

MicroScan Neg Combo Panel Type 21에 의한 ESBL 검출의 평가

강윤희, 최수진, 황상현, 조영욱, 김덕희, 김미나, 배직현

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 임상병리과

Evaluation of MicroScan Neg Combo Panel Type 21 to Detect ESBL

Yoon Hee Kang, M.D., Soo Jin Choi, M.D., Sang Hyun Hwang, M.D., Young Wook Cho, M.D.,
Duck-Hee Kim, M.T., Mi-Na Kim, M.D. and Chik Hyun Pai, M.D.

Department of Clinical Pathology, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center,
Seoul, Korea

Background : *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to 3rd generation cephalosporin have been reported with increasing frequency in tertiary-care hospital in Korea. MicroScan Neg Combo Panel Type 21 (Type 21) contains a 1 µg/mL cefpodoxime (POD) in addition to other screen wells containing ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, and aztreonam, which are designed for detecting extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* and *Klebsiella* species. We evaluated the Type 21 panel for its ability to detect ESBL.

Methods : From November to December in 1998, 496 *E. coli* and 326 *K. pneumoniae* strains isolated from clinical specimens were tested with Type 21 panel. The isolates flagged as ESBL producers by the panel were confirmed by the double disk synergy test (DDS). To evaluate the specificity of POD, β-lactamases of 54 *E. coli* and 20 *K. pneumoniae* strains that were flagged by POD only from January to May 1999 were analyzed by isoelectric focusing(IEF).

Results : 75/496 (15%) *E. coli* and 68/326 (21%) *K. pneumoniae* were flagged as ESBL producers by Type 21 panel. Of those, 94 isolates including 38/75 (51%) of *E. coli* and 56/68 (82%) of *K. pneumoniae* were positive for DDS. Among the 94 ESBL producers, all were detected by POD, 84% by cefotaxime, 85% by ceftazidime, 84% by ceftriaxone, and 86% by aztreonam. The 74 strains that were flagged as ESBL producers by POD screen well only were mostly DDS-negative, cefoxitin-resistant and showed β-lactamases with pIs of 5.4 and 7.6 or no band, which could be interpreted as the presence of TEM-1 or SHV-1 type β-lactamases and/or basal AmpC β-lactamases, not ESBL.

Conclusion : MicroScan Neg Combo Panel Type 21 was able to detect a greater number of ESBL producers by inclusion of POD in its screening well. However, the specificity of POD was compromised by flagging a significant number of DDS negative strains. We conclude that the isolates with reduced susceptibility to 3rd generation cephalosporins as well as POD can be reported as ESBL-producers and those resistant to POD only should be confirmed by DDS.

(Korean J Clin Microbiol 1999;2:158-166)

Key word : MicroScan Neg Combo panel Type 21, ESBL, Cefpodoxime, Double disk synergy

원 본 접 수 999년 8월 25일 접수번호 : CM 99
수정본접수 999년 9월 1일
교 신 저 자 김 미 나
서울 송파구 풍납동 388-1
울산의대 서울중앙병원 임상병리과
전화 : 2224-4511 Fax : 478-0884

서 론

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)는 플라스미드 매개성 β-lactamase로서 모든 cephem 및 monobactam 제

재에 대한 내성을 초래하므로, ESBL 균주의 치료에 사용할 수 있는 항균제는 carbapenem계 정도에 불과하여 임상적으로 큰 문제가 되고 있다[1-3]. 1990년대 초 국내에는 cefotaxime에 내성인 *E. coli*, *K. pneumoniae*는 거의 없었으나[5], 점점 빈도가 증가하여 최근 ESBL 생산 *E. coli*는 4.8-7.5%, *K. pneumoniae*는 22.5-22.8%에 이르고 있다[6]. 서울의 한 대학병원은 1986년에 cefotaxime 감수성이 *E. coli*는 99%, *K. pneumoniae*는 94%였는데 비해, 1993년 *E. coli*는 89%로, *K. pneumoniae*는 70%로 감소하였고, 특히 *K. pneumoniae*의 감수성은 1995년에 46%로 급격히 감소하여 ESBL 생산 균주가 빠르게 증가하고 있다고 보고하였다[5,7]. 또한 동일 병원에서 pulsed field gel electrophoresis로 역학적 연구를 한 결과 몇 개의 ESBL 균주가 병원내에 확산되었음을 밝혔다[7]. 1996년 본원에서 혈액배양에서 분리된 *K. pneumoniae*의 ESBL 균주가 40%에 달하는 것으로 추정되는 등[8] 적어도 3차병원과 대학병원에 ESBL 균주가 중요한 내성균으로 등장하였고, 또한 증가추세라고 할 수 있다. ESBL 균주에 의한 병원감염의 유행이 외국 뿐 아니라 국내에서도 보고된 바 있어서[9, 10, 11] 임상미생물검사가 ESBL을 민감하고, 신속하게 검출할 수 있는 신뢰성 있는 검사체계를 갖추는 것이 당면의 과제가 되었다.

