타내는 경우가 5 균주 (J-C01, J-C02, J-C03, J-C05, J-C06)였고, 3 균주 (J-C04, J-C07, J-C08)는 amikacin을 제외한 14 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었고, 3 균주 (J-C09, J-C11, J-C12)는 amikacin, gentamycin, tobramycin 등 aminoglycoside 계열의 항균제를 제외한 12 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었으며, 1 균주 (J-C10)는 amikacin, gentamycin, tobramycin, nalidixic acid를 제외한 11 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었다. *E. coli*의 경우 4 균주 (J-E06, J-E09, J-E10, J-E11)는 15 종의 항균제 모두에 대해서 내성을 나타내었으며, 1 균주 (J-E08)는 14 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었다. 13 종의 항균제에 대한 내성균주는 총 5 균주였고 그 패턴은 다양하여 1 균주 (J-E02)는 amikacin과 cefotetan 두 약제에 감수성을 나타내었고, 1 균주 (J-E04)는 ampicillin/sulbactam과 amikacin, 1 균주 (J-E05)는 nalidixic acid와 tobramycin, 1 균주 (J-E06)는 amikacin과 gentamycin, 1 균주 (J-E12)는 ampicillin/sulbactam과 cefotetan에 감수성이었다. 11 종의 항균제에 대해 내성을 나타내는 균주가 1 균주 (J-E01), 10 종의 항균제에 대해 내성을 나타내는 경우가 1 균주 (J-E03)였다. *Klebsiella* 속의 균주는 균종이 다양하여 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*는 26 균주가 분리되었는데 그 내성양상은 다음과 같았다. Amikacin을 제외한 14 종의 항균제에 대해서 내성을 나타내는 경우가 4 균주 (J-K05, J-K06, J-K13, J-K18),

gentamycin을 제외한 14 종의 항균제에 내성을 나타내는 경우가 1 균주 (J-K22)였다. 12 균주 (J-K01, J-K02, J-K03, J-K04, J-K07, J-K08, J-K14, J-K16, J-K17, J-K19, J-K21, J-K25)는 amikacin과 cefotetan을 제외한 13 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었으며, 1 균주 (J-K24)는 nalidixic acid와 cefotetan을 제외한 13 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었다. 12 종의 항균제에 내성을 나타내는 경우는 총 6 균주로 5 균주 (J-K11, J-K12, J-K15, J-K23, J-K26)는 amikacin, cefoxitin, cefotetan에 감수성이었고, 1 균주 (J-K20)는 nalidixic acid, amikacin, cefotetan에 감수성이었다. 11종의 항균제에 대해 내성을 나타내는 경우가 2 균주 (J-K09, J-K10)였다. *K. oxytoca* (J-K27)는 8 종의 항균제에 대해 내성을 나타내었고, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (J-K28)는 13 종의 항균제, *K. planticola* (J-K29)는 13 종의 항균제에 대해서 내성을 나타내었다.

Table 5. Antimicrobial drugs resistant pattern

Species	Multiplicity for 15 drugs	Resistant pattern	Strains No.
<i>E. cloacae</i>	15	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbAnGmCfxCt	01, 02, 03, 05, 06
	14	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfxCt	04, 07, 08
	12	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaCfxCt	09, 11, 12
	11	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SCfxCt	10
<i>E. coli</i>	15	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbAnGmCfxCt	06, 09, 10, 11
	14	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfxCt	08
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfx	02
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazNaTbGmCfxCt	04
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/STbAnCfxCt	05
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbCfxCt	06
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazNaTbAnGmCfx	12
	11	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazNaTbCfx	01
	10	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazTbCfx	03
<i>K. pneumoniae</i>	14	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfxCt	05, 06, 13, 18
<i>subsp. pneumoniae</i>	14	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbAnCfxCt	22
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfx	01, 02, 03, 04, 07, 08, 14, 16, 17, 19, 21, 25
	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/STbAnGmCfx	24
	12	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGm	11, 12, 15, 23, 26
	12	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/STbGmCfx	20
	11	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/STbGm	09,10
<i>K. oxytoca</i>	8	ApAmCfCfzCfpCroCtxCaz	27
<i>K. pneumoniae</i>	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfx	28
<i>subsp. ozaenae</i>			
<i>K. planticola</i>	13	ApAmCfCfzCfpCroCtxCazA/SNaTbGmCfx	29

*Ampicillin (Ap), Amoxicillin (Am), Cephalothin (Cf), Cefazolin (Cfz), Cefoperazone (Cfp), Ceftriaxone (Cro), Cefotaxime (Ctx), Ceftazidime (Caz), Ticarcillin/Clavulanate (T/c), Ampicillin/Sulbactam (A/s), Nalidixic acid (Na), Tobramycin (Tb), Amikacin (An), Gentamycin (Gm), Tetracyclin (Tc), Cefoxitin (Cfx), Cefotetan (Ct)

4. 접합(Conjugation)에 의한 내성전달 시험

ESBL생성 균주의 제 3 세대 항균제 내성획득 원인이 plasmid 매개에 의한것임을 확인하기 위하여 시행한 교차접합 결과는 다음과 같았다. *Enterobacter cloacae* 4 균주 (J-Ct03, J-Ct07, J-Ct08 J-Ct09), *E coli* 10 균주 (J-Et01, J-Et02, J-Et03, J-Et04, J-Et06, J-Et07, J-Et09, J-Et10, J-Et11, J-Et12), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 12 균주 (J-Kt04, J-Kt05, J-Kt07, J-Kt09, J-Kt10, J-Kt11, J-Kt12, J-Kt13, J-Kt14, J-Kt15, J-Kt18, J-Kt23), *K. pneumoniae* subsp. *ozeanae* 1 균주 (J-Kt28), *K. oxytoca* 1 균주 (J-Kt27) 등 총 28 균주에 내성이 전달되었다(Fig 3).

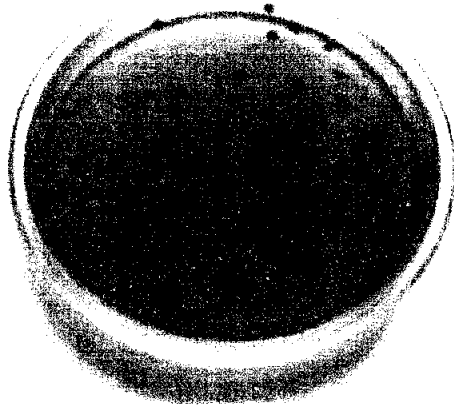


Fig. 3. Result of conjugation. J-Kt18, conjungt of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain J-K18, shown transfer of resistant by conjugation test with *E. coli* strain J53 Azid^R.

5. β -lactamase 의 등전점 유형

균종별 ESBL의 등전점 유형은 다음과 같다. *Enterobacter cloacae*의 경우 12 균주 중 8 균주 (J-C01, J-C02, J-C03, J-C04, J-C05, J-C06, J-C07, J-C08)는 pI 5.4와 pI 8.2에서 2 개의 pI 값을 동시에 가지는 등전점을 형성하였고, 나머지 4 균주들은 1 개의 등전점을 형성하였으며, 그 값은 각각 pI 8.0 (J-C10), pI 8.2 (J-C11, J-C12), pI 8.2 이상 (J-C09)이었다 (Fig 4-1, Table 6).

*E. coli*의 경우 12 균주 중 3 균주는 2 개의 pI 값을 동시에 가지는 등전점을 형성하였는데, 이들중 2 균주 (J-E09, J-E10)는 pI 5.4와 pI 8.0을 동시에 가지는 등전점을, 1 균주 (J-E07)는 pI 5.4와 pI 8.2의 값을 동시에 가지는 등전점을 형성하였다. 6 균주들은 1 개의 등전점을 형성하였으며 그 값은 각각 pI 5.4 (J-E02, J-E11), pI 5.9 (J-E01, J-E03), pI 8.0 (J-E05), pI 8.2 (J-E04)이었다. 나머지 3 균주 (J-E06, J-E08, J-E12)들은 pI 값을 확인할 수 없었다 (Fig 4-2, Table 6).

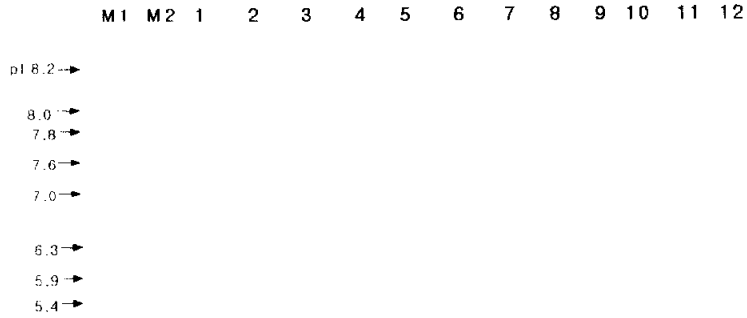
K. pneumoniae subsp. *pneumoniae*의 경우 26 균주중 6 균주는 3 개의 pI 값을 동시에 가지는 등전점을 형성하였는데, 그 값은 각각 pI 5.4/ pI 5.9/ pI 7.7 (J-K18, J-K23)과 pI 5.4/ pI 5.9/ pI 8.2 (J-K03, J-K05) 그리고 pI 5.4/ pI 7.7/ pI 8.2 (J-K20, J-K21)이었다. 8 균주는 2 개의 pI 값을 동시에 가지는 등전점을 형성하였는데 이들중 2 균주 (J-K7, J-K25)는 pI 5.4/ pI 5.9, 3 균주 (J-K14, J-K16, J-K24)는 pI 5.4/ pI 7.7, 1 균주 (J-K09)는 pI 5.9/ pI 8.2, 1 균주 (J-K13)는 pI 7.0, pI 8.2, 1 균주 (J-K06)는 pI 5.9/ pI 8.2이상의 등전점을 형성하였다. 26 균주중 10 균주는 1 개의 pI 값을 가지는 등전점을 형성하였으며, 그 값은 각각 pI 5.4 (J-K19), pI 5.9 (J-K01, J-K04, J-K26), pI 7.7 (J-K15, J-K22), pI 8.2 (J-K02, J-K08), pI 8.2 이상 (J-K10, J-K11)이었다. 나머지 2 균주 (J-K12, J-K17)는 pI 값을 확인할 수 없었다.

