대한임상미생물학회지 1999:2;28-39

Extended-Spectrum β-Lactamase 생성 장내세균의 분리율 및 선별검사

김병립* · 정석훈 · 구자영* · 이경원** · 정윤섭** · 정태전 · 황현용 · 김미향

고신대학교 의과대학 임상병리과학교실, 내과학교실*, 연세대학교 의과대학 임상병리과학교실**

Prevalence of Extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and Evaluation of Methods for Detection

Byung Lip Kim*, M.D., Seok Hoon Jeong, M.D., Ja Young Koo*, M.D., Kyungwon Lee, M.D., Yunsop Chong**, Ph.D., Tae Jeon Jeong, M.T., Hyun Yong Hwang, M.D. and Mi Hyang Kim, M.D.**

Department of Internal Medicine* and Clinical Pathology, College of Medicine Kosin University, Pusan, and Department of Clinical Pathology, College of Medicine Yonsei University, Seoul, Korea*

Background : **Increased isolation of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* resistant to third generation cephalosporins and aztreonam has been noted recently. This study was to determine the prevalence of resistance to these drugs and ESBL in *Enterobacteriaceae* and to evaluate the methods for detection.**

Methods: **During the period of October, 1997 and March, 1998, a total of 731 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* were collected from patients of the Kosin Medical Center, Pusan, Korea. Antimicrobial susceptibility test by disk diffusion method and double disk synergy test were performed. MICs of β-lactams were determined by agar dilution method. And ESBL genotypes were determined by polymerase chain reaction.**

Results: **About 10% of *Escherichia coli* isolates and 20% of *Klebsiella pneumoniae* isolates were intermediate or resistant to the third generation cephalosporins or aztreonam. Sensitivities of cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone and cefpodoxime disks for the detection of ESBL- producing strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* by NCCLS standards were 100%, respectively, but that of aztreonam disk was 97%. Positive predictive value of the ceftazidime disk was higher than those of other disks. Twenty strains of *E. coli*, 20 *K. pneumoniae*, 19 *Enterobacter* spp., six *Citrobacter freundii*, and eight *Serratia marcescens* showed positive results in double disk synergy test. The transconjugant strain of *K. pneumoniae* K20482 had blaSHV, and remains of transconjugants of ESBL-producing *K. pneumoniae, Enterobacter* spp. and *S. marcescens* had bla_{TEM}.**

Conclusions: **In this study, many strains of *Enterobacteriaceae* isolated in Korea were resistant to third generation cephalosporins and aztreonam. Some of the strains of *Enterobacter* spp. and *S. marcescens* as well as *E. coli* and *K. pneumoniae* produced ESBL, and majority**

원본 접수 : 1999년 1월 12일 접수번호 : CM99-5
수정본접수 : 1999년 2월 25일
교신저자 : 정 석 훈
(602-702) 부산광역시 서구 암남동 34
고신의료원 임상병리과
전화 : 051-240-6373 Fax : 051-256-4619
*본 논문의 요지는 1998년도 제 35차 추계 대한임상병리학회 학술대회에서 발표하였음.

of these strains had *bla*$_{TEM}$. In the detection of ESBL-producing strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* by NCCLS standards, all of the antimicrobial agent disks tested were useful, but ceftazidime disk was most effective because of its highest positive predictive value.
(Korean J Clin Microbiol 1999;2:28~39)

Key words : ***Enterobacteriaceae, Extended-spectrum β-lactamase, TEM, SHV, Third generation cephalosporins, Aztreonam***

서 론

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)는 penicillin, 협범위 cephalosporin 뿐 아니라 제 3세대 cephalosporin, aztreonam 등 광범위 항균제를 가수분해한다[1]. 이에 미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)[2]는 ESBL 생성 장내세균(*Enterobacteriaceae*)을 모든 penicillin과 cephem 및 aztreonam에 임상적 내성으로 간주할 것을 권고한 바 있다. 더구나 이들 ESBL 생성세균은 aminoglycoside, trimethoprim/sulfamethoxazole 등 다른 계열의 항균제에도 내성인 경우가 많기 때문에, carbapenem을 제외하고는 그 감염증의 치료에 사용할 수 있는 약제가 마땅하지 않은 문제가 있다.

ESBL 생성 장내세균의 분리빈도는 국가 혹은 지역에 따라 다양하지만, 점차 증가하고 있는 것으로 알려졌다[3]. 유럽에서는 중환자실 환자에서 유래된 *Klebsiella* spp.의 20-25%, 미국에서는 임상검체에서 분리된 장내세균 중 9%가 ESBL을 생성하는 것으로 보고되었다[4]. 우리나라에서는 이 등[5]이 E. coli와 *K. pneumoniae*의 cefotaxime에 대한 감수성률이 1986년의 99%와 94%에서 1993년에는 89%와 70%로 각각 감소했다고 하였고, 이 등[6]은 혈액배양에서 분리된 *K. pneumoniae*의 41%가 ESBL을 생성하였다고 하였다. 또한 정 등[7]은 서울의 한 대학병원에서 1995년에 분리된 *K. pneumoniae*의 cefotaxime에 대한 감수성률은 57%이었으나 중환자실 환자에서 분리된 균주의 감수성률은 26%에 불과하였고, cefotaxime에 중간내성 및 내성인 *K. pneumoniae*의 81%가 ESBL을 생성하였다고 보고한 바 있다.

이들 보고는 우리나라의 대형병원에는 ESBL 생성 장내세균이 만연되고 있음을 시사하며, 이는 의료진이 감염의 치료를 경험적인 요법에 의존하여 광범위 항균제를 남용해왔기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 세균의 만연은 그 감염의 치료를 위한 carbapenem 사용의 증대를 유발하여 의료비를 상승시키게 될 뿐 아니라, 이 항균제에도 내성인 세균의 출현을 앞당기고, 궁극적으로 인간이 만든 모든 항균제에 내성인 세균이 등장하여 그 감염을 치료할 수 없는 시대의 도래를 촉발할 것으로 우려된다. 그러나 지금까지 국내의 ESBL 생성 장내세균에 대한 연구 대부분은 집단감염만을 다루거나, ESBL을 흔히 생성하는 것으로 알려진 *K. pneumoniae* 및 *E. coli*만을 대상으로 하고 있어서, 이들만으로는 우리나라에서의 ESBL 생성 장내세균의 만연 현황을 알기에 충분하지 않다.

