

## Patterns of Antimicrobial Resistance and Genotyping of Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing Clinical Isolates in Korea

Gyusang Lee and Jong Bae Kim<sup>†</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,  
Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

The emergence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing bacteria is worldwide concern. Until recently, the most frequently identified strains in the Republic of Korea were *E. coli* and *Klebsiella* spp. The incidence of resistance to extended spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics is increasing in Wonju city, Korea. Total 57 strains of ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* species were isolated from Wonju Christian Hospital during a 9 month-period from April to December, 2003. To determine the prevalence and genotypes of the ESBL producing clinical isolates, antibiotic susceptibility and ESBL activity test by VITEK system and double disk synergy (DDS) test, and PCR based genotyping were performed. Fourteen (82%) isolates of 17 ESBL producing *E. coli* were found to have *bla*<sub>TEM</sub> gene and 5 (29%) isolates were found to have *bla*<sub>CTX-M</sub> gene by polymerase chain reaction (PCR). Thirty (75%) isolates of 40 ESBL producing *Klebsiella* species with *bla*<sub>TEM</sub> gene, 38 (95%) isolates with *bla*<sub>SHV</sub> gene, and 7 (20%) isolates with *bla*<sub>CTX-M</sub> type gene were also identified. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and similarity index by dendrogram for genetical similarity to band pattern of each clinical isolates were examined. ESBL producing *E. coli* were grouped into 6 clusters up to 84% of similarity index and *Klebsiella* species were grouped into 12 clusters up to 76% of similarity index. In conclusion, ESBL producing clinical isolates were characterized with the results from antimicrobial resistance pattern and genetical similarity using ERIC PCR.

**Key Words:** Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), Polymerase chain reaction (PCR), Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)

### 서 론

$\beta$ -lactam 제제는 감염증 치료에 가장 흔히 사용되는 항생제이다. 근래 이들 약제가 임상에서 가장 많이 사용되면서 이들의 오, 남용 및 자연내성으로 인하여 약제에 대한 내성균의 증가가 심각한 문제로 대두되었다.  $\beta$ -lactam 제제에 대한 내성기전은 여러 가지가 있는데, 그 중 가장 중요한 것은  $\beta$ -lactamase에 의한 약제에 불활화이다 (Bush et al., 1995).  $\beta$ -lactamase (EC 3.5.2.6)는 amide, amidine, 기타 C-N결합을 가수분해하는 효소로서 특히 환상의 amide를 분해시킨다. 그 결과 penicillin 종류나 cephalosporin 종류 또는 이와 관련이 되는  $\beta$ -lactam 항생

제에서 amide 결합, 즉  $\beta$ -lactam ring을 가수분해함으로써 불활성화 시킨다 (Ambler et al., 1991; Bush et al., 1995).

$\beta$ -lactamase의 초기 분류체계는 매우 혼란스러웠으며, 이러한 분류체계의 혼란을 바로 잡기 위하여 Ambler와 Bush 등은 새로운 분류법을 제안하게 되는데 (Gaussard and Courvalin, 1999; Bush et al., 2001), Ambler는 분자구조에 근거한 효소유전자의 염기서열 상동성에 근거하여  $\beta$ -lactamase를 serine형인 class A, C, D와 zinc형인 class B로 분류하였고, Bush 등은 기능에 초점을 맞추어 기질과 억제제의 특이성에 따라  $\beta$ -lactamase가 어떤 광범위 항균제를 더 분해하는지와 clavulanic acid에 의해서 효소활성이 억제되는지의 여부에 따라 여러 group으로 분류하였다. 이들에 따르면, ESBL의 경우에 광범위  $\beta$ -lactam 계열 항균에 내성을 나타내고, cefoxitin과 같은 cephamycin과 clavulanic acid와 같은  $\beta$ -lactamase 억제제에는 감수성을 나타내므로 Ambler는 class A serine  $\beta$ -lactamase로 분류하였고, Bush 등은 group 2be로 분류하였다.

$\beta$ -lactamase의 종류는 대단히 많으나, 그중 임상적으로

\*논문 접수: 2007년 10월 10일  
수정재접수: 2007년 12월 3일

<sup>†</sup>교신저자: 김종배, (우) 220-710, 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과 임상미생물학실험실  
Tel: +82-33-760-2423, Fax: +82-33-760-2938  
e-mail: kimjb70@yonsei.ac.kr

분리되는 균주에서 가장 흔한 것은 TEM-1, TEM-2, SHV-1 이었다. 그러나 이들 유전자에서 1~4개 정도의 아미노산이 치환되는 점변이 (point mutation)가 일어나 계속 새로운 표현형이 나타나고 있으며, Bush 등은 이들 새로운 효소들에 대해 연속적으로 숫자를 붙여 혼란을 막을 것을 제안하였는데, 현재까지 TEM형은 TEM-120까지, SHV형은 SHV-42까지 보고되고 있다 (Mulvey et al., 2004). 요즘에는 Amble의 분류법에 의한 Class A에 속하는 CTX-M의 분리빈도가 높아지고 있다. CTX-M type은 cefotaxime에 내성을 나타내며 *E. coli*, *Klebsiella* spp. 뿐만 아니라 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium에서도 발견이 되고 있다 (Aroonwadee et al., 2002; Dutour et al., 2002; Spanu et al., 2002; Edelstein et al., 2003; Eckert et al., 2004). 이들  $\beta$ -lactamase는 대부분이 penicillin 제제와 헵탐 위 cephalosporin 제제를 분해할 수 있다. 1980년경에는 이들 효소에 대해서도 안정한 cefotaxime, ceftazidime 등의 제 3세대 cephalosporin과 monobactam 등이 개발되어 감염증 환자에게 유용하게 쓰여 왔다. 그러나 extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)를 생성하는 균주가 보고되기 시작하였고, 최근에는 그 분리빈도가 우리나라를 포함한 세계 여러 나라에서 증가하고 있어서 이와 같은 제 3세대 cephalosporin과 monobactam 등의 임상 치료에 사용하는 것도 어려운 점이 많이 있다 (Tenover et al., 2003; Arpin et al., 2003).