할 수 없었다. *K. oxytoca* (J-K27), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (J-K28)와 *K. planticola* (J-K29)는 pI 5.9와 pI 5.4를 동시에 형성하는 등전점 값을 나타내었다 (Fig 4-3, Table 6).

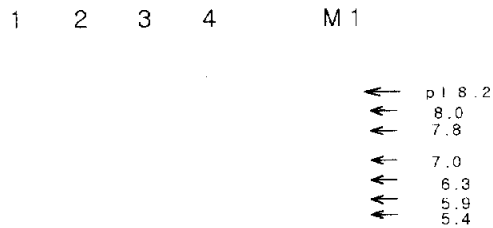
Conjugant들의 등전점 유형은 다음과 같았다. *E. cloacae*의 conjugant들 중 3 균주 (J-Ct03, J-Ct07, J-Ct08)는 pI 5.4와 pI 8.2의 두 개의 등전점을 형성하였고, 나머지 1 균주 (J-Ct09)는 pI 8.2 이상의 등전점을 형성하였다. 이들은 모균주에서 확인되었던 등전점과 같았다 (Fig 4-1).

*E. coli*의 conjugant들은 pI 5.4 (J-Et02, J-Et10), pI 5.9 (J-Et01, J-Et03), pI 7.7 (J-Et06), pI 8.2 (J-Et04, J-Et07)에서 등전점을 형성하였고, 3 균주 (J-Et09, J-Et11, J-Et12)는 등전점을 확인할 수 없었다. pI 5.4 값의 등전점을 형성하였던 J-Et10의 경우 모균주에서는 pI 5.4와 pI 8.0을 동시에 가지는 pI 값을 형성하였지만 conjugant에서는 pI 5.4의 등전점만을 형성하였고, J-Et09와 J-Et11의 경우 모균주에서는 각각 pI 5.4/ pI 8.0과 pI 5.4의 등전점을 형성하였으나 conjugants에서는 등전점을 형성하지 않았다. 나머지 균주들은 모균주에서 형성된 등전점과 같은 유형이었다(Fig 4-2).

Klebsiella 속 균주들의 conjugants 중 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*의 conjugant들은 총 12 균주 중 9 균주가 pI 5.9의 등전점을 형성하였고, 나머지 3 균주 (J-Kt11, J-Kt13, J-Kt18)들은 등전점을 확인할 수 없었다. pI 5.9의 등전점을 형성한 conjugant들 중 3 균주 (J-Kt10, J-Kt14, J-Kt19)는 모균에서는 pI 5.9의 등전점이 확인되지 않았으나 conjugant에서 pI 5.9의 등전점을 형성하였고, 6 균주 (J-Kt04, J-Kt05, J-Kt07, J-Kt09, J-Kt18, J-Kt23)는 모균에서 형성된 등전점 중 pI 5.9의 등전점만을 형성하였다. *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*와 *K. planticola*의 conjugant들도 모균에서 형성된 pI 5.4/pI 5.9의 등전점 중 pI 5.9 값의 등전점만을 형성하였다 (Fig 4-3).

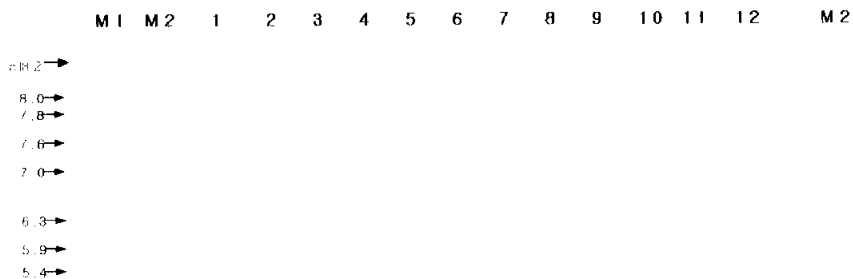


(a)



(b)

Fig 4-1. (a) Isoelectric focusing point of ESBL in *Enterobacter cloacae*. Lane M1 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strains, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pUD21 (SHV-4, pI 7.8) and pAFF2 (SHV-5, pI 8.2). Lane M2 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strain, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pMG229 (SHV-2, pI 7.6), CMY-1 (pI 8.0). Lane 1 to 12: J-C01 to J-C12. **(b) Isoelectric focusing point of ESBL in conjugants of *E. cloacae*.** lane 1; J-Ctr03, lane 2; J-Ctr07, lane 3; J-Ctr08, lane 4; J-Ctr09.

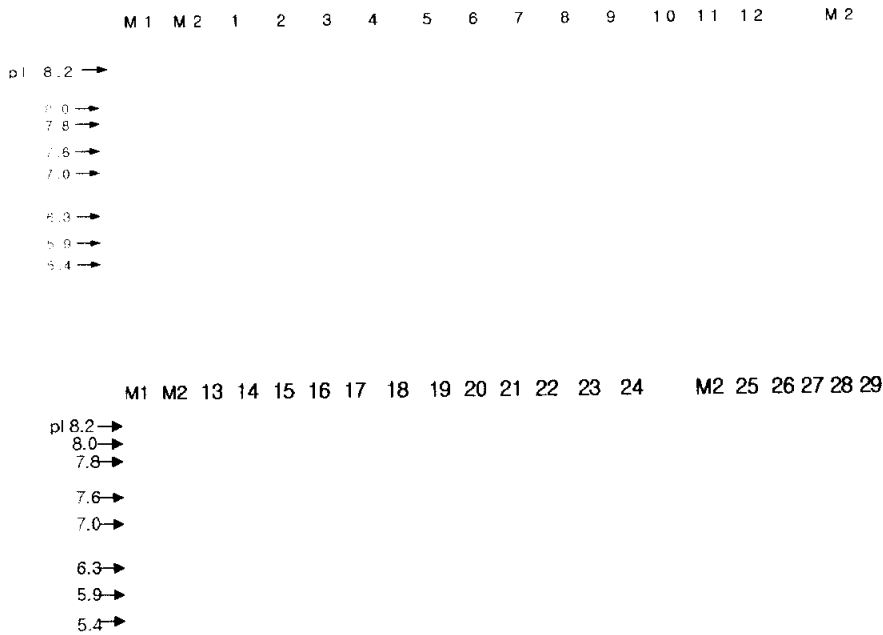


(a)



(b)

Fig 4-2. **(a) Isoelectric focusing point of ESBL in *E. coli*.** Lane M1 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strains, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pMG229 (SHV-2, pI 7.6), CMY 1 (pI 8.0). Lane M2 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strain, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pUD21 (SHV-4, pI 7.8), pAFF2 (SHV-5, pI 8.2). Lane 1 to 12: J-E01 to J-E12. **(b) Isoelectric focusing point of ESBL in conjugants of *E. coli*.** lane 1: J-Etr01, lane 2: J-Etr02, lane 3: J-Etr03, lane 4: J-Etr04, lane 5: J-Etr06, lane 6: J-Etr07, lane 7: J-Etr09, lane 8: J-Etr10, lane 9: J-Etr11, lane 10: J-Etr12.



(a)



(b)

Fig 4-3. (a) Isoelectric focusing point of ESBL in *Klebsiella* spp. Lane M1 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strains, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pMG229 (SHV-2, pI 7.6), CMY-1 (pI 8.0). Lane M2 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strain, pBR322 (TEM-1, pI 5.4), pUD16 (TEM-4, pI 5.9), pCFF04 (TEM-3, pI 6.3), pUD18 (SHV-3, pI 7.0), pUD21 (SHV-4, pI 7.8), pAFF2 (SHV-5, pI 8.2). Lane 1 to 29: J-K01 to J-K29. **(b) Isoelectric focusing point of ESBL in conjugant of *Klebsiella* spp.** lane 1: J-Ktr04, lane 2: J-Ktr05, lane 3: J-Ktr07, lane 4: J-Ktr09, lane 5: J-Ktr10, lane 6: J-Ktr11, lane 7: J-Ktr13, lane 8: J-Ktr14, lane 9: J-Ktr15, lane 10: J-Ktr18, lane 11: J-Ktr19, lane 12: J-Ktr23, lane 13: J-Ktr27, lane 14: J-Ktr28.