한편 미생물 검사실에서의 통상적인 ESBL 검출은 쉽지만은 않다. 임상검체에서 분리되는 모든 장내세균을 대상으로 double disk synergy 시험, 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 등을 시행해서 ESBL을 검출하려면 너무 많은 노력과 돈이 소요된다. 즉, ESBL 생성이 의심되는 세균의 선별 기준이 필요하다. 1998년 NCCLS[2]는 디스크 확산법에 의한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *Klebsiella* spp.의 검출 기준을 제안하였다. 이 제안에서는 cefpodoxime, aztreonam, ceftazidime, cefotaxime 및 ceftriaxone 디스크에 의한 억제대가 각각 ≤22mm, ≤27mm, ≤22mm, ≤27mm 및 ≤25mm이면 ESBL 생성세균일 가능성을 고려하라고 하였는데, 이는 종래의 감수성 세균 판정 기준보다도 더 큰 것이다. 이와 같이 강화된 기준을 적용하면 ESBL 검출 감도는 높일 수 있겠지만, 위양성 결과가 증가할 우려가 있으므로, 이 기준에 대한 평가가 필요한 것으로 사료된다. 또한 이 제안에서는 cefpodoxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크의 ESBL 검출 감도가 cefotaxime 혹은 ceftriaxone 디스크보다 높다고 하였다. 그러나 우리나라의 미생물 검사실에서는 장내세균의 제 3세대 cephalosporin 감수성 시험에 cefotaxime 디스크를 흔히 사용하고 있으며, 우리나라의 ESBL 중에는 cefotaxime 가수분해를 잘하는 것이 많다고 알려져 있으므로[8], 이에 대한 연구 역시 필요한 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 부산의 한 대학병원에서 분리된 장내세균 모두의 β-lactam 항균제에 대한 내성율 및 ESBL 생성 현황을 조사함으로서, 우리나라에서의 ESBL 만연 현황 및 *E. coli*나 *K. pneumoniae* 이 외의 장내세균의 ESBL 생성여부를 알아보고자 하였다. 또한 NCCLS 기준에 의한 ESBL 생성 세균의 검출방법을 평가함으로서, 우리나라의 미생물 검사실에서 사용하기 적당한 ESBL 검출방법을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 장내세균의 분리 및 동정

1997년 10월-1998년 3월에 배양 의뢰된 고신의료원 환자의 변을 제외한 모든 검체를 대상으로 하였다. 전통적인 생화학적 방법[9]에 따라서 균종을 동정하였고, 필요한 경우에는 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo., U.S.A.)로 동정을 확인하였다. 동일 환자에서 반복 분리된 세균은 연구 대상에서 제외하였다.

2. 디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 시험

장내세균의 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefoxitin, cefotetan 및 aztreonam(이상 BBL, Cockeysville, Md., U.S.A.)에 대한 감수성을 NCCLS 기준[2]에 따라서 디스크 확산법으로 시험하였다. Double disk synergy 양성인 세균에 대해서는 cefpodoxime(BBL)에 대한 감수성을 추가로 시험하였다. 정도관리를 위하여 대조균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 시험하였다.

3. Double disk synergy 시험

디스크 확산법에서 억제대가 cefotaxime에 27 mm 이하, ceftazidime에 22mm 이하, ceftriaxone에 25mm 이하 또는 aztreonam에 27mm 이하인 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*와 제 3세대 cephalosporin 혹은 aztreonam 중 한가지 이상에 중간내성 또는 내성인 다른 장내세균를 대상으로 하였다. Jarlier 등[10]의 방법에 따라서 시험하였다. 즉, 세균 부유액을 면봉으로 Mueller-Hinton 한천(Difco, Detroit, Mi., U.S.A.)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 ticarcillin-clavulanic acid(20/10 μg; BBL), 그 주위에는 30 μg의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크를 놓되, 중앙과 주변 디스크의 가장자리 간격은 2cm가 되도록 하였다. 접종 배지는 37℃ 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판독하였다. Cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 디스크에 의한 억제대가 ticarcillin-clavulanic acid 디스크 쪽으로 커지거나 없던 억제대가 새로 생기면 양성으로 판정하였다. 염색체성 K1 β-lactamase를 과량생성하는 *K. oxytoca*는 TEM 혹은 SHV형 ESBL을 생성하지 않아도 double disk synergy 양성이므로[11] 연구 대상에서 제외하였다.

4. NCCLS 기준의 ESBL 생성세균 검출능 평가

NCCLS 기준[2]에 따른 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam 디스크의 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 검출 감도와 양성예측도를 계산하였다. 감도는 double disk synergy 양성인 균주의 억제대 크기가 NCCLS의 ESBL 생성세균 검출기준보다 작은 확율, 양성예측도는 억제대 크기가 NCCLS 기준보다 작은 세균이 double disk synergy 양성인 확율을 계산하여서 구하였다.

5. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration) 측정

Double disk synergy 양성인 세균을 대상으로 NCCLS 한천희석법[12]으로 시험하였다. 시험항균제로는 amoxicillin(동화, 서울), amoxicillin-clavulanic acid(일성, 안산), cefoxitin(Merck Sharp & Dohme, West Point, Pa., U.S.A.), cefotaxime(한독, 서울), ceftazidime(한미, 화성), aztreonam (동아, 안산) 및 imipenem(중외, 서울)을 사용하였다. 순배양된 집락을 멸균된 Trypticase soy broth(TSB, Difco)에 풀어서 McFarland No. 0.5로 탁도를 맞춘 후, Steers replicator(Craft Machine, Chester, Pa. U.S.A.)로 약 10^4 colony forming unit을 시험항균제가 각각 0.06-256 μg/mL 농도로 함유된 Mueller-Hinton 한천에 접종하였다. 37℃로 호기성 환경에서 18시간 배양 후 집락의 증식 양상을 관찰하였다. 정도관리를 위하여 참조균주인 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

6. 접합 (conjugation)에 의한 내성전달

Jacoby 및 Han[13]의 방법을 참조하여서 시험하였다. Double disk synergy 양성인 *K. pneumoniae* 20주, *Enterobacter* spp. 19주, *C. freundii* 6주, *S. marcescens* 8주 등 총 53주를 donor, *E. coli* ML 4953을 recipient로 하였다. Double disk synergy 양성인 *E. coli*의 내성전달은 시도하지 않았다. Donor와 recipient를 각각 Brain heart infusion (Difco)에 접종하여서 3시간 진탕배양하였다. Donor 배양액 0.2 mL와 recipient 배양액 2.2 mL를 시험관에 넣어서 37℃로 1시간 배양 후, cefotaxime 3.1 μg/mL와 rifampin 25 μg/mL가 들은 Mueller-Hinton 한천에 접종하였다. 37℃에서 18시간 배양 후 transconjugant를 선택하였다. 내성 전달의 확인을 위하여 transconjugant의 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, aztreonam, cefoxitin 및 cefotetan에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 시험하였고, double disk synergy를 검사하였다.