그러나 ESBL은 특징적으로 항균제 기질에 대한 특이도가 매우 다양하여 각 항균제에 대한 내성 양상이 일관적이지 않고, 일부 ESBL 균주는 비교적 낮은 MIC를 보여 통상적으로 그람음성균에 적용하는 내성 기준으로는 감수성으로 판독될 오류가 높다[1-4]. 이렇게 ESBL을 검출하기 어려운 점이 ESBL 균주가 병원내 또는 병원간에 전파되는데 중요한 요인이 되었을 것으로 생각되고 있으며, 실제 치료가 실패한 후에야 원인균이 ESBL 균주임이 규명되기도 하였다[4, 10, 12]. 따라서 ESBL을 민감하게 검출하기 위해, ESBL 선별에 이용하는 3세대 cephalosporin 및 aztreonam의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC) 기준을 낮추거나 cefpodoxime과 같은 가장 민감한 기질을 사용하여 선별하는 방법이 사용되고, double disk synergy(DDS) 검사, 3차원 디스크 확산법, Etest, Vitek ESBL test 등의 방법을 통해 β -lactamase inhibitor에 의한 상승작용으로 확인하는 방법 등이 연구되어 왔다[13-20]. 1999년 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)[21]는 선별검사로써 cefpodoxime, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, ceftriaxone의 디스크억제대의 기준을 22, 22, 27, 27, 25 mm로, MIC 기준은 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 로 정하여 이들 중 하나라도 양성이면 ESBL 균주로 의심하라고 하였고, 확인검사로 ceftazidime과 ceftazidime/clavulanic acid, cefotaxime과 cefotaxime/clavulanate의 디스크억제대 또는 MIC를 비교하는 방법을 제시하고 있다. 하지만 이

들 검사를 모든 임상검체에 시행하려면 업무량이나 비용 부담이 적지 않아서 실제 임상미생물 검사실에서 적용하기는 어렵고, 통상 검사로 ESBL을 검출하려면 무엇보다도 자동화된 감수성검사를 이용하는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

최근 MicroScan사에서 ESBL을 검출하기 위해 Neg Combo Panel Type 21(Type 21) (Dade Behring, Sacramento, Calif.)을 개발하였다. 이 panel은 $1 \mu\text{g/mL}$ cefpodoxime well을 새롭게 추가하고, 소프트웨어 버전 22.01을 개발하여 *E. coli*, *K. oxytoca* 또는 *K. pneumoniae*로 동정된 균주는 cefpodoxime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, aztreonam 중 한가지 이상에 대하여 ESBL 기준을 만족시키는 경우 ESBL로 해석하고, 자동적으로 모든 3세대 cephalosporin 및 aztreonam 제제에 대해 내성으로 보고하는 시스템을 가지고 있다. 이에 저자들은 Type 21 panel의 ESBL 검출능력을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1998년 11월부터 12월까지 분리된 *E. coli* 496균주와 *K. pneumoniae* 326균주를 대상으로 Type 21 panel로 항균제 감수성검사를 실시하고, 이 중 ESBL로 선별된 균주는 DDS 검사로 확인하였다. 병원감염과 원외감염에서 ESBL 균주의 분리율을 비교하기 위해 검사대장을 통해 외래와 병실별 *E. coli*, *K. pneumoniae* 분리균주의 분포를 조사하였다. 분리율의 비교는 Chi square 검사로 검정하였다. Cefpodoxime의 특이도를 평가하고자 1999년 1월부터 5월까지 Type 21 panel에서 cefpodoxime에 의해서만 ESBL로 선별되고, 다른 3세대 cephalosporin 및 aztreonam 제제에는 모두 감수성을 보인 *E. coli* 54균주와 *K. pneumoniae* 20균주를 대상으로 β -lactamase 등전점 검사를 실시하였다.