Table 6. pI value of β -lactamases in this study

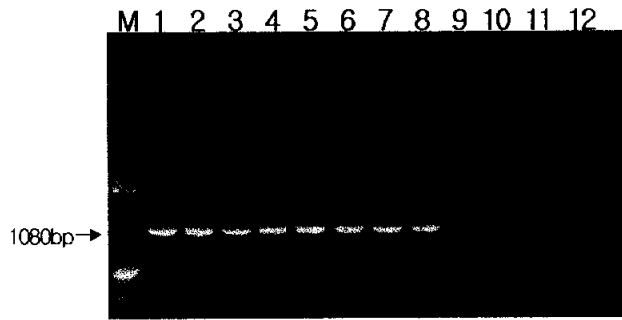
Species	PI value	most likely β -lactamase phenotype	Strains No.	NO. of strains
<i>E. cloacae</i>	5.4/8.2	TEM-1, 7, 19 / SHV-5, 12	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08	8
	8.0	CMY-1	10	1
	8.2	SHV-5, 12	11, 12	2
	8.2<	-	09	1
<i>E. coli</i>	5.4	TEM-1, 7, 19	02, 11	2
	5.9	TEM-4, 6, 8, 15, 52	01, 03	2
	8.0	CMY-1	05	1
	8.2	SHV-5, 12	04	1
	5.4/8.0	TEM-1, 7, 19 / CMY-1	09, 10	2
	5.4/8.2	TEM-1, 7, 19 / SHV-5, 12	07	1
	unvisible	-	06, 08, 12	3
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	5.4	TEM-1, 7, 19	19	1
	5.9	TEM-4, 6, 8, 15, 52	01, 04, 26	3
	7.7	SHV-4	15, 22	2
	8.2	SHV-5, 12	02, 08	2
	5.4/5.9	TEM-1, 7, 19 / TEM-4, 6, 8, 15, 52	07, 25	2
	5.4/7.7	TEM-1, 7, 19 / SHV-4	14, 16, 24	3
	5.9/8.2	TEM-4, 6, 8, 15, 52 / SHV-5, 12	09	1
	7.0/8.2	SHV-3 / SHV-5	13	1
		TEM-1, 7, 19 / TEM-4, 6, 8, 15, 52 /	18, 23	2
	5.4/5.9/7.7	SHV-4		
	5.4/7.7/8.2	TEM-1, 7, 19 / SHV-4 / SHV-5	20, 21	2
	5.4/5.9/8.2	TEM-1,7,19/TEM-4, 6, 8, 15, 52/ -	03, 05	2
	5.9/8.2<	TEM-4, 6, 8, 15, 52 / -	06	1
	8.2<	-	10, 11	2
unvisible	-	12, 17	2	
<i>K. oxytoca</i>	5.4/ 5.9	TEM-4, 6, 8, 15,52 / SHV-4	27	1
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	5.4/ 5.9	TEM-4, 6, 8, 15, 52 / SHV-4	28	1
<i>K. planticola</i>	5.4/ 5.9	TEM-4, 6, 8, 15, 52 / SHV-4	29	1

6. PCR을 이용한 ESBL의 형별분류

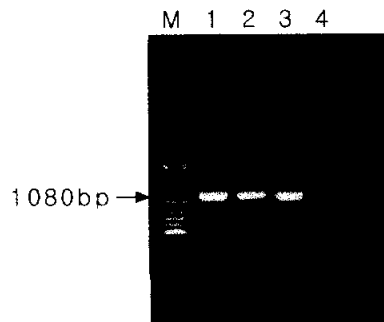
ESBL의 형별분류를 위하여 TEM, SHV, CMY-1 형의 공시된 공통적인 보존적 염기서열을 primer로 제작하여 PCR을 시행한 결과는 다음과 같았다 (Table 7). *Enterobacter cloacae*의 경우 8 균주 (J-C01, J-C02, J-C03, J-C04, J-C05, J-C06, J-C07, J-C08)가 1,080 bp에서 전형적인 TEM 형 PCR 산물을 생성하였다 (Fig. 5-1). *E. coli*의 경우 8 균주 (J-E01, J-E02, J-E03, J-E07, J-E08, J-E09, J-E10, J-E11)가 TEM 형 PCR 산물을 생성하였고 (Fig 5-2), 1 균주 (J-E02)가 SHV 형의 PCR 산물을 생성하였다 (Fig 6-1). *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*의 경우 J-K13, J-K15, J-K22를 제외한 23균주에서 TEM 형 PCR 산물을 생성하였고 (Fig 5-3), 15 균주 (J-K02, J-K05, J-K06, J-K08, J-K09, J-K10, J-K11, J-K13, J-K17, J-K18, J-K19, J-K21, J-K22, J-K24, J-K25)에서 880 bp의 전형적인 SHV 형의 PCR 산물을 생성하였다. *Klebsiella oxytoca* (J-K27)와 *Klbsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (J-K28)는 TEM 형 PCR 산물을 생성하였고, *Klbsiella planticola* (J-K29)는 TEM형과 SHV 형 PCR 산물을 형성하였다 (Fig 6-2).

Cephamycin인 cefoxitin과 cefotetan에 대해 한가지 이상의 약제에 내성을 나타내었던 28 균주에 대해서 CMY-1 형 PCR을 시행한 결과 오직 *E. coli* J-E05 1 균주에서만 1,097 bp의 CMY-1 형의 PCR 생성물이 형성되었다 (Fig. 7).

Conjugants가 형성된 28 균주를 TEM 형과 SHV 형 PCR을 실시하여 모균주와의 상관관계를 확인한 결과 conjugants들은 모균주에서 확인되었던 PCR 생성물을 형성하였다. 그러나 J-Ktr11 1 균주는 SHV 형의 PCR 생성물은 형성하였으나, TEM 형 생성물은 형성하지 않았다 (Fig 5-1, 5-2, 5-3, 6-1, 6-2).

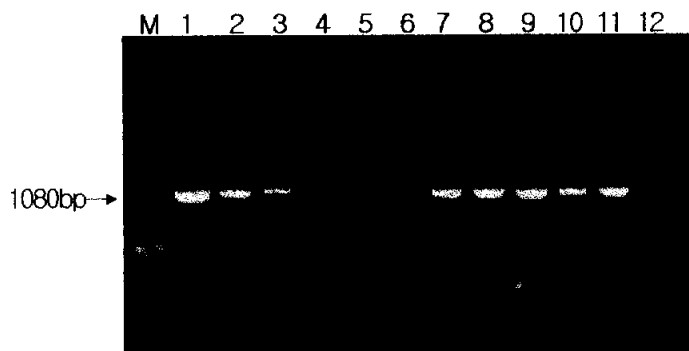


(a)

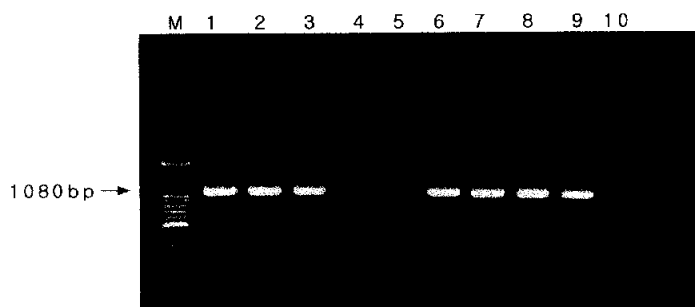


(b)

Fig. 5-1. (a) TEM gene products of *Enterobacter cloacae*. Lane M; 100bp DNA ladder(bioneer). lane 1 to 12; J-C01 to J-C12. (b) TEM gene products of conjugant strain of *E. cloacae*. lane 1; J-Ctr03, lane 2; J-Ctr07, lane 3; J-Ctr08, lane 4; J-Ctr09

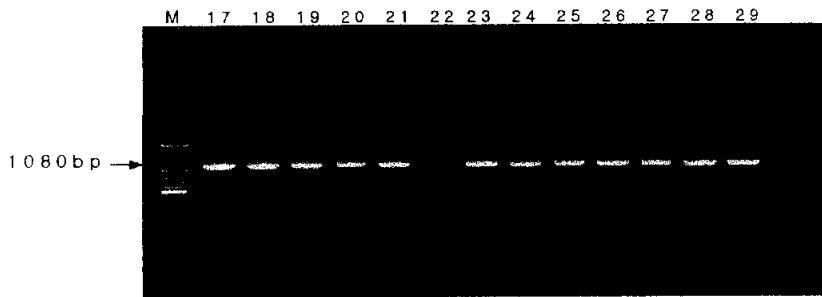
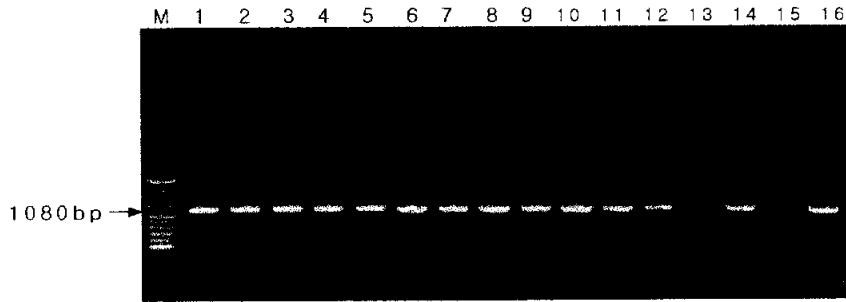


(a)

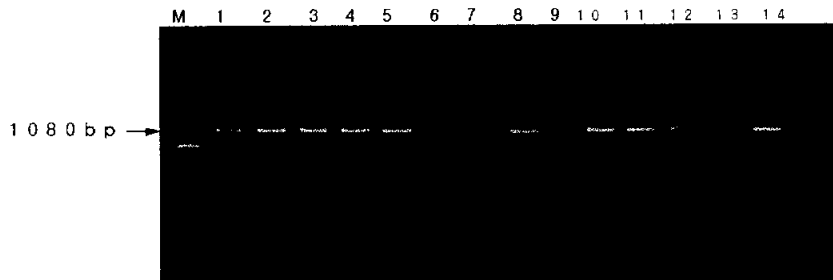


(b)

Fig. 5-2. (a) TEM gene products of *Escherichia coli*. Lane M; 100bp DNA ladder(bioneer). lane 1 to 12; J-E01 to J-E12. (b) TEM gene products of conjugant strain of *E. coli*. lane 1; J-Etr01, lane 2; J-Etr02, lane 3; J-Etr03, lane 4; J-Etr04, lane 5; J-Etr06, lane 6; J-Etr07, lane 7; J-Etr09, lane 8; J-Etr10, lane 9; J-Etr11, lane 10; J-Etr12.