7. PCR을 이용한 ESBL 유전형 시험

정 등[8]의 방법에 따라 시험하였다. TEM 형 primer로는 sense 5'-AAGCCATACCAAACGA-CGAG-3'과 antisense 5'-ATTGTTGCCGGGAAGCTAGA-3', SHV형 primer로는 sense 5'-TC- TCCCTGTAAGCCACCCTG-3'과 antisense 5'-CCACTGCAGCAGCTGCAGTT-3'을 사용하였다. 양성대조로는 bla_{TEM-1}, bla_{SHV-2} 및 blaSHV-3를 각각 갖고있는 *E. coli*를 사용하였다. 시험세균 및 대조세균을 TSB에 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액 1mL를 취하여서 5분간 13,000g로 원침하였다. 상층액은 버리고, 침사는 증류수 500 μL에 부유시켰다. 이를 10분간 끓인 후, 13,000g로 원침하고, 상청액을 취하여서 DNA 추출액으로 사용하였다. DNA 추출액 5 μL, primer 각 1 μL, deoxynucleotide triphosphates(dNTP) 2.5mM

Table 1. Antimicrobial susceptibilities of *Enterobacteriaceae* isolates to β-lactams and detection of ESBL-producers.

Microorganism (No. isolated)	% susceptibilities to:						Isolates with zone diameter less than ESBL breapoints to disks of*:								No. isolates with double disk synergy positive	No. isolates conjugated
	CTX	CAZ	CRO	AZT	FOX	CTT	CTX (≤27mm)		CAZ (≤22mm)		CRO (≤25mm)		AZT (≤27mm)			
							No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
E. coli (362)	92	93	92	94	89	96	55	15	35	10	41	11	45	12	20	ND
K. pneumoniae (93)	77	80	79	81	91	96	33	36	21	23	25	27	27	29	20	10
K. oxytoca (31)	65	100	65	65	100	100	13	42	9	29	12	39	13	42	ND	ND
Enterobacter spp.(107)	42	45	43	46	1	42									19	3
C. freundii (47)	51	50	51	53	0	50									6	0
S. marcescens (30)	20	70	20	40	3	63									8	1
M. morganii (23)	83	78	83	87	31	74									0	ND
Others (38)*	100	100	100	100	100	100									0	ND

*Recommanded by NCCLS[2]
Abbreviations: CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; AZT, aztreonam; FOX, cefoxitin; CTT, cefotetan; ND, not done.

(8 μL), Taq DNA polymerase 2.5U(0.5 μL), 10X buffer 10 μL 및 증류수 75.5 μL를 혼합하여 premix를 만들었다. 이를 Gene Amp PCR System 9600(Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., U.S.A.)으로 94℃로 1분간 denaturation, 60℃로 1분간 annealing, 72℃로 1분간 extension하는 25 cycle의 중합연쇄반응을 시행하였다. 증폭산물 10 μL를 2% agarose gel(Promega, Madison, Wi., U.S.A.)의 홈에 넣고 40분간 전기영동하여서, 108 bp의 TEM 혹은 593 bp의 SHV band가 있는지를 확인하였다.

8. Plasmid 분석

Double disk synergy 양성 장내세균 및 transconjugant를 대상으로 Birnboin 및 Doly의 방법[14]으로 plasmid를 분리하였다. 즉, 3 mL의 TSB에 시험세균을 접종하여 37℃로 하룻밤 진탕배양 후, 배양액 0.7mL를 12,000 rpm으로 2분간 원침하여 침사를 취하였다. 이를 RNase가 포함된 lysozyme 용액(2 mg/mL lysozyme, 50mM dextrose, 10mM EDTA, 25mM Tris, 1mg/mL RNase) 100 μL와 혼합하여 30분간 반응시킨 후, alkali sodium dodecyl sulfate 용액(0.2N NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate) 200 μL를 첨가하여 5분간 얼음에 냉각시켰다. 3M sodium acetate(pH 4.8) 150 μL를 첨가하여 60분간 얼음에 방치 후, 12,000 rpm으로 원침하여 상층액을 얻고, 이를 ethanol 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후, 증류수에 용해시켰다. 이를 0.7% agarose gel에 전기영동하였다. 분자량의 측정을 위하여서 *E. coli* V517의 plasmid 분석을 함께 시행하였다.

결 과

1. 장내세균의 β-lactam 항균제에 대한 감수성

시험기간 중 임상검체에서 *E. coli* 362주, *K. pneumoniae* 93주, *K. oxytoca* 31주, *Enterobacter* spp. 107주, *Citrobacter freundii* 47주, *Serratia marcescens* 30주, *Morganella morganii* 23주, *Proteus* spp. 28주, *Providentia* spp. 3주 및 *S. typhi* 7주가 분리되었다. *E. coli*의 10% 이하, *K. pneumoniae*의 20% 내외, *Enterobacter* spp. 및 *C. freundii*의 50% 내외가 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 중간내성 혹은 내성이었다. *Proteus* spp., *Providentia* spp. 및 *S. typhi*는 시험항균제 모두에 감수성이었다(Table 1).

2. NCCLS 기준에 따른 ESBL 생성 *E. coli* 및 *Klebsiella* spp.의 검출

항균제 디스크에 따라서 *E. coli*의 10-15%, *K. pneumoniae*의 23-36%, *K. oxytoca*의 29-42%가 ESBL 생성이 의심되는 균주로 분류되었다. 항균제 디스크별로는 cefotaxime 디스크에 의한 ESBL 생성균의 검출율이 가장 높았으며, ceftazidime 디스크가 가장 낮았다(Table 1).

3. Double disk synergy 시험

E. coli 20주(5.5%), *K. pneumoniae* 20주(21.5%), *Enterobacter* spp. 19주(17.8%), *C. freundii* 6주(12.8%) 및 *S. marcescens* 8주(26.7%)는 double disk synergy 양성이었으며, 다른 장내세균 균종 중에는 double disk synergy 양성인 균주는 없었다(Table 1). NCCLS 기준에 의한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 검출 감도는 cefotaxime, ceftazidime 및 ceftriaxone은 100%였으며, aztreonam 디스크는 97%였다. Double disk synergy 양성인 균주 모두의 cefpodoxime 디스크 억제대 크기는