2. MicroScan을 이용한 균동정 및 항균제 감수성 검사

제조자의 지시에 따라 Type 21 panel을 이용하여 MicroScan Walkaway40, Walkaway90(Dade Behring, Sacramento, Calif.)으로 균동정 및 항균제 감수성 검사를 시행하였다. 판독은 소프트웨어 버전 22.01을 사용하였다. Type 21 panel의 특징은 $1 \mu\text{g/mL}$ cefpodoxime well을 포함하고 있어서 ESBL을 민감하게 선별하는 것이 특징이다. *E. coli*나 *Klebsiella spp.*의 경우 cefpodoxime well에서 균이 자라면 "EBL?"로 판독하고, cephalosporin계에 포함되는 모든 항균제는 자동으로 "R*"으로 보고된다. "EBL?"은 "Suspected ESBL"로, "R*"은 "Resistant ESBL"로 해석된다. ESBL 진단의 기준이 되는 다른 항균제인 aztreonam, cefotaxime,

Table 1. ESBL criteria of antimicrobials included in MicroScan Neg Combo Panel Type 21 for screening extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producers.

Antimicrobial agents	ESBL criteria(μ g/mL)
Aztreonam	>8
Cefpodoxime	>1
Cefotaxime	>8
Ceftazidime	>8
Ceftriaxone	>8

ceftazidime, ceftriaxone을 포함한 항균제 회색범위 및 ESBL 판독 기준은 Table 1과 같다.

3. Double disk synergy(DDS) 검사

Mueller-Hinton 배지의 중앙에 McFarland 0.5 탁도의 균액을 바른 후 ticarcillin/clavulanic acid (75/10 μ g) 디스크를 놓고, 디스크 가장자리 사이의 간격이 20-30mm가 되도록 aztreonam (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g) 등의 디스크를 놓았다. 35 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배지를 배양한 후에 위 4가지 디스크 중 한가지 이상에서 ticarcillin/clavulanic acid의 영향으로 항균제의 억제대가 커지거나 디스크 사이에 새로이 억제대가 생긴 경우를 DDS 양성으로 판정하였다[8]. DDS 양성 균주를 ESBL 생산 균주로 해석하였다.

4. β -lactamase의 등전점 검사

혈액한천 배지에서 자란 균을 BHI broth (5mL)에 풀어 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 14,000g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하여 그 침사를 3차 증류수 750 μ L에 부유하였다. 부유물이 담긴 시험관을 얼음에 넣고 초음파 세포분쇄기(Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument Co., Chicago IL, USA)를 이용하여 30

초간 3번 분쇄하였다. 12,000g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 다시 원심분리하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후 검사 실시 전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 등전점 검사는 5% polyacrylamide gel (pH 3-9; PhastGel IEF 3-9, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)의 well에 세포분쇄물 10 μ L를 분주한 후 PhastSystem (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 2000V, 2.5mA, 3.5W에서 30분간 전기영동하여 실시하였다. 전기영동 후 nitrocefin 용액(Sigma, 0.5mg/L in phosphate buffer pH 7.0)으로 적신 nylon membrane을 gel 위에 덮어서 발색되는 밴드를 관찰하였다[22]. β -lactamase 등전점의 표준균주로는 C600 pUD16 (TEM-4, pI 5.9), J53 pMG229 (SHV-2, pI 7.6), J53 pUD18 (SHV-3, pI 7.0), J53 pUD21 (SHV-4, pI 7.8), ClaNal pAFF2 (SHV-5, pI 8.2)를 사용하였다.

결 과

1. MicroScan 감수성 검사

E. coli 496균주 중 75균주(15%)와 *K. pneumoniae* 326균주 중 68균주(21%)가 Type 21 panel에서 ESBL 균주로 선별되었다. 총 143균주 중 140균주가 cefpodoxime에 의해 선별되었으며(98%), cefotaxime에 의해 88균주(61%), ceftazidime에 의해 88균주(62%), ceftriaxone에 의해 98균주(69%), aztreonam에 의해 86균주(60%)가 ESBL로 선별되었다($P < 0.01$)(Table 2).

2. Double disk synergy 검사 결과

ESBL 균주로 선별된 총 143균주에 대한 DDS 검사 결과 *E. coli* 38균주와 *K. pneumoniae* 56균주 등 94균주(66%)에서 양성이었다. Cefpodoxime은 DDS 양성 94균주를 모두 검출하였고, 다른 선별항균제들은 74-84균주를 검출하였다. 하지만 cefpodoxime에 의해 선별된 140균주 중 DDS 양성율은 67%로서 다른 항균제

Table 2. Detection rates of ESBL by five antimicrobials in MicroScan Neg Combo Panel Type 21

Antimicrobials	No.(%) of ESBL detected by each of antimicrobials					
	by Type 21 panel			by DDS		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total
Cefpodoxime	74(99)*	66(97)	140(98)	38(51)**	56(85)	94
Cefotaxime	41(55)	47(69)	88(62)	30(73)	45(98)	75
Ceftazidime	41(55)	47(69)	88(62)	29(71)	47(100)	74
Ceftriaxone	45(60)	53(78)	98(69)	33(73)	51(96)	84
Aztreonam	35(47)	51(75)	86(60)	26(74)	48(94)	74
One of those	75(100)	68(100)	143(100)	38(51)	56(82)	94