(a)

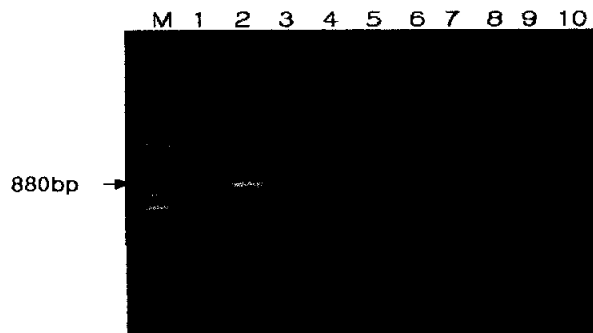


(b)

Fig.5-3. (a) TEM gene products of *Klebsiella* spp. Lane M; 100bp DNA ladder(bioneer) lane 1 to 29; J-K01 to J-K29. (b) TEM gene products of conjugant strain of *Klebsiella* spp. lane 1; J-Ktr04, lane 2; J-Ktr05, lane 3; J-Ktr07, lane 4; J-Ktr09, lane 5; J-Ktr10, lane 6; J-Ktr11, lane 7; J-Ktr13, lane 8; J-Ktr14, lane 9; J-Ktr15, lane 10; J-Ktr18, lane 11; J-Ktr19, lane 12; J-Ktr23, lane 13; J-Ktr27, lane 14; J-Ktr28.

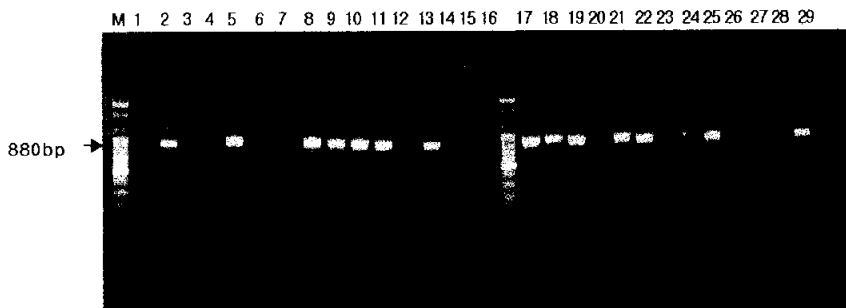


(a)

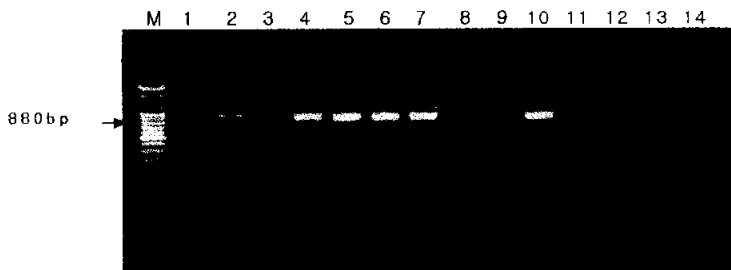


(b)

Fig. 6-1. (a) SHV gene products of *Escherichia coli*. Lane M; 100bp DNA ladder(bioneer). lane 1 to 12; J-E01 to J-E12. **lane 2; J-E02**(b) TEM gene products of conjugant strain of *E. coli*. lane 1; J-Etr01, **lane 2; J-Etr02**, lane 3; J-Etr03, lane 4; J-Etr04, lane 5; J-Etr06, lane 6; J-Etr07, lane 7; J-Etr09, lane 8; J-Etr10, lane 9; J-Etr11, lane 10; J-Etr12.



(a)



(b)

Fig. 6-2. (a) SHV gene products of *Klebsiella* spp. Lane M; 100bp DNA ladder(bioneer). lane 1 to 29; J-K01 to J-K29. (b) SHV gene products of conjugant strain of *Klebsiella* spp. lane 1; J-Ktr04, lane 2; J-Ktr05, lane 3; J-Ktr07, lane 4; J-Ktr09, lane 5; J-Ktr10, lane 6; J-Ktr11, lane 7; J-Ktr13, lane 8; J-Ktr14, lane 9; J-Ktr15, lane 10; J-Ktr18, lane 11; J-Ktr19, lane 12; J-Ktr23, lane 13; J-Ktr27, lane 14; J-Ktr28.

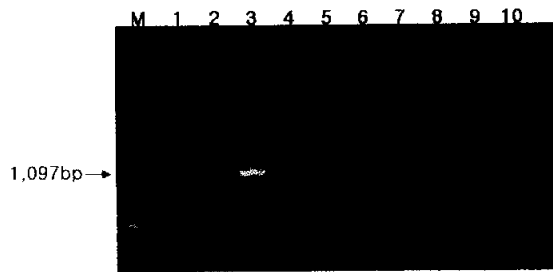


Fig. 7. CMY-1 gene product. One *E. coli* strains of twenty-eight strains of cephamycin(cefodoxitin or cefotetan)-resistant *Enterobacteriaceae* was confirmed to have CMY-1 β -lactamase by PCR. Lane 2; J-E05

Table 7. ESBL typing by PCR

Species	PCR type	Strain No.	No. of strains
<i>E. cloacae</i>	TEM	J-C01, J-C02, J-C03, J-C04, J-C05 J-C06, J-C07, J-C08	8
	Unidentified	J-C09, J-C10, J-C11, J-C12	4
<i>E. coli</i>	TEM	J-E01, J-E03, J-E07, J-E08, J-E09 J-E10, J-E11	7
	CMY-1	J-E05	1
	TEM+SHV	J-E02	1
	Unidentified	J-E04, J-E06, J-E12	3
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	TEM	J-K01, J-K03, J-K04, J-K07, J-K12 J-K14, J-K20, J-K23, J-K26	11
	SHV	J-K13, J-K22	2
	TEM+SHV	J-K02, J-K05, J-K06, J-K08, J-K09 J-K10, J-K11, J-K16, J-K17, J-K18 J-K19, J-K21, J-K24, J-K25	15
	Unidentified	J-K15	1
<i>K. oxytoca</i>	TEM	J-K27	1
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	TEM	J-K28	1
<i>K. planticola</i>	TEM+SHV	J-K29	1

7. 염기서열 분석

등전점 조사와 PCR 시험을 기초로하여 염기서열 분석 균주를 선정하여, 그들이 생성하는 β -lactamase gene의 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 균주는 conjugants에서 선정하였으며, conjugants에서 나타나지 않은 유형의 β -lactamase는 모균주에서 선정하였다. 염기서열 분석 균주는 총 8 균주로서 TEM 형 5 균주, SHV 형 3 균주, CMY-1 형 1 균주였다. 즉 TEM 형의 β -lactamase는 J-Ct03 (pI 5.4), J-Et02 (pI 5.4), J-Et03 (pI 5.9), J-Kt04 (pI 5.9), J-K19 (pI 5.4)였고, SHV 형의 β -lactamase는 J-Et02 (등전점을 형성하지 않음), J-K02 (pI 8.2), J-K22 (pI 7.7)였으며, J-E05의 CMY-1 형 β -lactamase (pI 8.0) 였다.

염기서열 분석결과 (Fig 8. Fig 10. Fig 12) pI 5.4의 β -lactamase (J-Ct03, J-Et02, J-K19)는 TEM-1 형 β -lactamase였으며, pI 5.9의 β -lactamase (J-Et03, J-Kt04)는 TEM-52 형 β -lactamase와 염기서열이 일치하였다. 또한 pI 7.7의 β -lactamase (J-K22)와 pI 값을 형성하지 않았던 J-Et02의 β -lactamase는 SHV-2a 형 β -lactamase과 염기서열이 일치하였으며, pI 8.2의 β -lactamase (J-K02)는 SHV-12와 염기서열이 일치하였다. 그리고 pI 8.0의 CMY-1 β -lactamase (J-E05)는 CMY-1 β -lactamase와 유전자 염기서열이 일치하였다.

이들의 아미노산 서열을 살펴보면 TEM 형 β -lactamase의 경우 TEM-52 형 β -lactamase는 TEM-1 β -lactamase와 비교하여 세균대의 아미노산 변이가 일어났는데 각각 아미노산 서열 102번의 glutamic acid 가 lysine으로, 180번의 methionine이 threonine으로, 그리고 236번의 glycine이 serine으로 변이가 되었다 (Fig 9. Table 8).

SHV 형 β -lactamase의 경우 SHV-2a형 β -lactamase는 SHV-1 형 β -lactamase과 비교하여 두 군데의 아미노산 변이가 있었는데 아미노산 서열 31번의 leucine이 glutamine으로, 234번의 glycine이 serine으로 변환되었으며, SHV-12 형 β -lactamase는 SHV-1형 β -lactamase의 아미노산 서열과 세 군데의 아미노산 서열에 변이가 일어났는데, 31번의 leucine이 glutamine으로, 234번의 glycine이 serine으로 바뀌었으며, 236번 glutamic acid가 lysine으로 변환되었다 (Fig 11. Table 9).