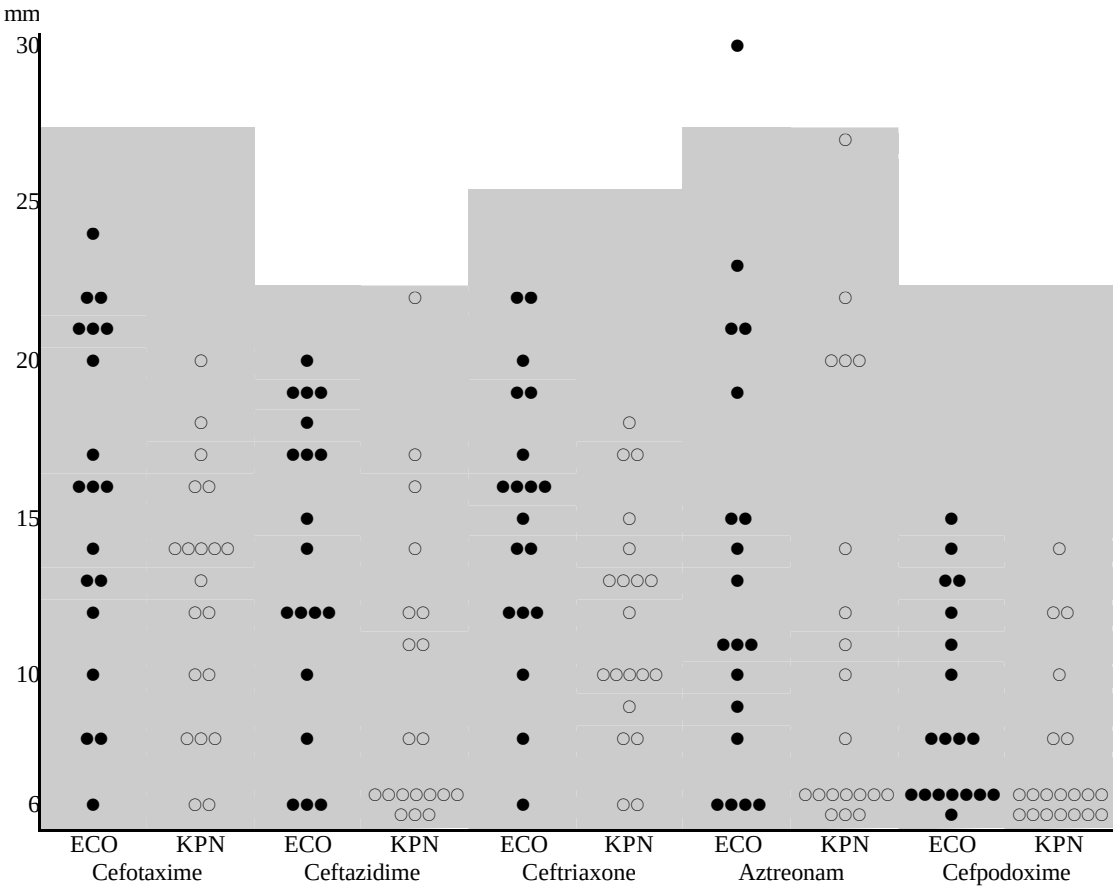

Fig. 1. Distribution of zone diameters in ESBL-producing isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae.* Filled area is the zone diameter smaller than breakpoints recommanded by NCCLS. Blanked area is the zone diameter larger than breakpoints. ECO, *E. coli*; KPN, *K. pneumoniae.*

NCCLS의 ESBL 검출 기준인 22 mm보다 작았다(Fig. 1). 양성예측도는 ceftazidime 디스크가 70%로 가장 높았으며, cefotaxime, ceftriaxone 및 aztreonam 디스크는 각각 43, 58 및 54%였다. ESBL 생성 *K. pneumoniae* 검출 양성예측도는 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone 및 aztreonam 디스크가 각각 95, 61, 80 및 74%로 *E. coli*의 56, 34, 45 및 43%보다 높았다.

4. 최소억제농도

Amoxicillin의 최소억제농도는 double disk synergy 양성인 장내세균 모두에 >256 μg/mL이었다. Amoxicillin/clavulanic acid의 최소억제농도는 amoxicillin에 비하여 감소하는 양상을 보였다. 제 3세대 cephalosporin 제제 및 aztreonam의 최소억제농도는 균주에 따라 다양하였다. *E. coli* 4주와 *K. pneumoniae* 1주는 cefoxitin에 내성이었다. *Enterobacter* spp., *C. freundii* 및 *S. marcescens* 대부분은 cefoxitin에 내성이었다(Table 2).

5. 접합에 의한 내성 전달

Double disk synergy 양성인 *K. pneumoniae* 10주, *Enterobacter* spp. 3주 및 *S. marcescens* 1주의 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 대한 내성이 각각 recipient에게 전달되었다(Table 1). 그 외의 균주는 3회씩 반복해서 시험했지만 내성이 전달되지 않았다. Transconjugant 모두는 cefoxitin 및 cefotetan에 감수성이었고, double disk synergy 양성이었다(Table 3).

6. ESBL 유전형

ESBL 유전형을 규명하기 위하여 transconjugant를 대상으로 PCR을 하였다. *K. pneumoniae* K20482의 transconjugant는 SHV 유전자 만을 갖고 있었으며, 그 외의 *K. pneumoniae*의 transconjugant 8주, *Enterobacter* spp.의 transconjugant 3주 및 *S. marcescens*의 transconjugant 1주 모두는 TEM 유전자 만을 갖고 있었다(Fig. 2, 3).

7. Plasmid 분석

K. pneumoniae, S. marcescens, E. aerogenes 및 *E. cloacae* 임상 분리주와 그 transconjugant의 plasmid를 분

석하여서, 임상 분리주의 plasmid가 transconjugant로 전달되었는지 확인하였다. 임상 분리주 모두에서는 30 MDa 이상의 plasmid가 검출되었으며, transconjugant에서는 임상 분리주와 같은 분자량의 plasmid가 검출되었다.

Table 2. Antimicrobial activities of β-lactams to isolates of ESBL-producing *Enterobacteriaceae.*

Organism (no. of isolates), antimicrobial agent (resistance breakpoint, μg/mL*)	Minimal inhibitory concentration (μg/mL)			Resistance isolates (%)
	Range	MIC50	MIC90	
E. coli (20)				
Amoxicillin (≥32)	>256	>256	>256	100
Amoxicillin/clavulanic acid (≥32)	16-256	32	128	90
Cefoxitin (≥32)	1->256	8	128	20
Cefotetan (≥64)	0.13-256	1	4	5
Ceftazidime (≥32)	2->256	32	256	55
Cefotaxime (≥64)	2->256	16	64	30
Aztreonam (≥32)	0.06->256	32	>256	60
Imipenem (≥16)	0.13-8	0.25	1	0
K. pneumoniae (20)				
Amoxicillin	>256	>256	>256	100
Amoxicillin/clavulanic acid	16-128	32	64	90
Cefoxitin	2-256	4	8	5
Cefotetan	0.13-32	0.5	1	0
Ceftazidime	8->256	128	>256	85
Cefotaxime	8->256	64	256	80
Aztreonam	2->256	256	>256	65
Imipenem	0.13-0.5	0.25	0.25	0
Enterobacter spp. (19)				
Amoxicillin	>256	>256	>256	100
Amoxicillin/clavulanic acid	256->256	256	>256	100
Cefoxitin	128->256	256	>256	100
Cefotetan	4-256	32	256	47
Ceftazidime	64->256	128	>256	100
Cefotaxime	16->256	32	>256	47
Aztreonam	64->256	128	>256	100
Imipenem	0.25-2	1	2	0
S. marcescens (8)				
Amoxicillin	>256	>256	>256	100
Amoxicillin/clavulanic acid	256->256	256	>256	100
Cefoxitin	16-256	128	256	83
Cefotetan	4-64	32	64	38
Ceftazidime	32-256	64	256	100
Cefotaxime	>256	>256	>256	100
Aztreonam	32-256	64	256	100
Imipenem	0.5-2	1	1	0
C. freundii (6)				
Amoxicillin	>256	>256	>256	100
Amoxicillin/clavulanic acid	256->256	256	256	100
Cefoxitin	64->256	>256	>256	100
Cefotetan	1-64	2	64	33
Ceftazidime	64-256	128	256	100
Cefotaxime	8-32	16	32	0
Aztreonam	128-256	128	256	100
Imipenem	0.25-4	0.5	4	0