ESBL은 주로 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.에서 흔하게 발견이 되고, 이 유전자는 plasmid에 의한 다른 균종으로 전파될 수 있어서 다른 장내세균 (Enterobacteriaceae)과에서도 보고되어지고 세계 여러 나라에서 임상적으로 큰 문제가 되고 있다 (Bonnet et al., 1999; Baraniak et al., 2002; Pagani et al., 2002; Mankanera et al., 2003). *E. coli*는 장내세균과 (Family Enterobacteriaceae)의 기준 속 표준균주로서 장내 정상 균총을 이룬다. 그러나 일부 균주들은 중요 병원균으로서 여행자 설사를 비롯한 여러 장관계 설사의 원인균이며, 순환계, 폐렴, 뇌막염, 복막염 비임균성 요도염이나 전립선염, 난소염 등의 생식기계 질병을 일으키기도 한다. *Klebsiella pneumoniae*는 면역계가 약해진 노약자나, 어린이, 또는 약물 남용자들에게 기회 감염균으로 작용하여 *Streptococcus pneumoniae* 다음의 높은 빈도로 폐렴을 일으키며 특히, 토양, 물, 식물 등의 환경요인으로부터 감염되어 상처를 통하여 감염되기도 한다. 최근에 *Klebsiella pneumoniae*는 병원의 장기입원 환자들과 수술 후의 환자들에게 의사나 간호사의 손, 의복 등을 통한

원내감염을 일으켜 보건학적으로 중요할 뿐만 아니라 빈번하게 항균제의 다약제 내성을 유발시켜 치료에 매우 어려움을 주고 있는 병원균이다. 본 실험에서 사용된 균주들 역시 환자의 환부의 농이나, 체액, 뇨 등으로부터 분리되어졌기 때문에 2차 전이의 영향을 감안하더라도 분리균주의 대부분이 병원성일 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

현재까지 항생제에 대한 MIC (minimum inhibitory concentration) 및 ESBL 생성 여부를 조사하기 위해서는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)에서 권장하는 방법으로 실험을 시행하여 왔으나 몇 년 전부터 자동화 분석기기인 VITEK system (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France)을 사용하여 시행되어져 왔다. VITEK ESBL test를 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.를 대상으로 시행한 결과 ESBL의 검출방법으로 99%의 특이도와 민감도를 가진다는 보고가 있다 (Sanders et al., 1996; Bradford, 2001; Maurine et al., 2002; Thomas et al., 2003). 본 연구에서는 국내에서 흔하게 분리된  $\beta$ -lactamase 항생제에 내성을 유발하는 ESBL을 생산하는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.를 대상으로 자동화 분석기기인 VITEK system을 이용하여 여러 항생제에 대한 MIC와 ESBL 생성 여부를 조사하였다. 또한 국내에서 대표적으로 분리되는 TEM, SHV, 그리고 CTX-M type의  $\beta$ -lactamase를 검출하기 위하여 유전학적 분석방법인 PCR을 실시하여  $\beta$ -lactamase의 유전자를 확인하였고, ESBL을 생산하는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.의 내성 패턴을 유전적으로 분석하기 위해서 PCR을 기반으로 한 fingerprinting 방법인 ERIC (Enterogenic Repetitive Intergenic Concensus) sequence를 사용하는 ERIC-PCR 기법을 시행하였다. ERIC sequence는 그람 음성세균에 장내세균에 존재하는 palindromic 구조를 가진 126 bp element이며 DNA typing을 위해 가장 일반적으로 사용된다는 보고가 있다 (Hulton et al., 1991; Olive and Bean. 1999) 이에 ERIC PCR 방법을 시행하여 각각 임상분리 균주간의 유전적 유연관계를 판독함으로써 ERIC-PCR을 통하여 ESBL을 생성하는 균주들을 대상으로 항생제에 대한 내성 패턴을 기반으로 하여 분자생물학적 역학조사를 위한 DNA marker로서의 유용성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Isolation of clinical isolates

2003년 4월부터 12월까지 강원도 원주시에 소재하고

**Table 1.** Specimens of ESBL producing clinical isolates

Specimen	Isolated bacteria		Total number of isolates
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	
Sputum	2	21	23
Urine	11	12	23
Suction tip	1	2	3
Sore	1	1	2
Drain	1	0	1
Wound	1	0	1
Arrow tip catheter	0	2	2
Bronchial washing	0	1	1
Pus	0	1	1
Total	17	40	57

있는 연세대학교 원주기독병원 진단검사의학과와 가검물에서 분리된 임상분리주 중 *E. coli*와 *Klebsiella* spp. 각각 17주와 40주를 실험에 사용하였다. 가검물의 내용은 Table 1과 같다. 임상분리 균주는 ampicillin (50 µg/ml)이 포함된 MacConkey agar에 배양하고 균주의 동정은 고전적인 방법과 VITEK (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) GNI card에 접종하여 세균의 생화학적 동정을 시행하였다. 항균제 감수성 검사를 위한 표준균주로는 *E. coli* ATCC 25922와 *K. pneumoniae* ATCC 700603을 사용하였다.

## 2. Susceptibility test

### 1) MIC test

항생제 내성 유형을 파악하기 위한 항생제 감수성 실험은 VITEK 1 system에 의한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration; MIC)를 이용하였다. 실험방법으로는, 실험균주를 MacConkey agar에서 37°C, 18시간 배양한 후 단일 집락을 백금으로 취하여 멸균된 0.45% 생리식염수 1.8 ml에 부유하면서 VITEK colormeter에서 최종 탁도를 0.5 McFarland standard에 맞추고 교반기로 2~3초 동안 교반한 다음 이 부유액을 취하여 VITEK GNS card에 접종하여 VITEK 1 system의 요구하는 조작에 따라 MIC를 측정하였다. MIC에 측정을 위해 amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefoxitin, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, piperacillin/tazobactam, tobramycin, 그리고 trimethoprim/sulfamethoxazole이 사용되었다.

### 2) Double disk synergy (DDS) test

MIC test를 통한 시험균주를 ESBL 생성 여부를 확인하기 위하여 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory

Standard)에서 권장하는 방법에 따라서 DDS test를 실시하였다. 시험균주 부유액을 최종 탁도를 0.5 McFarland barium sulfate turbidity standard에 맞추고 Muller-Hinton agar 배지에 고루 도말하였다. 이 배지 중앙에 amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg, Beckton Dickinson, U.S.A.) disk를 놓고 그 주변에 1.8 cm 간격으로 cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), aztreonam (30 µg) disk를 올려놓아 37°C에서 18시간 배양한 후에 억제대의 형태를 관찰하여 상승효과 (synergism)를 판정하였다.

### 3) Detection of ESBL (Extended Spectrum β-lactamase) activity by VITEK system

Double Disc Synergy (DDS) test를 통하여 확인된 ESBL activity를 자동화 분석기기인 VITEK system을 통하여 검증하였다.