*No. detected by each antimicrobial
No. detected by all 5 antimicrobials $\times 100$

** $\frac{\text{No. DDS positive}}{\text{No. ESBL detected by each antimicrobi}}$

Table 3. Double disk synergy test of ESBL producers flagged by cefpodoxime and other antimicrobials in MicroScan Neg Combo Panel Type 21

Susceptibilities to cefpodoxime and other antimicrobials	No.(%) of isolates		
	Total	DDS(+)	DDS(-)
<i>E. coli</i>			
Cefpodoxime > 1µg/mL plus			
ESBL(+) 3rd cepha/ATM*	49	35(71)	14(29)
ESBL(-) 3rd cepha/ATM †	25	3(12)	22(88)
Cefpodoxime ≤ 1µg/mL plus			
ESBL(+) 3rd cepha/ATM		0(0)	1(100)
Subtotal	75	38(51)	37(49)
<i>K. pneumoniae</i>			
Cefpodoxime > 1µg/mL plus			
ESBL(+) 3rd cepha/ATM	57	55(96)	2(4)
ESBL(-) 3rd cepha/ATM	9	1(11)	8(99)
Cefpodoxime ≤ 1µg/mL plus			
ESBL(+) 3rd cepha/ATM	2	0(100)	2(100)
Subtotal	68	56(82)	12(18)
Total	143	94(66)	49(44)

* Compatible MIC with ESBL criteria of MicroScan for more than one of 3rd generation cephalosporins and/or aztreonam

† Lower MIC than ESBL criteria of Microscan for all of 3rd generation cephalosporins and aztreonam

Table 4. Susceptibilities to cefoxitin of ESBL producers detected by Type 21 panel

DDS positivity	Species	Total	No.(%) of isolates			
			Susceptibilities to cefoxitin			
DDS(+)	<i>E. coli</i>	38	22	2	14	
	<i>K. pneumoniae</i>	56	27	1	28	
	Subtotal	94	49	3	42	
DDS(-)	<i>E. coli</i>	37	4	7	26	
					7	
					33	

84-86%에 비해 DDS 양성율이 낮았다(Table 2). *E. coli*는 cefpodoxime 선별 양성인 75균주 중 37균주(49%)가 DDS 음성이었다고, *K. pneumoniae*는 68균주 중 12균주(18%)가 DDS 음성이었다(Table 3). Cefpodoxime 및 cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, aztreonam 중 한가지 이상의 항균제에 의해서 선별된 *E. coli* 49균주와 *K. pneumoniae* 57균주는 각각 35균주(71%)와 55균주(96%)가 DDS 양성이었다. 이에 비해 cefpodoxime에 의해서만 선별된 *E. coli* 25균주와 *K. pneumoniae* 9균주 중 DDS 양성균은 각각 3균주(12%)와 1균주(11%)에 불과하였다(Table 3). DDS 음성인 총 49균주 중 42균주(84%)는 cefoxitin에 대하여 중등도 감수성 또는 내성으로 cefoxitin에 감수성이 저하되어 있었다(Table 4).

3. 외래, 일반병동, 중환자실 별 ESBL 생산균주의 분리율

외래환자로부터 분리된 균주 중 ESBL 생산 *E. coli*, *K. pneumoniae*는 각각 3%, 7%에 불과한데 비해 일반병동 입원환자로부터 분리된 경우 각각 11%($P < 0.001$), 19%($P < 0.05$) 이었고, 중환자실 환자로부터 분리된 균주 중 9%, 22%($P < 0.05$)이었다(Table 5).

4. Cefpodoxime 선별에만 양성인 균주들의 항균제 감수성, DDS, β -lactamase 등전점 검사 결과

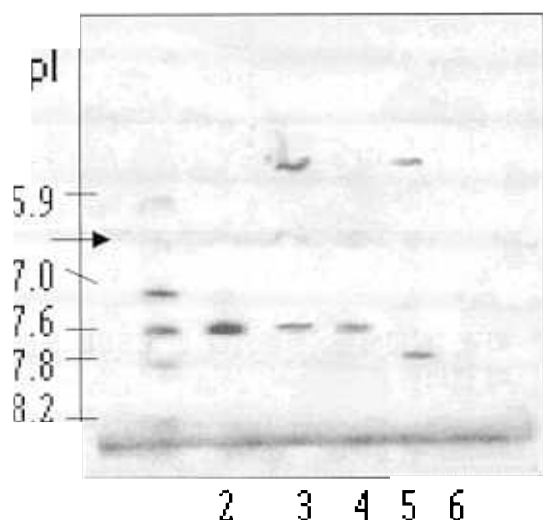
1999년 1월부터 5월까지 *E. coli*는 1,441 균주, *K. pneumoniae*는 804균주가 분리되었다. Type 21 panel 검