* Based on the criteria of the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

고 찰

근래 β-lactam 항균제에 내성인 세균에 의한 감염의 증가가 중요한 문제로 대두되었다[15]. 세균이 β-lactam 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은 β-lactamase 생성, penicillin-binding protein의 변성, β-lactam 항균제의 세포막 투과성 저하, 세포 외로의 항균제 유출 등 다양하며[16], 장내세균은 흔히 β

Table 3. Antimicrobial susceptibilities of the strains of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and their transconjugants*

Laboratory No.	Microorganism		Susceptibilities to:					
			CTX	CAZ	CRO	AZT	FOX	CTT
K20482	*K. pneumoniae*	W	I	S	I	S	S	S
		T	I	S	R	S	S	S
K7-4	*K. pneumoniae*	W	R	I	R	S	S	S
		T	R	R	R	I	S	S
K1815	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	I	R	S	S
K3188	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	R	I	S	S
K2627	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	R	I	S	S
K15299	*K. pneumoniae*	W	R	I	R	S	S	S
		T	R	S	R	I	S	S
K2141	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	I	R	I	S	S
K2371	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	I	I	S	S	S
K2869	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	R	I	S	S
K4776	*K. pneumoniae*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	R	I	S	S
K19793	*E. cloacae*	W	R	R	R	I	R	S
		T	R	R	R	I	S	S
KB5896	*E. aerogenes*	W	R	R	R	I	R	R
		T	R	R	R	I	S	S
K3207	*E. aerogenes*	W	R	R	R	R	R	R
		T	R	R	R	I	S	S
K7-1	*S. marcescens*	W	R	R	R	R	S	S
		T	R	R	R	I	S	S

*All of the wild type strains and their transconjugants were double disk synergy positive.
Abbreviations: CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; AZT, aztreonam; FOX, cefoxitin; CTT, cefotetan; W, wild type strains; T, transconjugants; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

-lactamase의 생성에 의하여 β-lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다[17].

Salmonella spp.를 제외한 대부분의 장내세균은 원래부터 염색체성 β-lactamase를 가지고 있었다[4]. 그러나 이들 효소는 penicillin 만을 가수분해할 수 있거나, cephalosporin을 가수분해할 수 있어도 그 생성량이 작기 때문에, 과거에 분리되는 장내세균 대부분은 cephalosporin에 감수성이었다. 그러나 근래 임상에서 분리되는 장내세균 중 많은 세균이 penicillin 뿐 아니라 협범위 cephalosporin에도 내성이 되었는데, 이는 이들 세균이 TEM-1, TEM-2, SHV-1 등의 plasmid성 broad-spectrum β-lactamase를 생성하기 때문이었다[1,18]. 이들 효소는 협범위 cephalosporin, cefamandole, cefoperazone 뿐 아니라 temocillin을 제외한 모든 항그람음성간균 penicillin 제제를 가수분해할 수 있어서, 이 효소를 생성하는 장내세균 감염의 치료에 어려움이 많았다. 이에 이들 내성세균에 의한 감염증의 치료를 위하여 1980년대 초에 broad-spectrum β-lactamase에 안정한 제 3세대 cephalosporin, aztreonam 등 광범위 항균제가 개발되어 임상에서 널리 사용되어 왔다.

그러나 광범위 항균제가 임상에서 사용된 지 얼마 되지 않아서 이들 항균제에 내성인 장내세균이 등장하였는데, 1982년 영국에서는 ceftazidime에 내성인 *K. oxytoca*[19], 1983년 독일에서 cefotaxime에 내성인 *K.*

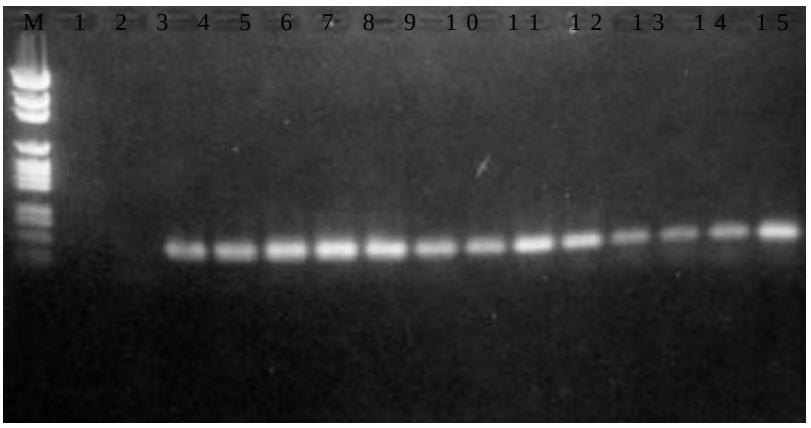

Fig. 2. TEM gene products detected from the transconjugant strains of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* by polymerase chain reaction after 2% agarose gel electrophoresis. Lanes: M, φχ 174 DNA/*HaeIII* marker (Promega); 1, 2, the products of negative controls (SHV-2, SHV-3); 3, a TEM gene product of positive control (TEM-1); 4-11, TEM gene products from the transconjugant strains of ESBL-producing *K. pneumoniae*; 12-14, TEM gene products from the transconjugant strains of Enterobacter spp.; 15, a TEM gene product from a transconjugant strain of *S. marcescens.*