Table 8. Amino acid change of TEM type β -lactamases in this study

β -lactamase	Amino acid at sequence position		
	102	180	236
TEM-1	Glu (GAG)	Met (ATG)	Gly (GGT)
TEM-52	Lys (AAG)	Thr (ACG)	Ser (AGT)

* Amino acid numbering is according to Fig 11. in this study.

Glu; glutamic acid, Gly; glycine, Lys; lysine, Met; methionine, Ser; serine, Thr; threonine.

Table 9. Amino acid change of SHV type β -lactamases in this study

β -lactamase	Amino acid at sequence position		
	31	234	236
SHV-1	Leu (CTA)	Gly (GGC)	Glu (GAG)
SHV-2a	Gln (CAA)	Ser (AGC)	Glu (GAG)
SHV-12	Gln (CAA)	Ser (AGC)	Lys (AAG)

* Amino acid numbering is according to Fig 12. in this study.

Gln; Glutamine, Glu; glutamic acid, Gly; glycine, Leu; leucine, Lys; lysine, Ser; serine,

J-Ct03 -TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 59
J-Et02 -TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 59
J-K19 ATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 60
J-Et03 -TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 59
J-Kt04 -TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA 59

J-Ct03 TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT 119
J-Et02 TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT 119
J-K19 TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT 120
J-Et03 TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT 119
J-Kt04 TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT 119

J-Ct03 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAA 179
J-Et02 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAA 179
J-K19 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAA 180
J-Et03 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAA 179
J-Kt04 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGGTAAA 179

J-Ct03 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTA 239
J-Et02 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTA 239
J-K19 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTA 240
J-Et03 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTA 239
J-Kt04 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTA 239

J-Ct03 TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAGACGCTGGTGAAAAG 299
J-Et02 TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAAG 299
J-K19 TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAAG 300
J-Et03 TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAAG 299
J-Kt04 TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAAG 299

Fig. 8. Nucleotide sequence of TEM type β -lactamase gene in this study. TEM type β -lactamase genes of pI 5.4 value (J-Ct03, J-Et02, J-K19) were assumed that is TEM-1 type β -lactamase genes. Nucleotide sequence of TEM type β -lactamase genes of pI 5.9 value (J-Et03, J-Kt04) were equal with necleotide sequence of TEM-52 type β -lactamase gene.

J-Ct03 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA 359
J-Et02 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA 359
J-K19 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA 360
J-Et03 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA 359
J-Kt04 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA 359

J-Ct03 GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA 419
J-Et02 GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA 419
J-K19 GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA 420
J-Et03 GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA 419
J-Kt04 GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA 419

J-Ct03 AAGTTCGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC 479
J-Et02 AAGTTCGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC 479
J-K19 AAGTTCGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC 480
J-Et03 AAGTTCGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC 479
J-Kt04 AAGTTCGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC 479

J-Ct03 GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC 539
J-Et02 GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC 539
J-K19 GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC 540
J-Et03 GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTAAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC 539
J-Kt04 GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTAAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC 539

J-Ct03 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA 599
J-Et02 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA 599
J-K19 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA 600
J-Et03 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA 599
J-Kt04 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA 599

- Fig. 8 - continued -

J-Ct03 CTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC 659
J-Et02 CTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC 659
J-K19 CTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC 660
J-Et03 CTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC 659
J-Kt04 CTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC 659

J-Ct03 ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA 719
J-Et02 ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA 719
J-K19 ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA 720
J-Et03 ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA 719
J-Kt04 ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA 719

J-Ct03 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC 779
J-Et02 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC 779
J-K19 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC 780
J-Et03 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC 779
J-Kt04 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC 779

J-Ct03 TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG 839
J-Et02 TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG 839
J-K19 TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG 840
J-Et03 TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG 839
J-Kt04 TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG 839

J-Ct03 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG 899
J-Et02 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG 899
J-K19 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG 900
J-Et03 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG 899
J-Kt04 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG 899

- Fig. 8 - continued -

J-Ct03 ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG 959
 J-Et02 ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG 959
 J-K19 ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG 960
 J-Et03 ATAAATCTGGAGCCAGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG 959
 J-Kt04 ATAAATCTGGAGCCAGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG 959

J-Ct03 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC 1019
 J-Et02 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC 1019
 J-K19 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC 1020
 J-Et03 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC 1019
 J-Kt04 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC 1019

J-Ct03 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGCTAACTGTCA 1075
 J-Et02 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGCTAACTGTCA 1075
 J-K19 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGCTAACTGTCA 1076
 J-Et03 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGCTAACTGTCA 1075
 J-Kt04 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGCTAACTGTCA 1075

- Fig. 8 - continued -

blaTEM-1 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
J-Ct03 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
J-Et02 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
J-K19 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
J-Et03 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
J-Kt04 MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60

∨

blaTEM-1 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
J-Ct03 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
J-Et02 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
J-K19 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
J-Et03 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVKYS^PVTEKHLTDGMTVREL 120
J-Kt04 EERFPMMS^TFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVKYS^PVTEKHLTDGMTVREL 120

∨

blaTEM-1 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTM 180
J-Ct03 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTM 180
J-Et02 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTM 180
J-K19 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTM 180
J-Et03 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTT 180
J-Kt04 CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAF^LHNMGD^HVTRLD^RWEP^ELNEAIP^NDERD^TTT 180

∨

blaTEM-1 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGAGER^GS 240
J-Ct03 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGAGER^GS 240
J-Et02 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGAGER^GS 240
J-K19 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGAGER^GS 240
J-Et03 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGASER^GS 240
J-Kt04 PAAMATTLR^KLLTGELLTASR^QQLIDWMEADK^VAGP^LLR^SALPAGWFIADK^SGASER^GS 240

blaTEM-1 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286
J-Ct03 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286
J-Et02 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286
J-K19 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286
J-Et03 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286
J-Kt04 RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLI^KHW 286

Fig. 9. Alignment of amino acid sequence of TEM type β -lactamase genes in this study. The symbol (∨) refer to amino acid change position. blaTEM-1 gene is *E. coli* plasmid pBR322 (Sutcliffe, 1978). J-Ct03, J-Et02, J-K19 were TEM-1 type β -lactamase. J-Et03, J-Kt04 were TEM-52 type β -lactamase.

J-Et02 TTCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCTGTGTATTATCTCCCTGTTA 60
 J-K02 TTCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCTGTGTATTATCTCCCTGTTA 60
 J-K22 TTCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCTGTGTATTATCTCCCTGTTA 60

J-Et02 GCCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGC 120
 J-K02 GCCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGC 120
 J-K22 GCCACCCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGC 120

J-Et02 GAAAGCCAGCTGTCCGGCCGCTAGGCATGATAGAAATGGATCTGCCAGCGCCGCACG 180
 J-K02 GAAAGCCAGCTGTCCGGCCGCTAGGCATGATAGAAATGGATCTGCCAGCGCCGCACG 180
 J-K22 GAAAGCCAGCTGTCCGGCCGCTAGGCATGATAGAAATGGATCTGCCAGCGCCGCACG 180

J-Et02 CTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTC 240
 J-K02 CTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTC 240
 J-K22 CTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTC 240

J-Et02 TCGCGCCAGTGTCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGACCGAAAGATCCAC 300
 J-K02 TCGCGCCAGTGTCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGACCGAAAGATCCAC 300
 J-K22 TCGCGCCAGTGTCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGACCGAAAGATCCAC 300

J-Et02 TATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGC 360
 J-K02 TATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGC 360
 J-K22 TATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGC 360

Fig. 10. Nucleotide sequence of SHV type β -lactamase gene in this study. Nucleotide sequence of SHV type β -lactamase genes of pI 7.7 value (J-K22) was equal with nucleotide sequence of SHV-2a type β -lactamase genes. Nucleotide sequence of SHV type β -lactamase genes of pI 8.2 value (J-K02) and J-Et02 were equal with nucleotide sequence of SHV-12 type β -lactamase gene.