## 3. DNA의 추출 및 정제

세균의 genomic DNA를 얻기 위해서 세균을 brain heart infusion (Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth 4 ml에 접종하여 호기성 상태로 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 Eppendorf tube에 1.5 ml씩 분주하고 12,000 rpm으로 10분간 원심시킨 후 침전된 pellet을 DNA isolation kit (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 추출, 정제하였다. 정제한 DNA의 농도는 A<sub>260</sub>에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

## 4. PCR amplification of β-lactamase genes

### 1) Design of β-lactamase specific primers

VITEK 1 system을 통하여 확인된 ESBL을 생산하는 균주의 형별 확인을 위하여 각각의 β-lactamase에 대한 oligonucleotide를 고안하였다. NCBI (National Center for Biotechnology Information) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해서 β-lactamase의 종류별 sequence를 수집하였다. 수집된 각각의 β-lactamase sequence에 대하여 multiple sequence alignment를 시행하였다. 이 결과를 바탕으로 Primer 3 program을 이용하여 TEM, SHV, 그리고 CTX-M type의 PCR primer를 고안하고 주문 제작 (Bioneer Co., Taejeon, Korea)하여 본 실험에 사용하였다.

### 2) Polymerase chain reaction (PCR) of β-lactamase genes

중합효소연쇄반응에 사용한 TEM, SHV, 그리고 CTX-M type의 primer들은 Table 6에 나타나 있다. 중합효소연쇄반응은 template DNA 2 µl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각

**Table 2.** Antimicrobial resistance for ESBL producing 57 clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp. by VITEK 1

Antibiotics	Number of Strain		
	S	I	R
Amikacin	28	9	10
Ampicillin	0	0	57
Ampicillin/Sulbactam	2	11	44
Aztreonam	16	3	38
Cefazoline	0	3	54
Cefepime	35	9	13
Cefoxitin	39	1	17
Ceftriaxone	12	16	29
Ciprofloxacin	34	1	21
Gentamicin	24	1	31
Imipenem	57	0	0
Piperracillin/Tazobactam	23	6	28
Tobramycin	9	3	45
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	22	0	35

\*Abbreviation. R; Resistant, I; intermediate, S; Susceptible

각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 최종 농도가 200  $\mu$ M이 되도록 넣었다. 그 후 10 $\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 2  $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase 0.5 U을 첨가하고 각각 primer set 20 pmol/ $\mu$ l를 최종 반응 농도가 2 pmol이 되도록 넣은 후 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20  $\mu$ l가 되도록 하여 thermal cycler (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, MA, U.S.A.)를 사용하여 DNA의 증폭을 시도하였다.

TEM 및 SHV type의 검출을 위한 PCR 반응은 총 25 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온한 후 매 cycle 당 94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 denaturation, 57 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing (CTX-M type의 경우 58 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 지속 배양하였다. 반응이 종료된 후 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans-illuminator (Vilber Louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 증폭 산물들을 비교 관찰하였다.

#### 5. DNA fingerprinting analysis by ERIC PCR

ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence) PCR에 사용한 primer는 Lee (Lee et al., 1993) 등이 사용한 것과 같은 ERIC 1R (5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3')과 ERIC 2 (5'- AAG TAA GTG ACT

GGG GTG AGC G- 3') 두 종류의 염기서열을 주문 제작 (Bioneer Co., Taejun, Korea)하여 본 실험에 사용하였다.

PCR 반응은 template DNA 2  $\mu$ l에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 최종 농도가 200  $\mu$ M이 되도록 넣었다. 그 후 10 $\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 2  $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase 0.5 U을 첨가하고 ERIC 1R과 ERIC 2 primer 20 pmol/ $\mu$ l을 최종 반응 농도가 2 pmol이 되도록 넣은 후 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20  $\mu$ l가 되도록 하여 thermal cycler (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, MA, U.S.A.)를 사용하여 DNA를 증폭하였다.

PCR 반응은 총 35 cycle을 시행하였으며, 첫 cycle이 시작하기 전에 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온한 후 매 cycle 당 94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 denaturation, 52 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 지속 배양하였다. 반응이 종료된 후 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans-illuminator (Vilber Louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 증폭 산물들을 비교 관찰하였다. 관찰한 DNA band들은 ID advanced program (Advanced American Biotechnology, Fullerton, CA, U.S.A.)을 사용하여 유전자형 양상을 분석하였으며 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

## 결 과

### 1. Isolation of clinical isolates

가검물에서 분리된 임상분리 균주를 고전적인 방법과 VITEK system에서 요구하는 방법으로 검사를 시행한 결과 모두 *E. coli* (17주)와 *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae* 37주, *K. oxytoca* 3주)로 동정되었다.

### 2. Susceptibility test and detection of ESBL activity

MIC 측정을 위해 VITEK 1을 사용한 결과는 Table 3과 같았다. VITEK 1을 사용한 각각의 항생제에 대한 MIC를 살펴보면, 모든 실험균주들이 ampicillin에 대해 내성을 나타냈으며, imipenem에 감수성을 나타내었다. 나머지 항생제에 대한 내성은 amikacin 12%, ampicillin/sulbactam 77%, aztreonam 66%, cefazolin 95%, cefepime 23%, cefoxitin 30%, ceftriaxone 51%, ciprofloxacin 54%, gentamicin 56%,

piperacillin/tazobactam 47%, tobramycin 80%, trimethoprin/sulfamethoxazole 63%이었다.

ESBL 생성능을 측정하기 위해서 NCCLS에서 권장하는 방법인 DDST와 VITEK GNS card 결과 산출법에 의하여 항생물질 중 모든 penicillin계, cephalosporin계 그리고 aztreonam에 내성을 나타내야만 양성으로 판별하였다. VITEK 1에서의 ESBL 생성능 검출 결과 *E. coli* 1주 (strain No. 21)와 *Klebsiella* spp. 13주 (strain No. 7, 11, 12, 14, 23, 42,

45, 50, 57, 65, 70, 72, 73)의 임상분리 균주에서 음성 결과를 보여, VITEK 2에서 ESBL 생성능에 대한 검사를 다시 실시한 결과 모두 양성인 결과를 나타내었다 (Table 3).

### 3. PCR amplification of $\beta$ -lactamase genes

ESBL의 대표적인 표현형인 TEM, SHV, 그리고 CTX-M형을 검출하기 위해 고안된 PCR primer (Table 5)로 표현형이 이미 알려져 있는 reference strain을 대상으로 PCR을