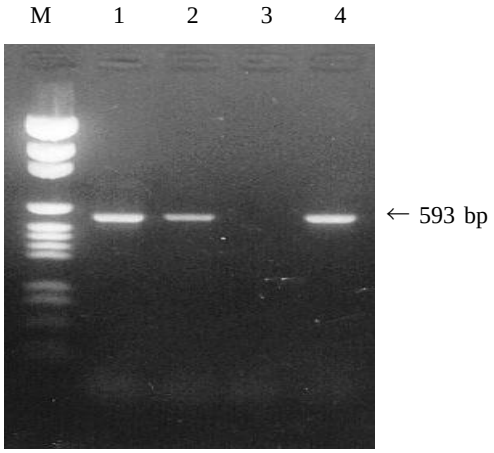

Fig. 3. SHV gene products detected from the transconjugant strains of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* by polymerase chain reaction after 2% agarose gel electrophoresis. Lanes: M, φχ 174 DNA/*HaeIII* marker (Promega); 1, 2, SHV gene products of positive controls (SHV-2, SHV-3); 3, a product from a negative control strain (TEM-1); 4, a SHV gene product from the transconjugant strain of ESBL-producing *K. pneumoniae* (K20482).

pneumoniae 및 *S. marcescens*[20]가 보고되었다. 이 후 세계 여러나라에서 이와 같은 내성 표현형의 장내세균이 보고되었는데, 그 대부분은 *K. pneumoniae* 및 *E. coli*에 의한 것이었다[21-25]. 이들 세균은 plasmid에 의하여 매개되는 새로운 효소의 생성에 의하여 광범위 항균제에 대한 내성을 획득하였는데, 이 효소는 항그람음성간균 penicillin, 협범위 cephalosporin 뿐 아니라 광범위 항균제인 제 3세대 cephalosporin, monobactam 등도 가수분해할 수 있어서 ESBL로 명명되었다[26].

현재까지 알려진 장내세균 생성 ESBL의 유형은 40가지 이상으로 매우 다양하다[27]. 이들 효소는 TEM-1, TEM-2 혹은 SHV-1의 아미노 산 중 1-4개가 유전자의 점 변이(point mutation)에 의하여 다른 아미노 산으로 치환됨으로서 광범위 항균제에 대한 가수분해 활성을 지닌다. 이와 같은 TEM 혹은 SHV형 ESBL은 cephamycin 및 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성이 있다[28]. ESBL은 Bush 등[29]의 기능에 따른 β-lactamase 분류에서는 2be군에, β-lactamase 유전자의 염기배열 상동성을 기준으로 한 분류에서는 class A에 속한다[30]. ESBL 유전형은 국가에 따라 다른데[4], 프랑스에는 TEM-3, 미국에는 TEM-10, TEM-12 및 TEM-26, 그리스에는 SHV-5가 많은 것으로 알려졌으며, 우리나라에서는 SHV-5[31] 및 TEM-52[32]가 흔한 것으로 보고된 바 있다.

우리나라에서 분리되는 장내세균의 광범위 β-lactam 항균제에 대한 내성율 및 ESBL 생성율은 외국에 비해서 높은 편이다. 본 연구에서는 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*의 10% 및 20% 내외가 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 중간내성 혹은 내성이었는데(Table 1), 이들 내성세균 중 많은 수가 ESBL을 생성할 것으로 추측되었다. 한편 *E. coli*의 11% 및 *K. pneumoniae*의 9%가 cefoxitin에 중간내성 또는 내성이었는데, 이들 세균이 cefoxitin에 대한 내성을 획득하는 기전으로는 외막의 porin 소실에 의한 항균제 투과성 저하[33] 및 plasmid에 매개되는 ampC형 β-lactamase 유전자 획득[34,35]이 알려져 있다. 국내의 다른 보고에

서도 cefoxitin 내성 *E. coli* (19%) 및 *K. pneumoniae* (17%)가 드물지 않음이 보고된 바 있으며[36], 권 등[37]은 국내에서 분리되는 cefoxitin 내성 *K. pneumoniae* 중 CMY-1을 생성하는 균주가 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서 분리된 균주의 cefoxitin 내성도 이들 중 하나 혹은 여러 기전의 복합에 의한 것으로 추측되었으며, 이에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

*K. oxytoca*는 모든 균주가 ceftazidime, cefoxitin 및 cefotetan에 감수성이었지만, 35%는 ceftriaxone 및 aztreonam에 각각 내성이었다. 이와 같은 내성 표현형은 염색체 β-lactamase를 과량생성하는 세균에서 나타나는 것으로 알려져 있으므로[11], 이들 세균이 plasmid에 매개되는 TEM 혹은 SHV형 ESBL을 생성하지는 않을 것으로 추측되었다. 한편 *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens* 및 *M. morganii* 중에는 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 내성인 균주가 많았는데, 이들 내성세균 대부분은 염색체성 *amp*C형 β-lactamase를 과량생성하는 탈억제(derepressed) 세균으로 추측되었지만[4], 이들 중 일부는 plasmid에 매개되는 TEM 혹은 SHV형 ESBL을 생성할 가능성도 있는 것으로 생각되었다.

Double disk synergy 시험은 TEM 및 SHV형 ESBL이 clavulanic acid에 의하여 활성이 억제되는 특성을 이용한 것으로, 이 효소를 생성하는 세균의 검출에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 *E. coli* 20주(5.5%), *K. pneumoniae* 20주(21.5%), *Enterobacter* spp. 19주(17.8%), *C. freundii* 6주 (12.8%) 및 *S. marcescens* 8주(26.7%)가 double disk synergy 양성이었다. *E. coli*, *K. pneumoniae* 이외의 ESBL 생성 장내세균의 보고는 국내에서는 매우 드문데, 본 연구에서 분리된 *Enterobacter* spp. 3주 및 *S. marcescens* 1주는 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam 내성이 recipient에 전달되었고, bla_{TEM} 유전자 검출을 위한 PCR에서 양성이었으므로, TEM 형 ESBL을 생성하는 것으로 판단되었다. ESBL 생성 *S. marcescens*의 분리는 국내에서는 본 연구가 처음인 것으로 사료된다. 한편 double disk synergy 양성인 *C. freundii* 6주 역시 ESBL을 생성할 가능성이 있는 것으로 추측되었다. 그러나 이들 균주 모두의 내성이 recipient에 전달되지 않았기 때문에, ESBL 생성을 확인할 수는 없었다.