J-Et02 ATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCCAAT 420
 J-K02 ATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCCAAT 420
 J-K22 ATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCCAAT 420

J-Et02 CTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGC 480
 J-K02 CTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGC 480
 J-K22 CTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGC 480

J-Et02 GACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGCGAC 540
 J-K02 GACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGCGAC 540
 J-K22 GACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGCGAC 540

J-Et02 GCCCCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGC 600
 J-K02 GCCCCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGC 600
 J-K22 GCCCCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGC 600

J-Et02 CAGCGTCTGAGCGCCCGTTCCGAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTC 660
 J-K02 CAGCGTCTGAGCGCCCGTTCCGAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTC 660
 J-K22 CAGCGTCTGAGCGCCCGTTCCGAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTC 660

J-Et02 GCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGA 720
 J-K02 GCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGA 720
 J-K22 GCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGA 720

J-Et02 GCTAGCAAGCGGGTGCGCGCGGATTGTCCGCTGCTTGGCCCCAATAACAAAGCAGAG 780
 J-K02 GCTAGCAAGCGGGTGCGCGCGGATTGTCCGCTGCTTGGCCCCAATAACAAAGCAGAG 780
 J-K22 GCTAGCGAGCGGGTGCGCGCGGATTGTCCGCTGCTTGGCCCCAATAACAAAGCAGAG 780

- Fig. 10 - continued -

J-Bt02 CGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAA 840
J-K02 CGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAA 840
J-K22 CGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAA 840

J-Bt02 ATCGCCGGGATCGGCCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA 885
J-K02 ATCGCCGGGATCGGCCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA 885
J-K22 ATCGCCGGGATCGGCCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA 885

- Fig. 10 - continued -

v

blaSHV-1 MR YIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKQSESQLSGRVGMIEMDLASGRILTAWRADE 60
J-Et02 MR YIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKQSESQLSGRVGMIEMDLASGRILTAWRADE 60
J-K02 MR YIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKQSESQLSGRVGMIEMDLASGRILTAWRADE 60
J-K22 MR YIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIKQSESQLSGRVGMIEMDLASGRILTAWRADE 60

blaSHV-1 RFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCA 120
J-Et02 RFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCA 120
J-K02 RFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCA 120
J-K22 RFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCA 120

blaSHV-1 AAITMSDNSAAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPA 180
J-Et02 AAITMSDNSAAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPA 180
J-K02 AAITMSDNSAAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPA 180
J-K22 AAITMSDNSAAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPA 180

v v

blaSHV-1 SMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGACERGARG 240
J-Et02 SMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASKRGARG 240
J-K02 SMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASKRGARG 240
J-K22 SMAATLRKLLTSQRLSARSQRQLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASERGARG 240

blaSHV-1 IVALLGPNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
J-Et02 IVALLGPNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
J-K02 IVALLGPNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
J-K22 IVALLGPNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286

Fig. 11. Alignment of amino acid sequence of SHV type β -lactamase genes in this study. The symbol (v) refer to amino acid change position. blaSHV-1 gene is *E. coli* strain HB101 SHV-1 beta-lactamase (blaSHV-1) gene (Bradford, 1999). J-K22 was SHV-2a type β -lactamase. J-Et02, J-K02 were SHV-12 type β -lactamase.

*bla*CMY-1 TCCTCGAGCTATCAGGCTAGAGATTTTACCGCCAAATCGAACCTTATTAGAGCGGTTTA 60
*bla*CMY-1 GGCTGGACCGGCAGTTAAAAATTGGGCTTGAGCGGTAAACGAGTGAGGGAATTTACAGGTA 120
*bla*CMY-1 AGATACTTCGGATGAGGAGCAAAAAGGTGGTTTATACTTCTATACCCGGGGGGCAAGT 180
*bla*CMY-1 CATGGATAAACCATTGAAACTGGGCTATTTGAACGCCGACTTTCACAATCGGCTTCACAGAG 240
-35
*bla*CMY-1 CCTCATATTGGGCACAACCTTGCGGGATTAGGCTGGGAGCACTGCCAGGCACCCAGGCAGC 300
-10
*bla*CMY-1 ACATTCGACTTATGACGAGAGGAGTAGACCCGATGCAACAACGACAATCCATCCTGTGGG 360
K-E26 RBS ATGCAACAACGACAATCCATCCTGTGGG 28

*bla*CMY-1 GGGCCGTGGCCACCCGTGATGTGGCCCGTCTGGCCATGCAGGTGAGGCTTCACCCGGTGG 420
K-E26 GGGCCGTGGCCACCCGTGATGTGGCCCGTCTGGCCATGCAGGTGAGGCTTCACCCGGTGG 88

*bla*CMY-1 ATCCCTGCGCCCGTGGTGGATGCCAGCATCCAGCCGTGCTCAAGGAGCACAGGATCC 480
K-E26 ATCCCTGCGCCCGTGGTGGATGCCAGCATCCAGCCGTGCTCAAGGAGCACAGGATCC 148

*bla*CMY-1 CGGGCATGGCGGTGGCCGTGCTCAAGGATGGCAAGGCCACTACTTCAATTACGGGGTGG 540
K-E26 CGGGCATGGCGGTGGCCGTGCTCAAGGATGGCAAGGCCACTACTTCAATTACGGGGTGG 208

*bla*CMY-1 CCAACCGGGAGAGCGGGGCGCGTTCAGCGAGCAGACCCGTTCGAGATAGGATCCGTGA 600
K-E26 CCAACCGGGAGAGCGGGGCGCGTTCAGCGAGCAGACCCGTTCGAGATAGGATCCGTGA 268

*bla*CMY-1 GCAAGACCCTGACTGCGACCCGCGGGGCTATGCGGTGGTCAAGGGAGCGATGCAGCTGG 660
K-E26 GCAAGACCCTGACTGCGACCCGCGGGGCTATGCGGTGGTCAAGGGAGCGATGCAGCTGG 328

Fig 12. Nucleotide sequence of the CMY-1 type β -lactamase gene. The amino acid sequence of CMY-1 type β -lactamase gene is shown in the line below the nucleotide triplets. *bla*CMY-1 was pMVP-1-1a (Bauernfeind, *et al.* 1996). RBS is ribosome binding site and -35, -10 are possible promoter sequence.

bla_{CMY-1} ATGACAAGGCGAGCGGCCACGGCCCTGGCTCAAGGGATCCGCCCTTTGACAGCATCACCA 720
 K-E05 ATGACAAGGCGAGCGGCCACGGCCCTGGCTCAAGGGATCCGCCCTTTGACAGCATCACCA 388

bla_{CMY-1} TGGGGGAGCTTGCCACCTACAGCGCCGGAGGCCTGCCACTGCAATTTCCCGAGGAGGTGG 780
 K-E05 TGGGGGAGCTTGCCACCTACAGCGCCGGAGGCCTGCCACTGCAATTTCCCGAGGAGGTGG 448

bla_{CMY-1} ATTTCATCCGAGAAGATGCGCGCTACTACCGCCAGTGGGCCCTGTCTATTGCGCGGGCT 840
 K-E05 ATTTCATCCGAGAAGATGCGCGCTACTACCGCCAGTGGGCCCTGTCTATTGCGCGGGCT 508

bla_{CMY-1} CCCATCGCCAGTACTCCAACCCAGCATAGGGCTGTTCGGCCACTGGCGGCGAGCAGCC 900
 K-E05 CCCATCGCCAGTACTCCAACCCAGCATAGGGCTGTTCGGCCACTGGCGGCGAGCAGCC 568

bla_{CMY-1} TGAAGCAGCCGTTTGCCCCCTTGATGGAGCAGACCCTGCTGCCCGGGCTCGGCATGCACC 960
 K-E05 TGAAGCAGCCGTTTGCCCCCTTGATGGAGCAGACCCTGCTGCCCGGGCTCGGCATGCACC 628

bla_{CMY-1} ACACCTATGTCAATGTGCCGAAGCAGGCCATGGCGAGTTATGCCTATGGCTATTGAAAAG 1020
 K-E05 ACACCTATGTCAATGTGCCGAAGCAGGCCATGGCGAGTTATGCCTATGGCTATTGAAAAG 688

bla_{CMY-1} AGGACAAGCCATCCGTGTCAACCCCTGGCATGCTGGCGGACGAGGCCTATGGCATCAAGA 1080
 K-E05 AGGACAAGCCATCCGTGTCAACCCCTGGCATGCTGGCGGACGAGGCCTATGGCATCAAGA 748

bla_{CMY-1} CCAGCTCGGCGGATCTGCTGCGTFTTGTGAAGGCCAACATCGGCGGGGTGATGACAAGG 1140
 K-E05 CCAGCTCGGCGGATCTGCTGCGTFTTGTGAAGGCCAACATCGGCGGGGTGATGACAAGG 808

bla_{CMY-1} CGTTGCAGCAGGCCATCTCCCTGACCCACCAAGGGCATTACTCGGTAGGGGGGATGACCC 1200
 K-E05 CGTTGCAGCAGGCCATCTCCCTGACCCACCAAGGGCATTACTCGGTAGGGGGGATGACCC 868

bla_{CMY-1} AGGGGCTGGGTGGGAGAGTTACGCCTATCCCGTCACCGAGCAGACATTGCTGGCGGGCA 1260
 K-E05 AGGGGCTGGGTGGGAGAGTTACGCCTATCCCGTCACCGAGCAGACATTGCTGGCGGGCA 928

- Fig. 12 - continued -

blaCMY-1 ATTCGGCCAAGGTGATCCTCGAAGCCAATCCGACGGGGGGCCCCGGGAGTCGGGGAGCC 1320
 K-E05 ATTCGGCCAAGGTGATCCTCGAAGCCAATCCGACGGGGGGCCCCGGGAGTCGGGGAGCC 988

blaCMY-1 AGGTGCTCTTCAACAAGACCGGCTCGACCAATGGCTTTGGGGCCTATGTGGCCTTCGTGC 1380
 K-E05 AGGTGCTCTTCAACAAGACCGGCTCGACCAATGGCTTTGGGGCCTATGTGGCCTTCGTGC 1048

blaCMY-1 CGGCCAGGGGATGGCATCGTCATGCTGGCCAATCGCAACTACCCCAACGAGGGCGGCA 1440
 K-E05 CGGCCAGGGGATGGCATCGTCATGCTGGCCAATCGCAACTACCCCAAC 1098

blaCMY-1 TCAAGGGGGCCACGCCATCCTGGGCGAGTTGGCCGGTTGAAAAGAAAGAGGGCGGTACAT 1500

blaCMY-1 TCCGTGAAATGTGCCGCCCTTTTCTCGGTGCTGGGGGAATAACCCCGCTAGTCGTACTGCT 1560

- Fig. 12 - continued -

IV. 고찰

본 연구는 부산지역의 주요 지방하천인 낙동강, 수영천, 온천천, 동천의 하천수와 광안리 해수욕장 입구의 하수종말 처리장의 방류수로부터 장내세균을 분리하여 이들 균주가 자연환경에서 광범위 β -lactam 항균제 분해효소 (extended spectrum β -lactamase, ESBL) 생성능력을 획득하였는지 알아보기 위하여 실시되었다.