**Table 3.** MIC results of 14 ESBL negative clinical isolates in VITEK 1 by using VITEK 2

Antibiotics	Strain No.													
	7	11	12	14	21	23	42	45	50	57	65	70	72	73
Amikacin	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	4S	32I	>64R	16S	16S	>64R	>64R	>64R
Amikacin/ Clavulanic acid	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R
Ampicillin	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R
Cefalothin	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R
Cefotaxime	8S	>64R	8S	>64R	>64R	>64R	>64R	8S	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R
Cefoxitin	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>64R	>32R	>64R	>64R	>64R
Ceftazidime	>64R	16I	>64R	>64R	16I	>64R	32R	>64R	>64R	4S	4S	>64R	>64R	>64R
Ciprofloxacin	2I	1S	2I	2I	>4R	1S	2I	2I	1S	>4R	>4R	>4R	>4R	>4R
Gentamicin	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	4S	4S	>16R	>16R	>16R
Imipenem	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S	<0.5S
Nalidixic acid	16S	16S	16S	16S	>32R	16S	16S	16S	16S	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R
Netilmicin	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	16S	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R	>32R
Nitrofurantoin	32S	32S	64I	64I	256R	64I	64I	32S	64I	>512R	>512R	>512R	>512R	>512R
Norfloxacin	32S	2S	2S	2S	>16R	2S	2S	2S	2S	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R
Ofloxacin	4I	4I	4I	4I	>8R	4I	4I	4I	4I	>8R	>8R	>8R	>8R	>8R
Piperacillin/ Tazobactam	64I	8S	64I	16S	8S	>128R	16S	64I	>128R	64I	64I	8S	>128R	>128R
Ticacillin	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R
Ticacillin/ Clavulanic acid	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R	>128R
Tobramycin	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R	>16R
Trimthoprin/ Sulfamethoxazole	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R	>320R
Cefaclor	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ESBL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Abbreviation. R; Resistant, I; intermediate, S; Susceptible

**Table 4.** Nucleotide sequences of oligonucleotides used for amplification in this study

Primer name	Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Expected size(bp) of PCR product
BL TEM-F	AACGCTGGTGAAAAGTAAAAAG	57	576
BL TEM-R	AGTGGTCCTGCAACTTTATC		
BL SHV-F	CATTACCATGAGCGATAACA	57	414
BL SHV-R	CGCAGATAAATCACCACAAT		
BL CTX-M-F	CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG	58	773
BL CTX-M-R	GCTTTCTGCCTTAGGTTGAG		

시행하였다. 그 결과 TEM형을 검출하기 위한 BLTEM-F, BLTEM-R primer를 사용한 PCR에서 예상하였던 576 bp의 산물이 검출되었으며, SHV형을 검출하기 위한 BLSHV-F, BLSHV-R primer를 사용한 PCR에서 예상하였던 것과 같이 414 bp의 산물이 검출되었다. CTX-M형을 위한 BLCTX-M-F, BLCTX-M-R primer를 사용한 PCR에서도 역

**Table 5.** ESBL phenotyping by polymerase chain reaction (PCR)

ESBL phenotype by PCR	Number of ESBL		Total number of isolates
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	
TEM	10	2	12
SHV	0	8	8
CTX-M	1	0	1
TEM + SHV	0	24	24
TEM + CTX-M	4	0	4
SHV + CTX-M	0	2	2
CTX-M	0	4	4
None detected	2	0	2
Total	17	40	57

**Table 6.** Resistance patterns of ESBL producing clinical isolates

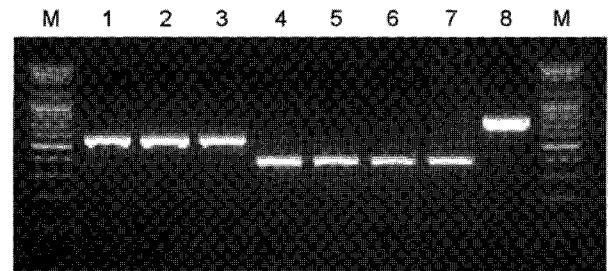
Isolated bacteria	Group	Similarity (%)	Antimicrobial resistance
<i>E. coli</i>	E1	93.4	AM, AMS, CZ, CIP, GM, NN
	E2	91.4	AM, CZ, CIP
	E3	88.0	AM, AZM, FEP, CTR, CIP, GM, SXT
	E4	83.9	AM, CZ
<i>Klebsiella</i> spp.	KL1	92.4	AN, AM, AMS, AZM, CZ, FOX, CTR, CIP
	KL2	96.2	AM, AMS, AZM, CZ, CIP
	KL3	89.8	AM, CZ
	KL4	98.1	AM, AMS, CTR
	KL5	94.1	AM, AZM, CZ, CTR, CIP, GM, TZP, NN, SXT
	KL6	95.5	AM, AMS, CZ, TZP
	KL7	86.5	AM, AMS, AZM, CZ, FOX, NN, SXT
	KL8	94.1	AM, AMS, CZ, FOX, CTR, GM, TZP, NN, SXT
	KL9	95.5	AM, AMS, CZ
	KL10	94.5	AM, AMS
	KL11	92.0	AM, AZM, NN
	KL12	76.8	AM

Abbreviation. AN: amikacin, AM: ampicillin, AMS: ampicillin/sulbactam, AZM: aztreonam, CZ: cefazolin, FEP: cefepime, FOX: ceftiofur, CIP: ciprofloxacin, GM: gentamicin, IMI: imipenem, TZP: piperacillin/tazobactam, NN: tobramycin, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole

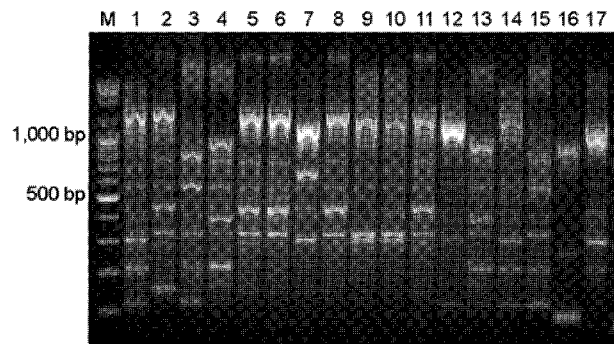
시 예상과 같이 773 bp의 산물이 검출되었다 (Fig. 1). 이 결과를 바탕으로 가검물에서 분리된 임상 검체인 *E. coli* 17개의 검체와 *Klebsiella* spp. 40개의 검체를 대상으로 PCR amplification을 시행한 결과 표준균주에서와 마찬가지로 각각의 PCR 산물이 검출되었다.