NCCLS[2]의 ESBL 검출기준을 본 연구의 결과에 적용하면 사용 항균제 디스크에 따라서 *E. coli*의 10-15% 및 *K. pneumoniae*의 23-36%가 ESBL을 생성하는 것으로 의심되었다(Table 1). 이 기준에 의한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 검출 감도는 시험 디스크 모두 매우 높았으므로, NCCLS의 권고와는 달리 국내에서는 이들 중 어떠한 디스크를 사용하여도 ESBL 검출 감도에 문제가 없는 것으로 사료되었다. 한편 양성예측도가 낮은 검출기준을 사용하면 ESBL의 확인을 위한 검사실 업무량이 증가하며, 그 확인 없이 임상에 보고하면 감염증의 치료제 선택에 제한을 주는 결과를 초래할 우려가 있다. 본 연구에서는 ceftazidime 디스크의 양성예측도가 70%로 cefotaxime, ceftriaxone 및 aztreonam 디스크보다 높았으므로, 이 디스크를 사용하는 것이 가장 효율적인 것으로 생각되었다. 또한 cefotaxime 디스크의 검출기준을 25mm로 완화해서 사용하면 검출 감도의 떨어짐 없이 양성예측도를 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구에서는 ESBL 검출 감도가 가장 좋은 것으로 알려진 cefpodoxime 디스크의 양성예측도는 측정하지 않았다. 이에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

Amoxicillin/clavulanic acid의 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*에 대한 최소억제농도는 amoxicillin에 비하여 저하되는 양상을 보였는데, 이는 이들 세균이 생성하는 ESBL의 활성이 clavulanic acid에 의하여 억제되기 때문인 것으로 생각되었다. Ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam의 *E. coli*에 대한 최소억제농도의 범위는 각각 2->256 μg/mL, 2->256 μg/mL 및 0.06->256 μg/mL, *K. pneumoniae*에 대한 범위는 각각 8->256 μg/mL, 8-256 μg/mL 및 2->256 μg/mL로 매우 넓었으며, 이는 이들 세균이 생성하는 ESBL의 유형이 다양하기 때문인 것으로 생각되었다. 한편 이들 ESBL 생성 세균 중 *E. coli* 4주와 *K. pneumoniae* 1주는 cefoxitin에 내성이었는데, 이는 이들 세균의 cefoxitin 내성이 transconjugant로 전달되지 않았으므로, 세포외막 변성에 의한 것으로 추측되었다[38]. Imipenem에는 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 대부분이 감수성이었지만 *E. coli* 1 주는 중간내성이었다. 한편 ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam의 최소억제농도는 ESBL 생성 *Enterobacter* spp., *C. freundii* 및 *S. marcescens*에서 *E. coli*와 *K. pneumoniae*보다 높았는데, 이는 이들 세균이 생성하는 염색체성 β-lactamase가 ampC형으로 cephalosporin 제제에 대한 활성이 있고 탈억제에 의하여 과량생산될 수 있기 때문으로 생각되었다[4]. 한편 이들 세균 대부분은 cefoxitin에 내성이었는데, 이 또한 염색체성 β-lactamase 활성에 기인하는 것으로 사료되었다.

세균의 시험관내 β-lactam 항균제 감수성은 막투과성, β-lactamase에 의한 항균제 가수분해, PBP의 항균제 친화성이 종합된 결과로 나타나게 된다[8]. 따라서 ESBL 생성에 의한 내성 양상을 밝히기 위해서는 transconjugant의 내성 양상 시험이 필요하다. 본 연구에서는 내성의 전달을 디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 시험, double disk synergy 시험 및 plasmid 분석으로 확인하였다. *K. pneumoniae*의 내성을 전달받은 transconjugant의 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 대한 감수성 양상은 임상 분리주와 대부분 비슷하였으나, 그 양상이 다른 경우도 있었다. 그 예로 K2371 임상 분리주는 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 및

aztreonam 모두에 내성이었으나, 그 transconjugant는 cefotaxime에는 내성이었지만, ceftazidime 및 ceftriaxone에는 중간내성이었고, aztreonam에는 감수성이었다. 이와 같은 차이는 막 투과성 등 ESBL 외의 다른 내성기전에 의한 것으로 생각된다. 한편 *Enterobacter* spp. 3주의 cefoxitin 혹은 cefotetan에 대한 내성은 transconjugant로 전달되지 않았다.

본 연구에서 transconjugant 대부분은 TEM형 ESBL 유전자를 지니고 있었으며, *K. pneumoniae* K20482의 transconjugant만이 SHV형 ESBL 유전자를 지니고 있었다. 이와 같은 결과는 국내에서 분리되는 ESBL 생성 장내세균 중에는 SHV형을 생성하는 세균이 많았다는 손 등[39]의 보고와 상반되는 것이었는데, 이러한 차이는 국내에서도 지역에 따라 유행하는 ESBL형이 다를 수 있음을 보여준다.

이상의 결과에서 장내세균 중에는 제 3세대 cephalosporin 제제 및 aztreonam에 내성인 균주가 흔하며, 일반적으로 plasmid 매개 ESBL을 흔히 생성하는 것으로 알려진 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 외에 *Enterobacter* spp.나 *S. marcescens*도 이 효소를 생성하고, 그 유전형은 SHV형보다는 TEM형이 많음을 알 수 있었다. 또한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*의 검출에 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 디스크 모두의 감도가 높으며, 이들 중 ceftazidime 디스크의 양성예측도가 가장 높음을 알 수 있었다.

요 약

배 경 : 제 3세대 cephalosporin 제제와 aztreonam은 그람음성 간균에 의한 감염증 치료에 유용한 항균제이나, 최근 extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 생성에 의하여 이들 항균제에 내성인 장내세균의 분리 비율이 높아졌다는 보고가 있다. 본 연구에서는 고신의료원에서 분리된 장내세균의 β-lactam 항균제에 대한 내성율과 ESBL 생성 현황을 조사하고, NCCLS 기준에 의한 ESBL 생성 세균의 검출 방법을 평가하고자 하였다.

방 법 : 1997년 10월-1998년 3월에 고신의료원 환자에서 분리된 장내세균 731주를 대상으로 디스크 확산법으로 감수성을 시험하였고, double disk synergy를 시험하여서 ESBL 생성 세균을 검출하였으며, NCCLS 기준에 따른 각 항균제 디스크의 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 검출 민감도와 양성 예측도를 구하였다. 또한 ESBL 생성 세균에 대한 β-lactam 항균제의 최소억제농도를 측정하였고, 접합으로 이들 세균의 내성전달을 시험하였다. 임상 분리주와 transconjugant의 plasmid를 분석하였으며, ESBL 유전형을 중합연쇄반응으로 시험하였다.

결 과 : 시험기간 중 분리된 *E. coli*의 10% 이하, *K. pneumoniae*의 20% 내외, *Enterobacter* spp. 및 *C. freundii*의 50% 내외가 제 3세대 cephalosporin 및 aztreonam에 중간내성 혹은 내성이었다. *E. coli* 20주(5.5%), *K. pneumoniae* 20주(21.5%), *Enterobacter* spp. 19주(17.8%), *C. freundii* 6주(12.8%) 및 *S. marcescens* 8주(26.7%)는 double disk synergy 양성이었으며, *K. pneumoniae* 10주, *Enterobacter* spp. 3주 및 *S. marcescens* 1주의 내성이 접합에 의하여 recipient에게로 전달되었다. *K. pneumoniae* K20482의 transconjugant는 SHV형, 그 외의 transconjugant 모두는 TEM형 ESBL 유전자를 갖고 있었다. NCCLS 기준에 의한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae* 검출 감도는 cefotaxime, ceftazidime 및 ceftriaxone 디스크는 100%, aztreonam은 97%였다. Double disk synergy 양성인 균주 모두의 cefpodoxime 디스크 억제대 크기는 NCCLS의 ESBL 검출 기준보다 작았다. 양성예측도는 ceftazidime 디스크가 70%로 가장 높았다.