본 연구에서 분리된 *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* 및 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*는 모두 장내세균에 속한 Gram 음성세균들로 이들은 인체에 정상 세균총으로도 작용하지만, 병원성 세균으로 요로감염, 패혈증, 뇌막염, 폐렴의 원인균일 뿐만 아니라 원내 감염균으로 중요시 되는 균종들이다 (Ewing, et al. 1986; Holt, et al. 1994; Grimot, et al. 1991).

본 연구에서 분리된 53 균주 중 *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (26 균주)가 가장 많이 분리되었고, 다음으로 *E. coli* (12 균주)와 *E. cloacae* (12 균주)가 분리되었다. 분리된 균주를 지역별로 살펴보면 온천천 18 균주, 동천에서 17 균주씩으로 많이 분리되었는데 이는 온천천과 동천이 도심을 관통하고 있기 때문에 생활하수로부터 유래된 것으로 생각된다. 수영강과 낙동강에서는 예상외로 적게 분리되었다(Table 3).

임상에서 분리된 ESBL 생성균주에 대한 연구는 1983년 독일에서 *E. coli*,와 *K. pneumoniae* 에 대하여 처음 보고된 이래 그 생물학적 성상이 많이 연구되었으며, 점 돌연변이에 따른 여러 유형이 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Mederios, 1993).

디스크 상승 시험 (double disk synergy test) 양성반응은 균종에

따라, 또는 균주에 따라 약제간의 거리에 다소 변화가 있어서 15-30 mm 까지 다양하다 (김 과 이, 2000). 본 실험은 이미 발표된 국내 보고자들 (김 등, 1999; 김 과 이, 2000; 배 등, 1997; 송 등, 1999; 이 등, 1994; 이, 2001)의 결과에 따라 20 mm로 시험하였다. 시험 결과 *E. coli* 와 *Klebsiella* 속의 균주들은 모두 20 mm에서 전형적인 synergy 형상이 나타났지만, *E. cloacae*의 경우 10 mm에서 synergy 현상이 확인되었다. 이 거리는 기존에 알려진 결과들보다 짧았다 (이, 2001; Pitout, *et al.* 1998).

항균제 내성양상 결과 penicillin 계열을 비롯하여 제 1, 2, 3 세대 cephalosporin 계열의 β -lactam 항균제에 모든 균주가 내성 또는 중등도 내성을 나타내었다 (Table 5). 특히 ceftriaxone과 cefotaxime, ceftazidime 등 제 3 세대 항균제에 대해서도 모든 균주의 70 % 이상이 256 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 성장하였다. 그러나 quinolone 계인 nalidixic acid와 aminoglycoside 계열인 tobramycin, gentamycin, amikacin, cephamycin 계열인 cefoxitin, cefotetan에 대해서는 균종별, 균주별 내성추이가 다양하였다 (Table 5).

Cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime등 제 3 세대 항균제에 대한 최소억제농도의 범위는 *E. cloacae* 의 경우 각각 64~512 $\mu\text{g/ml}$, 128~512 $\mu\text{g/ml}$, 64~512 $\mu\text{g/ml}$, *E. coli*의 경우 각각 16~512 $\mu\text{g/ml}$, 32~512 $\mu\text{g/ml}$, 64~512 $\mu\text{g/ml}$, *Klebsiella* 속의 균주는 64~256 $\mu\text{g/ml}$, 64~256 $\mu\text{g/ml}$, 64~512 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. *E. coli*의 경우 β -lactamase 억제제인 ampicillin/sulbactam과, cephamycin인 cefoxitin, cefotetan 2 항균제에 내성인 균주가 각각 5, 10, 5 균주였고, *Klebsiella* 속의 균주들의 27, 8, 3 균주였다. *E. cloacae*의 경우 모든 균주가 ampicillin/sulbactam, cefoxitin, cefotetan 3 항균제에 대하여

내성을 나타내었다.

획득된 ESBL 성상이 plasmid 기원 여부를 확인하기 위해서는 conjugation 시험이 필수적이다. 본 시험결과 *E. cloacae*의 경우 12 균주중 4 균주, *E. coli*의 경우 12 균주중 10 균주, *Klebsiella* 속의 균주들은 29 균주중 14 균주가 피전달 균주인 *E. coli* J 53 Azid^R 균주에 conjugant를 형성하여 이들이 plasmid에서 기원된 것임을 확인하였다. Conjugant들에 대한 항균제 내성전달은 *E. coli* 와 *Klebsiella* 속 균주들의 경우 ampicillin/sulbactam과 cephamycin 인 cefoxitin, cefotetan에 대해서는 내성이 전달되지 않았다. 이는 모균주의 위 약제 내성이 세포외막의 변성에 의한 것으로 추측되었다 (김 등, 1999; 이 등, 1994; Sawai, et al. 1978). 그러나 ampicillin/sulbactam, cefoxitin, cefotetan을 제외한 대부분의 항균제에 대해 모균주와 같은 내성 양상을 나타내었다. *E. cloacae*의 conjugant들의 경우 ampicillin/sulbactam, cefoxitin, cefotetan 내성이 전달되어 AmpC type의 β -lactamase로 추정되었다 (배 등, 1997; 이 등, 2000; Bush, et al. 1995; Jacoby, 1994).

Isoelectric focusing (IEF)와 PCR 방법을 이용하여 모균주와 conjugant의 개략적인 ESBL 유형을 결정하였다. IEF는 전기영동에 의해서 생긴 pH에 따라 단백질이 이동한 등전점 수치 (pI value)를 나타낸 것으로 특정 단백질을 분석하는데 매우 유용하게 사용된다 (Matthew, et al. 1975). SHV 유형은 동일한 pI 수치에 해당되는 아형들이 비교적 적어 SHV 형 β -lactamase 유형분류에 유용하다. 그러나 TEM 형의 경우, 같은 pI값을 갖는 다른 TEM 형의 효소들이 여러개 중복된 경우가 많기 때문에 IEF 수치만으로 ESBL 유형을 정확하게 나눌 수가 없다. 따라서 이들에 대한 정확한 아형을 결정하기

위해서는 유전자 서열의 분석이 필요하다 (배 등, 1997).

CMY-1은 oxyimino cephalosporin와에 cefoxitin에도 내성을 나타내며, β -lactamase 억제제에 의해서 억제되지 않고, 효소의 등전점이 8.0이상으로 유도성 chromosomal β -lactamase와 성상이 비슷하다 (Bauernfeind, et al. 1996; 이 등, 2000). 본 연구에서는 cefoxitin에 내성을 나타내었던 28균주를 대상으로 CMY-1 형의 PCR을 시행한 결과 단지 한 균주만이 CMY-1 생성물을 형성하였고, 등전점은 pI 8.0이었다.

균종별 IEF와 PCR을 이용한 ESBL의 형별을 분류한 결과 *E. cloacae*에서 생성된 ESBL 유형은 TEM형 이었고, *E. coli*의 경우 생성된 ESBL 유형은 TEM, CMY-1, TEM과 SHV 공유형 이었으며, *Klebsiella* 속의 균주는 TEM, SHV, TEM과 SHV 공유형이었다.

또한 형별 분류 결과 등전점은 형성하나 PCR 생성물을 형성하지 않는 경우 (*E. cloacae* 4 균주, *E. coli*의 경우 1균주, *K.pneumoniae subsp. pneumoniae* 1 균주)와 등전점과 PCR 생성물 모두를 형성하지 않는 경우(*E. coli* 2 균주)의 non-TEM non-SHV non-CMY-1형이 분리되었다. 이들은 ceftazidime, ceftriaxon, cefotaxim등 제 3 세대 항균제 내성을 나타내었으며, 이중 디스크 상승시험등을 통해 ESBL로 추정되었고, conjugation에 의해 conjugant로 내성이 전달됨을 미루어 보아 plasmid에 의해 매개되는 새로운 ESBL 유형일 가능성도 배재할 수 없다.

본 실험결과 얻어진 TEM 형 pI 수치는 pI 5.4와 5.9, SHV 형의 경우 pI 7.7, 8.2, CMY-1 형의 경우 pI 8.0이었다. 이들의 염기서열 분석 결과 pI 5.4 의 경우 TEM- 1형, pI 5.9의 경우 TEM- 52 형 이었다. 또한, pI 7.7의 경우 SHV-2a, pI 8.2 의 경우 SHV-12 형의 β

-lactamase인 것으로 확인되었다. 우리나라의 임상 가검물에서 *K. pneumoniae* 중 SHV-2a와 SHV-12가 우점종으로 보고되고 있으며 (Kim, et al. 1998), Pai는 국내의 몇몇 대학병원에서 분리된 ESBL 생성 그람 음성균의 검사 결과 국내에서 가장 흔한 ESBL 유형이 TEM-52, SHV-12 와 SHV-2a라고 보고하였다 (Pai, 1998). 이들의 보고는 본 연구의 결과와도 일치되며, 본 연구는 비록 부산지역의 하천수에서 분리된 균종만 국한적으로 연구된 것이기는 하지만, 이미 ESBL 생성균주가 임상검체 이외의 자연환경에 까지 확산되고 있는 것으로 해석된다. 그 원인은 임상이나 또는 주변 환경등 다양한 경로를 통하여 ESBL 생성능을 획득한 균주가 생활하수나 불철저한 분뇨처리 결과로 하천수까지 유입되지 않았나 생각된다. 자연계에서 ESBL 생성능을 획득한 세균은 인체로의 재 유입의 위험성을 가지고 있기 때문에 차후 자연계내에서 분리되는 ESBL 생성 균종에 대한 현황파악과 분리원에 대한 보다 체계적인 연구가 이루어져야 하며, 이러한 내성의 자연계로의 확산을 막기 위해서는 ESBL 생성 세균의 유입경로의 차단이 필요하다고 생각된다.