#### 4. Classification of ESBL phenotype by PCR

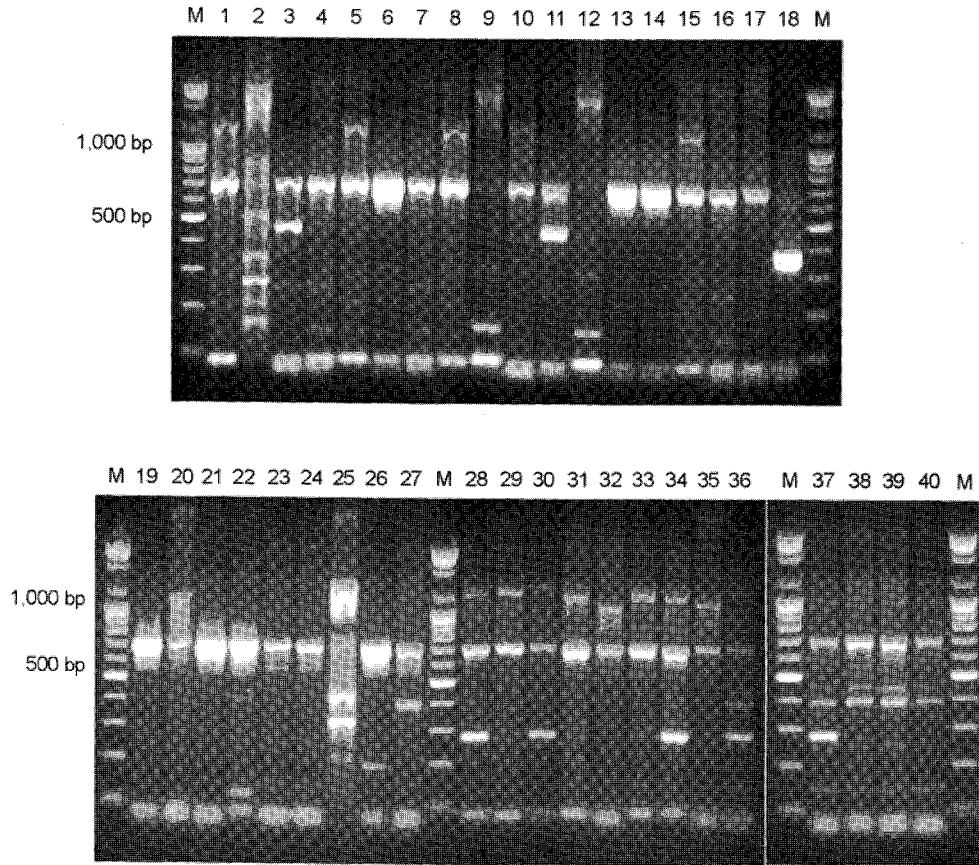
PCR을 통하여 분류된 ESBL 표현형을 분류하여 보면 TEM + SHV + CTX-M형, TEM + SHV형, TEM + CTX-M형, SHV + CTX-M형, TEM형, SHV형, CTX-M형, 그리고 non TEM + SHV + CTX-M형 등 총 8가지로 Table 6에서와 같이 분류가 가능하였다. 각각의 표현형을 살펴보면 TEM + SHV + CTX-M형은 *E. coli* 분리균주에서 검출되지 않았지만, *Klebsiella* spp.의 4주에서 검출이 되었다. TEM + SHV형 역시 *E. coli* 분리균주에서 검출이 되지 않았으며, *Klebsiella* spp.의 24주에서 검출되었다. TEM + CTX-M형



**Fig. 1.** PCR amplification of ESBL producing reference strains. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 1~3, TEM-52, TEM-66, TEM-73 (TEM type: 576 bp); lane 4~7, SHV-2a, SHV-2a, SHV-12, SHV-18 (*K. pneumoniae* ATCC 700603; SHV type: 414 bp); lane 8, CTX-M type (773 bp).



**Fig. 2.** ERIC PCR for ESBL producing *E. coli* isolates using primer combination of ERIC-1R and ERIC 2 primer. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 1, strain No. 3; lane 2, strain No. 4; lane 3, strain No. 5; lane 4, strain No. 6; lane 5, strain No. 8; lane 6, strain No. 13; lane 7, strain No. 16; lane 8, strain No. 22; lane 9, strain No. 47; lane 10, strain No. 52; lane 11, strain No. 56; lane 12, strain No. 58; lane 13, strain No. 59; lane 14, strain No. 60; lane 15, strain No. 68; lane 16, strain No. 79; lane 17, strain No. 21.



**Fig. 3.** ERIC PCR for ESBL producing *Klebsiella* isolates using primer combination of ERIC-1R and ERIC 2 primer. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 1, strain No. 1; lane 2, strain No. 2; lane 3, strain No. 9; lane 4, strain No. 10; lane 5, strain No. 15; lane 6, strain No. 17; lane 7, strain No. 24; lane 8, strain No. 25; lane 9, strain No. 27; lane 10, strain No. 30; lane 11, strain No. 31; lane 12, strain No. 34; lane 13, strain No. 39; lane 14, strain No. 43; lane 15, strain No. 44; lane 16, strain No. 46; lane 17, strain No. 51; lane 18, strain No. 53; lane 19, strain No. 54; lane 20, strain No. 61; lane 21, strain No. 63; lane 22, strain No. 67; lane 23, strain No. 74; lane 24, strain No. 75; lane 25, strain No. 76; lane 26, strain No. 77; lane 27, strain No. 78; lane 28, strain No. 7; lane 29, strain No. 11; lane 30, strain No. 12; lane 31, strain No. 14; lane 32, strain No. 23; lane 33, strain No. 42; lane 34, strain No. 45; lane 35, strain No. 50; lane 36, strain No. 57; lane 37, strain No. 65; lane 38, strain No. 70; lane 39, strain No. 72; lane 40, strain No. 73.

은 *E. coli*의 4주에서만 검출되었으며, SHV + CTX-M형은 *Klebsiella* spp.의 2주에서만 검출이 되었다. TEM형은 *E. coli*의 10주와 *Klebsiella* spp.의 2주에서 검출되었다. SHV형의 경우 *Klebsiella* spp.에서 8주에서만 분리되었으며, CTX-M형은 *E. coli*의 1주에서만 검출되었다. Non TEM + SHV + CTX-M형은 *E. coli*의 2주에서만 검출되었다.

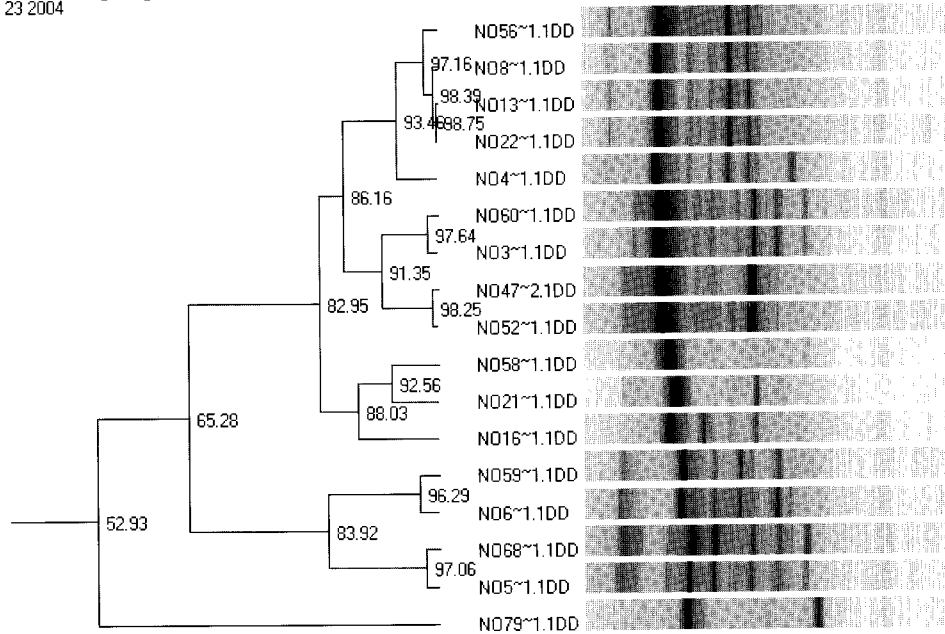
#### 5. DNA fingerprinting analysis by ERIC PCR