결 론 : 이상의 결과에서 장내세균 중에는 제 3세대 cephalosporin 제제 및 aztreonam에 내성인 균주가 흔하며, 일반적으로 plasmid 매개 ESBL을 흔히 생성하는 것으로 알려진 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 외에 *Enterobacter* spp.나 *S. marcescens*도 이 효소를 생성하고, 그 유전형은 SHV형보다는 TEM형이 많음을 알 수 있었다. 또한 ESBL 생성 *E. coli* 및 *K. pneumoniae*의 검출에 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 디스크 모두의 감도가 높으며, 이들 중 ceftazidime 디스크의 양성예측도가 가장 높음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB: *TEM- and SHV-derived extended-spectrum β-lactamase: relationship between selection, structure and function. J Antimicrob Chemother 1995;35:7-22.*
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 6th ed. Pennsylvania: NCCLS, 1998:M2- A6.*
3. Thabaut A, Acar J, Allouch P, Arlet G, Berardi- Grassias L, Bergogne-Berezin E. *Frequence et distribution des beta-lactamases chez 1792 souches de Klebsiella pneumoniae isolates en France entre 1985 et 1988. Pathol Biol 1990;38:456-63.*
4. Livermore DM. *β-lactamase in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.*
5. 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오헌. Extended broad-spectrum β-lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae.* 감염 *1994;26:341-8.*
6. 이수연, 이선화, 배직현. *Klebsiella pneumoniae*의 extended-spectrum β-lactamase 검출. 대한임상병리학회지 *1997;17:1076-88.*

7. 정석훈, 서설송, 신희봉, 이경원, 정윤섭, 권오헌 등. Extended-spectrum β-lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 감염의 pulsed-field gel electrophoresis를 이용한 역학적 분석. 감염 *1996;28:405-12.*
8. 정윤섭, 이경원, 오까모도 료이찌, 이노우에 마쓰하사. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β-lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 성상. 감염 *1997;29:477-85.*
9. Gilchrist MJR. *Enterobacteriaceae: opportunistic pathogens and other genera. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington:American Society for Microbiology, 1995: 457-64*
10. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. *Extended broad-spectrum β-lactamase conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae:hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867-78.*
11. Gheorghiu R, Yuan M, Hall LM, Livermore DM. *Bases of variation in resistance to beta-lactams in Klebsiella oxytoca isolates hyperproducing K1 beta- lactamase. J Antimicrob Chemother 1997;40:533-41.*
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS, 1998:M7-A4.*
13. Jacoby GA and Han P. *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J Clin Microbiol 1996;34:908-11.*
14. Birnboin HL and Doly J. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7:1513-23.*
15. Neu HC. *The crisis in antibiotic resistance. Science 1992;257:1064-73.*
16. Quintiliani R, Jr. and Courvalin P. *Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In:Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington:American Society for Microbiology, 1995:1308-26.*
17. 정윤섭 및 이경원. 병원균의 항균제 내성과 기전. 제 1판, 서울: 서흥출판사, *1997:41-78.*
18. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. *Extended broad-spectrum β-lactamase conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae:hospital prevalence and susceptibility patterns. Rec Infect Dis 1988;10:867-78.*
19. Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. *Characterisation of a unique ceftazidime hydrolysing β-lactamase, TEM- E2. J Med Microbiol 1990;32:131-4.*
20. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infect 1983;11:315-7.*
21. Arlet G, Sanson-Le Por MJ, Rouveau M, Fournier G, Mario O, Schlemmer B, et al. *Outbreak of nosocomial infections due to Klebsiella pneumoniae producing SHV-4 β-lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:797-803.*
22. Johnson AP, Weinren MJ, Ayling-Smith B, Du Bois SK, Amyes SGB, George RC. *Outbreak of infection in two U.K. hospitals caused by a strain of Klebsiella pneumoniae resistant to cefotaxime and ceftazidime. J Hosp Infect 1992;20:97-103.*
23. Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, Patel M, Bush K, Singer SB, et al. *Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1991-6.*
24. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. *Spread of Klebsiella pneumoniae producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. Infect 1993;21:18-22.*
25. Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariaini-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, et al. *Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates in a pediatric hospital. J Clin Microbiol 1993;31:179-84.*
26. Jacoby GA and Mederios AA. *More extended- spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1697-704.*
27. Sirot D. *Extended-spectrum plasmid-mediated β-lactamases. J Antimicrob Chemother 1995;36(Suppl. A):19- 34.*
28. Phillipon A, Arlet G, Lagrange PH. *Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13(Suppl. 1):17- 29.*
29. Bush K, Jacoby GA, Mederios AA. *A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.*
30. Jacoby GA. *Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13(Suppl. 1):2-11.*
31. 배현주, 김정민, 권영미, 이경원, 정윤섭, 김의종 등. 한국에서 분리된 *Klebsiella pneumoniae*가 생성하는 extended-spectrum β-lactamase의 유형 및 특징. 감염 *1997;29:93-103*
32. 배현주, 김정민, 권영미, 김종원. *K. pneumoniae*가 생성하는 TEM 형 extended-spectrum β-lactamase의 분석. 감염 *1998;30:126-33.*
33. Martinez-Martinez L, Hernandez-Allees S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. *In vivo selection of porin-deficient mutants of Klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum*

cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:342-48.

34. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. *Extended broad-spectrum β-lactamases in Klebsiella pneumoniae including resistance to cephamycins. Infect 1987;17: 316-21.*
35. Papanicolaou GA, Mederios AA, Jacoby GA. *Novel plasmid-mediated β-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α-methoxy β-lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:2200-9.*
36. **정윤섭 및 이경원**. 1997**년** 1-12**월에 분리된 세균의 항균제 감수성**. **항균제 내성 소식** *1998;6:1-2.*
37. **권영미**, **배현주**, **염곤**, **김정민**. *Klebsiella pneumoniae* **의** cefoxitin **내성에 관한 연구**. **감염** *1998;30:342-50.*
38. Sawai T, Hirano S, Yamaguchi A. *Repression of porin synthesis by salicylate in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. FEMS Microbiol Lett 1987;40:233-46.*
39. **손소희**, **이대준**, **김창인**, **김정민**, **배현주**. *Escherichia coli***와** *Klebsiella pneumoniae***의** TEM **및** SHV type beta-laxtamase **유전자의 분포**. **감염** *1997;29:271-6.*