V. 요약

본 연구는 임상검체 이외의 부산지역의 하천에서 광범위 베타 락탐항균제분해효소(extended spectrum β -lactamase, ESBL)생성균주의 존재 여부를 확인하고, 존재 할 경우 이들이 생성하는 ESBL의 유형을 조사하기 위함이었다. 부산의 지방하천인 낙동강, 수영강, 동천, 은천천과 광안리 하수종말 처리장의 방류수로부터 분리된 균주를 항균제 감수성, 이중 약제간 상승효과(double disk synergy test), 교차접합 시험을 실시하여 ESBL 생성 장내세균 53균주를 분리하였다. 분리된 균주들은 등전점, PCR, 염기서열 분석 시험을 통하여 그들이 생성하는 ESBL의 유형을 조사하였다. 분리된 균종은 *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* 였다. Double disk synergy test 결과 이들은 시험한 제3세대 항균제(ceftiaxone, cefotaxime, ceftazidime) 가운데 적어도 한가지 이상의 약제에 대해 synergy 양성반응을 나타내었으며, 교차접합 시험결과 *E. cloacae* 4주, *E. coli* 10주, *Klebsiella* spp. 14주가 내성이 전달되었다. 이들이 생성하는 ESBL을 등전점 조사와 PCR 시험, 염기서열 분석 시험을 통해 형별분류를 하였다. 그 결과 *Enterobacter cloacae*의 경우 pI 5.4의 값을 가지는 TEM 형 ESBL을 생성하는 것을 확인할수 있었으며, *E. coli*의 경우 pI 5.4, 5.9의 값을 가지는 TEM 형 ESBL과 pI 8.0의 CMY-1 형 그리고 TEM+SHV 복합형의 ESBL을 생성하였다. *Klebsiella* spp.의 경우 다양한 pI pattern을 나타내었으며, TEM 형, SHV 형, TEM+SHV 형의 ESBL

을 생성하였다. 그리고 모든 균종에서 ESBL은 생성하나 PCR 생성물을 형성하지 않는 non-TEM non-SHV non-CMY-1 형의 ESBL이 생성되었다. 염기서열 분석결과 본 연구에서 얻어진 ESBL 유형은 pI 5.4의 경우 TEM-1 형, pI 5.9의 경우 TEM-52 형, pI 7.7의 경우 SHV-2a 형, pI 8.0의 경우 CMY-1 형, pI 8.2의 경우 SHV-12 형으로 판정된다. 본 연구에서 얻어진 결과들은 국내에서 임상 가검물 이외의 자연계에서 얻어진 최초의 ESBL생성 균주의 균종, 형별이 확인된 최초의 보고이다.

VI. 감사의 글

작고하고 보잘 것 없지만 이 한편의 논문이 완성되기까지 많은 시간이 흘렀습니다. 언제나처럼 한 단계를 마무리하는 이 시점에 많은 아쉬움이 남지만, 칭찬과 질타를 아끼지 않으신 교수님과 주위의 많은 분들께 감사의 마음이 앞섭니다.

먼저 아버이 같은 사랑과 격려로 부족한 제자를 이끌어 주신 지도 교수 이훈구 교수님께 감사드립니다. 학부시절부터 깊은 배려와 격려와 관심을 보여주시고, 부족한 논문을 세심히 검토하여 다듬어 주신 이원재 교수님, 김진상 교수님께 고개 숙여 감사드립니다. 항상 지켜봐 주시고 많은 가르침을 베풀어 주셨던 송영환 교수님, 이명숙 교수님, 김영태 교수님 그리고 최태진 교수님께 감사드립니다.

학부 시절 철 없던 저를 바로잡아 주시고, 학문의 길로 첫걸음을 내 던질수 있도록 인도해 주신 강동률 선배님께 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 졸업을 하신 후에도 물심양면으로 많은 도움을 주셨던 김운태 선배님께 깊이 감사 드립니다. 실험실 생활의 기쁨과 어려움을 함께한 우리식구 홍이 선배, 종호선배, 이재는 일미방 이쁜이가 된 우리 공수들 (인향이, 유정이), 그리고 병미방 준회원들 (쫀이선배, 인영오빠, sk virus)과 명예회원님(동훈선배, 용현선배, 용배선배, 소연이 언니) 그리고 지구 반대편 뉴질랜드에서 영어하고 싸움하고 있을 재성선배께 감사드립니다.

항상 든든한 백이 되어주었던 대학원 울동기 지연, 주연, 대성오빠, 경석선배께도 감사의 말을 전합니다. 학문적인 면으로, 인간적으로 큰 가르침을 주신 일미방 강지희 여사님, 막바지 실험을 함께 해 주시고, 많은 도움을 주셨던 바이러스방 현화언니, 그리고 내 친구 지연이 다시한번 감사드립니다. 그리고 함께 생활했던 3, 4 층 모든 선배님, 후배님들께 감사드립니다. 그리고 내 top 3 of best friend 마님(지현이), Mrs. 성(진영이), 그리고 아기엄마 여주에게도 감사와 기쁨을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 끝없는 사랑으로 보살피 주신 부모님과 내 동생 김연하에게 이 작은 결실을 바칩니다.

VII. Reference

- 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.
- 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정윤섭, 김의중, 조동택. 1997. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β -lactamase의 유형 및 특징. 감염 29; 93-103.
- 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.

이선화, 김미나, 최수진, 정화순. 2000. 임상 검체에서 분리된 *Escherichia coli*의 extended-spectrum β -lactamase 생성. 대한 임상병리학회지 20; 400-409.

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

정윤섭, 이경원, 오까모도 료이찌, 이노우에 마쓰히사. 1997. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae* 와 *Escherichia coli*의 생성. 감염 29; 477-485.

Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, R. Wilhelm, Y. Chong. 1996. Comparative Characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40; 1926-1930.

Bradford, P.A. 1999. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of bla(SHV) genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2960-2963.

- Bradford, P.A., C. Urban, A. Jaiswal, N. Mariano, B.A. Rasmussen, S.J. Projan, J.J. Rahal, and K. Bush. 1995. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 39; 899-905.
- Bush, K. and G. Jacoby. 1997. Nomenclature of TEM β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 39; 1-3.
- Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 39; 1211-1233.
- Bush, K. 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 33; 259-263.
- Ewing, W.H. 1986. The genus *Klebsiella*. In W.H. Ewing, Edwards and Ewings Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, N.Y.
- Grimont, F., P.A.D. Grimont, and C. Richard. 1991. The genus *Klebsiella*, p. 2775-2796. In A. Balows(eds.), The prokaryotes Vol III, 2nd ed. Springer-Verlag, N.Y.

- G.A. **Jacoby**. 1994. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(suppl. 1); 2-11.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, 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.
- J.D.D. Pitout, E.S. Moland, C.C. Sanders, K.S. Thomson, and S.R. Fitzsimmons**. 1997. β -lactamases and detection of β -lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother* 41; 35-39.
- J.D.D. Pitout, K.S. Thomson, N.D. Hanson, A.F. Ehrhardt, P. Coudron, and C. Sanders**. 1998. Plasmid-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother* 42; 596-600.
- Jet, B.B., D.J. Ritchie, R. Reichley, T.C. Bailey, and D.F. Sahn**. 1995. In vitro activities of various β -lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. resistant to oxyimino cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother* 39; 1187-1190.

Kim j, Kwon Y, Pai H, Kim J, Cho DT. 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamase: Prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol.* 36; 1446-1449.

Mabilat, C., and S. Goussard. 1993. PCR detection and identificaion of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In D.H. Persing (ed.), Diagnostic molecular microbiology principles and application. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Matthew, M., A.M. Harris, M.J. Marshall, and G.W. Ross. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *General Microbiol* 88; 169-178.

Meideiros, A.A. 1993. Noscomial outbreaks of multiresistant bacteria; extended spectrum beta-lactamase have arrived in north America. *Annals of Internal medicine* 119; 428-430.

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

- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1994. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing: 5th informational supplement. NCCLS: M100-S5.
- Pai Hyunjoo.** 1998. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases in Korea isolates of *Enterobacteriaceae*. *Yonsei Medical Journal* 39; 514-519.
- Pai, H.J, S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim and Y. Kwon.** 1999. survey of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37; 1758-1763.
- Sambrook, J. E.F. Fritsch, T. Manilatis.** 1989. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. vol I. 1.25-1.28.
- Sawai T. Hirano S., Yamaguchi A.** 1987. Repression of porin synthesis by salicylate in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *serratia marcescens*. *FEMS Microbil Lett* 29; 271-276.
- Sutcliffe, J.G.** 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75; 3737-3741.