ESBL을 생성하는 17주의 *E. coli* isolates와 40주의 *Klebsiella* spp. isolates를 대상으로 ERIC-1R과 ERIC-2 primer를 동시에 사용하여 ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence) PCR을 시행하여 전기영동한 결과 각각 100 bp에서 2 kb 사이에서 10개 이내의 유전자 절편을 나타내었으며, 몇몇의 임상 검체를 제외하고는

각각의 다른 유전자 지문형을 나타내었다 (Fig. 2 and 3).

#### 6. Analysis of Genetic relatedness of ESBL isolates

ERIC PCR을 시행한 결과를 바탕으로 각각 균주간의 유전적 유연관계를 알아보기 위하여 관찰한 DNA band들은 ID advanced program (Advanced American Biotechnology, Fullerton, CA, U.S.A.)을 사용하여 유전자형 양상을 분석하였으며 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다. *E. coli*를 대상으로 dendrogram을 작성하여 임상분리주 각각의 유전자형 유사성을 비교해본 결과 크게 4개의 group을 형성하였고 (Fig. 4), *Klebsiella* spp.를 대상으로 임상분리주 각각의 유전자형 유사성을 비교해본 결과 크게 12개의 group을 형성하였다 (Fig. 5).



## 고 찰

2003년 4월부터 12월까지 강원도 원주시 소재의 원주 기독교병원 진단검사의학과 미생물검사실에서 분리된 장내세균 (Enterobacteriaceae)들 중 ESBL을 생성하는 17주의 *E. coli*와 40주의 *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae* 36주, *K. oxytoca* 4주)를 대상으로 본 연구를 시행하였다. 입원 환자의 sputum, urine 등의 검체에서 주로 분리한 세균주의 동정을 위하여 전통적인 방법과 VITEK (Vitek system, Hazelwood Inc., MO, U.S.A.)의 GNI card에 접종하여 균의 생화학적 동정을 실시하였으며, *E. coli*와 *Klebsiella* spp.로 동정된 균주를 본 실험에 이용하였다. 항생제에 대한 내성 여부를 조사하기 위해 VITEK system과 DDS (double disk synergy) test를 실시하고 MIC 및 ESBL activity를 확인함으로써  $\beta$ -lactamase의 유전자형 및 유전자들의 근연 관계를 규명하였다.

각각 항생제에 대한 최소억제농도 (MIC; Minimum Inhibitory Concentration)를 VITEK system을 통하여 확인한 결과 감수성 정도는 imipenem, amikacin, cefepime 등의 순서로 높게 나타났으며, ampicillin/sulbactam, tobramycin 등에 대하여는 80% 이상의 내성으로 판명되었다.

ESBL activity를 확인하는 방법에는 NCCLS에서 권장하는 NCCLS ESBL confirmatory test, double disk approximation

test, three-dimensional test, E-test ESBL strip, VITEK ESBL test 등의 방법들이 사용되고 있다 (Bradford, 2001). 본 연구에서는 double disk synergy test를 통하여 1차적으로 확인된 ESBL activity를 자동분석기기인 VITEK 1, 2 system을 통하여 확인하였다. VITEK 1에서 총 57주 중 *E. coli* 1주 (strain No. 21)와 *Klebsiella* spp. 13주 (strain No. 7, 11, 12, 14, 23, 42, 45, 50, 57, 65, 70, 72, 73)의 임상분리 균주에서 음성 결과를 나타내었다 (Table 3). 이들 ESBL 음성균주들의 항생제 내성 패턴을 살펴보면, ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefoxitin에 100%의 내성 패턴을 보였으며, aztreonam, ceftriaxone, piperacillin/tazobactam, tobramycin에도 높은 빈도의 내성 패턴을 보였다. 이들 음성균주를 대상으로 VITEK 2에서 ESBL 생성능에 대한 검사를 다시 실시한 결과 VITEK 1에서의 항생제 내성 패턴과 마찬가지로 높은 내성빈도를 나타냈으며, VITEK 2에서 추가적으로 검사된 cefalothin, ticacillin, ticacillin/clavulanic acid에 완전 내성을 보였고, cefotaxime, netilmicin에서도 높은 내성율을 나타내면서 ESBL 생성능 검사에서 양성인 결과를 나타내었다 (Table 2). 자동화된 검사 기기에 의한 ESBL 검출율은 NCCLS 표준방법과 비교 시 cefoxitin에 내성의 균주를 제외하면 일치율이 매우 높았으며 이 경우에만 cefepime을 이용한 이중 디스크 확산법으로 확인하면 대부분의 ESBL을 검출할 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 VITEK system을 사용하여



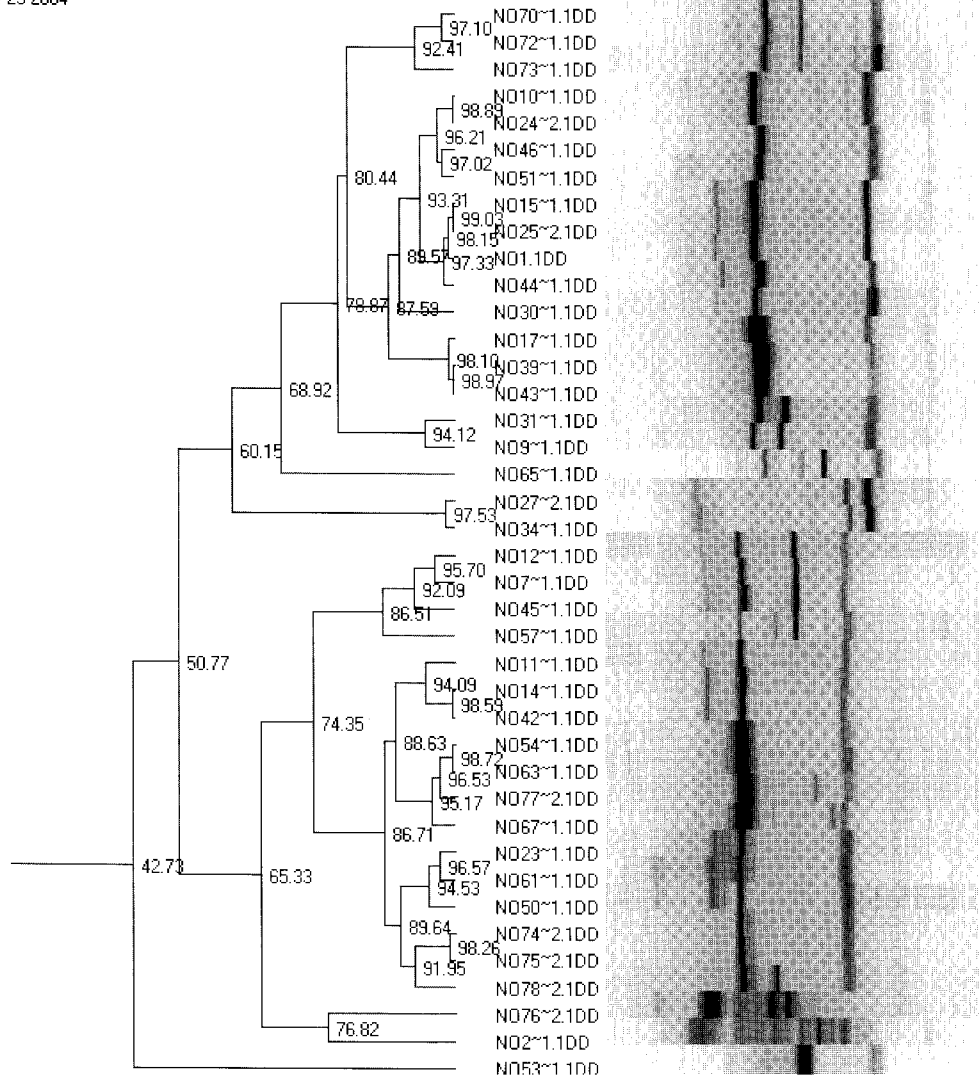


Fig. 5. Dendrogram of the similarity index among isolates of *Klebsiella* spp. by ERIC-PCR analysis.

ESBL의 activity를 확인해본 결과 VITEK 1에서는 cefoxitin에 내성을 보이는 균주들이 VITEK ESBL test에서 음성 결과를 나타내었다. 그러나, VITEK 2에서는 모두 양성을 나타내었다 (Table 3).

본 연구에서는 우리나라에서 대표적으로 검출되는  $\beta$ -lactamase type인 TEM, SHV, CTX-M type을 분자생물학적인 진단방법인 PCR을 통하여 확인하였다. 본 연구에서 새롭게 고안된 각 type별 PCR primer를 사용하여 ESBL의 표현형을 분류하였다. ESBL activity가 확인된 실험균주들을 대상으로 PCR을 통하여 분류된 ESBL 표현형은 Table 6에서와 같이 TEM + SHV + CTX-M, TEM + SHV, TEM + CTX-M, SHV + CTX-M, TEM, SHV, CTX-M, 그리고 non TEM + SHV + CTX-M과 같이 총 8가지로 분류가

가능하였다.

17균주의 *E. coli* 중 14균주 (82%)에서 TEM gene이 확인된 것으로 보아 ESBL을 생성하는 *E. coli*에서는 주로 TEM type의  $\beta$ -lactamase가 널리 분포되어 있었다. 또한 5균주 (29%)에서 CTX-M gene이 확인되었으며 SHV type은 검출되지 않았다. *Klebsiella* spp. 중 총 40균주 중 30균주 (*K. pneumoniae* 27주, *K. oxytoca* 3주) (75%)에서 TEM gene이, 38균주 (95%)에서 SHV gene이 확인되었으며 7균주 (20%)에서 CTX-M gene이 확인되었다. 각각의 type별로 주목할만한 항생제에 대한 최소억제농도를 살펴보면 첫 번째, TEM type에서는 *E. coli*에서 amikacin과 piperacillin/tazobactam에 대해 감수성을 나타내었으며 *Klebsiella* spp.에서는 aztreonam, cefazolin, tobramycin에서 80%

이상의 내성율을 보였다. 두 번째로 SHV type에서는 *Klebsiella* spp.에서 cefazolin, tobramycin에서만 80% 이상의 내성율을 보였다. 마지막으로, CTX-M type에서는 *E. coli*에서 Amikacin과 piperacillin/tazobactam에 감수성을 나타냈으며, *Klebsiella* spp.에서는 ampicillin/sulbactam, cefazolin, ceftriaxone, tobramycin에서 완전내성을 나타냈다.

ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.를 대상으로 임상분리 균주간의 유전자에서의 근연관계를 확인하기 위해서 본 연구에서는 ERIC PCR을 실행하였다. Genotyping 실험을 수행하는데 있어서 가장 신뢰성 있는 결과를 산출할 수 있는 실험법은 DNA sequencing이지만, 이 방법은 경제적인 면이나 소요시간에 비해 효율이 떨어지기 때문에 임상에서의 적용에는 많은 어려움이 따른다. 한편, genomic DNA fingerprinting은 유전자 염기서열 분석법으로 얻을 수 없는 각 균주의 염색체상에 존재하는 미세한 유전자 차이도 구별할 수 있는 최신기법으로 분별능이 뛰어나며 실험의 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 갖고 있다는 보고가 있다 (Olive and Bean, 1999).

본 실험에서는 ERIC PCR을 시행한 후 서로 유사한 유형의 band pattern을 형성하였으며, 60~90%의 근연도를 갖는 다양한 양상이 나타났다. 또한 각각의 근연도를 조사해본 결과 유사도를 기반으로 한 분류가 가능하였다. ESBL을 생산하는 *E. coli*의 경우 유사도 83.9% 이상의 수준에서 크게 4개의 group을 형성하였고, 다시 세부적으로 유사도 92% 이상의 수준에서 유사성을 가지는 group들이 형성되었다. 93.4%의 유사도를 가지는 group 1 (No. 4, 8, 12, 22, 56)은 ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin의 항생제에 대해서 모두 내성을 나타내었다. 91.4%의 유사도를 가지는 group 2 (No. 3, 47, 52, 67)는 ampicillin, cefazolin, ciprofloxacin에 내성을 나타내었다. 88%의 유사도를 가지는 group 3 (No. 16, 21, 58)은 ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprin/sulfamethoxazole에 내성을 나타내었다. 마지막으로 83.9%의 유사도를 보이는 group 4 (No. 5, 6, 59, 68)의 경우 ampicillin, cefazolin에 대한 내성을 보였다. 주목할 만한 사항은 group 3에서 4세대 cephalosporin계인 cefepime과 folate pathway inhibitor인 trimethoprin/sulfamethoxazole에 내성을 가지는 특성을 보였다. 이는 3세대 (ceftriaxone) 및 4세대 cephalosporin에도 내성을 가지는 ESBL가 분포하고 있다는 사실을 증명해 준다.

*Klebsiella* spp.를 대상으로 dendrogram을 작성한 결과 유사도를 갖는 각각의 큰 집단이 형성되어 유사도를 기반으로 한 분류가 가능하였다. *Klebsiella* spp.의 경우 유사도 50% 수준에서 크게 2개의 분류가 가능하였다. 첫 번째 분류의 경우 유사도 88% 이상에서 다시 세부적으로 6개의 group을 형성하였다. 92.4%의 유사도를 보이는 group 1 (No. 70, 72, 73)의 경우 amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefazolin, ceftiofloxacin, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, piperacillin/tazobactam, tobramycin, trimethoprin-sulfamethoxazole의 항생제에 내성을 나타내었다. 96.2%의 유사도를 보이는 group 2 (No. 10, 24, 46, 51)의 경우 ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefazolin, ciprofloxacin의 항생제에 내성을 나타내었다. 89.6%의 유사도를 가지는 group 3 (No. 1, 15, 25, 30, 44)의 경우 ampicillin, cefazolin에 대하여 내성을 나타내었다. 98.1%의 유사도를 가지는 group 4 (No. 17, 39, 43)의 경우 ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftriaxone에 내성을 나타내었다. 94.1%의 group 5 (No. 9, 31)의 경우는 ampicillin, aztreonam, cefazolin, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, piperacillin/tazobactam, tobramycin, trimethoprin-sulfamethoxazole에 내성을 나타내었으며, 95.5%의 유사도를 가지는 group 6 (No. 27, 34)의 경우 ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, piperacillin/tazobactam에 내성을 나타내었다. 이상 6가지 group에서 주목할 만한 사항은 group 1의 균주들이 모두 VITEK 1에서 ESBL 음성의 결과를 나타내었다. 그리고 ciprofloxacin의 내성 패턴의 경우, group 1, 2, 5에서는 내성을 나타내었으나 group 2, 4, 6에서는 모두 감수성의 결과를 나타내었다.

두 번째 group의 경우 유사도 74% 이상에서 다시 세부적으로 6개의 group이 형성되었다. 유사도 86.5%의 group 1 (No. 7, 12, 45, 57)은 ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefazolin, ceftiofloxacin, tobramycin, trimethoprin/sulfamethoxazole에 내성을 나타내었다. 94.09%의 유사도를 가지는 group 2 (No. 11, 14, 42)는 ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, ceftiofloxacin, ceftriaxone, gentamicin, piperacillin/tazobactam, tobramycin, trimethoprin/sulfamethoxazole에서 내성을 나타내었다. 95.51%의 유사도를 가지는 group 3 (No. 54, 63, 67, 77)의 경우 ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin에 내성을 나타냈으며, 94.5%의 유사도를 가지는 group 4 (No. 23, 50, 61)의 경우 ampicillin, ampicillin/sulbactam의 항생제에 내성을 나타내었다. 92%의 유사도를 가지는 group 5 (No. 74, 75, 78)의 경우

ampicillin, aztreonam, tobramycin에 내성을 나타내었다. 마지막으로, 76.8%의 유사도를 가지는 group 6 (No. 2, 76)에서는 ampicillin에서만 내성을 나타내었다. 이상의 결과에서 주목할만한 점은 group 1, 2의 균주들이 VITEK 1에서 모두 ESBL 음성의 결과를 나타내었다.

결론적으로 ESBL을 생산하는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.를 대상으로 VITEK system을 통하여 시행한 항생제에 대한 MIC 결과와 ESBL activity test를 바탕으로 DNA fingerprinting 방법인 ERIC PCR을 시행하여 밴드 패턴의 유사성을 기반으로 근연도를 통한 분류가 가능하였다. 이 분류법은 항생제에 대한 내성 또는 감수성 여부와 ESBL activity를 분류하는 방법으로 치료용으로 사용되고 있는 여러 항생제에 내성을 유발하는 원인체인  $\beta$ -lactamase gene의 분자생물학적 역학조사를 위한 DNA marker로서 적용이 가능한 것으로 인정할 수 있었다. 또한 본 실험의 결과는 강원도 원주지역의 ESBL을 생성하는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.의 항생제에 대한 내성 여부와 ESBL activity를 알아볼 수 있는 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2006-000-10250-0)지원으로 수행되었음.

## REFERENCES

- Ambler RP, Coulson AFW, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Fersman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem J.* 1991. 276: 269-272.
- Aroonwadee C, HM'Zali F, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three Cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46: 630-637.
- Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet J-P, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Community and Private Health Care Centers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47: 3506-3514.
- Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Two Different Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) in One of the First ESBL-Producing *Salmonella* Isolates in Poland. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 1095-1097.
- Bonnet R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Diversity of TEM Mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43: 2671-2677.
- Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 1-14.
- Bradford P. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14: 933-951.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995. 39: 1211-1233.
- Bush K. New  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001. 32: 1085-1089.
- Di Giovanni GD, Watrud LS, Seidler RJ, Widmer F. Fingerprinting of Mixed Bacterial Strains and BIOLOG Gram-Negative (GN) Substrate Communities by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Current Microbiol.* 1999. 38: 217-223.
- Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -Lactamases from *Enterobacteriaceae* Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46: 534-537.
- Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet G. Dissemination of CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 1249-1255.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47: 3724-3732.
- Gaussard S, Courvalin P. Updated sequence information TEM  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43: 367-370.
- Hulton CSJ, Higgs CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* 1991. 5: 825-834.
- Lee SH, Kim JY, Shin SH, An YJ, Choi YW, Jung YC, Jung HI,

- Sohn ES, Jeong SH, Lee KJ. Dissemination of SHV-12 and Characterization of New AmpC-Type Beta-Lactamase Genes among Clinical Isolates of *Enterobacter* Species in Korea. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2477-2482.
- Leung KT, Mackereth R, Tien Y-C, Topp E. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analysis for discriminating *Escherichia coli* form cattle, pig and human sources. *Fems Microbiol Ecology* 2004. 47: 111-119.
- Makanera A, Arlet A, Gautier V, Manai M. Molecular Epidemiology and Characterization of Plasmid-Encoded  $\beta$ -Lactamases Produced by Tunisian Clinical Isolates of *Salmonella enterica* Serotype Mbandaka Resistant to Broad-Spectrum Cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2940-2945.
- Maurine A, Hall LV, Fluit AC, Paauw A, Adrienne T, Box A, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 3703-3711.
- Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 5224-5226.
- Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor AE, Paton S. Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 1204-1214.
- Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism. *J Clin Microbiol.* 1999. 37: 1661-1669.
- Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. Emerging Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 1549-1552.
- Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knapp C, Mulder R. Detection of extended-spectrum- beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 2997-3001.
- Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to  $\beta$ -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46: 196-202.
- Szczuka E, Kaznowski A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 220-228.
- Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, Fridkin SK, Jevitt L, McGowan JE. Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with Isolates Collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 3142-3146.
- Thomas K, Ling W, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 4705-4707.