Table 5. Prevalence of ESBL-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* isolated from outpatients, general ward inpatients, and intensive care units patients

Services	No. of isolates			
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Total	ESBL producer(%)	Total	ESBL producer(%)
Outpatients clinics	205	7(3)		4(7)
General wards	259	28(11)		37(19)
Intensive care units	32	3(9)		15(22)
Total	496	38(8)		56(17)

Table 6. β -lactamase-isoelectric focusing of the ESBL-suspected isolates flagged by cefpodoxime only in MicroScan Neg Combo Panel Type 21.

DDS positivity	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	pI	No. of isolates	pI	No. of isolates
DDS(+)	5.4	7		1
	5.4/5.9	2		6
	5.4/7.8	2		
	Subtotal	11		7
DDS(-)	5.4	35	5.4	3
	7.6		7.6	4
	Not detected	7	5.4/7.6	1
			Not detected	5
	Subtotal	43	Subtotal	13
	Total	54		20

**Fig. 1.** Isoelectric focusing of culture lysates from three *K. pneumoniae* isolates (lane 2 through 4) and two *E. coli* isolates (lane 5, 6). Lane 1 was loaded with a mixture of culture lysates of reference strains, C600 pUD16(TEM-4, pI 5.9), J53 pUD18(SHV-3, pI 7.0), J53 pMG229(SHV-2, pI 7.6), J53 pUD21(SHV-4, pI 7.8), and ClaNal pAFF2(SHV-5, pI 8.2). Lane 2 through 5 show β -lactamase bands of pI 7.6, 5.4/7.6, 7.6, 5.4/7.8. Lane 6 shows no β -lactamase band. Arrow indicates the application point.

사에서 cefpodoxime 1 μ g/mL에 내성이지만, 그 외 3세대 cephalosporin과 aztreonam 제제에 감수성인 균주는 *E. coli* 54균주와 *K. pneumoniae* 20균주를 포함하여 총 74균주였다. 이 중 54균주(73%)가 cefoxitin에 중등도 감수성 또는 내성이었다. DDS 검사에서 *E. coli* 11균주(20%)와 *K. pneumoniae* 7균주(35%)가 양성으로서 총 18균주(24%)가 ESBL 생산균주임이 확인되었다. 74균주에 대해 β -lactamase 등전점 검사를 실시한 결과 (Fig.1), *E. coli*의 경우 42균주에서 pI 5.4인 β -lactamase 밴드가 단독으로 나타났고, *K. pneumoniae*는 pI 7.6, 5.4가 단독으로 나타나는 경우가 10균주, 4균주로 주종을 이루었다. DDS 양성인 18균주 중 pI 5.4/5.9, pI 5.4/7.8이 2균주씩 관찰되었고, DDS음성인 56균주 중 *E. coli* 7균주와 *K. pneumoniae* 5균주는 β -lactamase 밴드가 나타나지 않았다(Table 6).

고 찰

본 연구의 결과에서 MicroScan의 Type 21 panel은 *E. coli* 496균주 중 75균주(15%)와 *K. pneumoniae* 326균주 중 68균주(20%)를 ESBL 균주로 선별하였다. Type 21 panel의 가장 중요한 특징은 1 μ g/mL cefpodoxime well을 추가한 점이다. Cefpodoxime은 Type 21에서

ESBL로 선별한 균주의 97.5%를 검출하였으며, cefpodoxime 선별에서만 검출된 경우는 24.3%였다. 또한 DDS가 양성인 균주 모두를 검출하여 Type 21 panel은 cefpodoxime을 추가함으로써 ESBL을 더욱 민감하게 검출할 수 있었다. ESBL은 현재 수집종이 있고, 이들의 기질에 대한 특이도가 각기 다르기 때문에 ESBL을 가장 높은 민감도로 검출할 수 있는 항균제에 대한 연구가 있었다. 초기에는 ceftazidime이 가장 민감한 선별 항균제로 보고되었지만[16, 23], 최근 연구에서는 5µg ceftazidime 디스크의 민감도가 88%였고[24], 본 연구에서도 전체 DDS 양성 균주 중 84%만을 검출해서 비슷한 결과를 보였다. 최근에는 cefpodoxime이 MIC 2µg/mL 이상을 기준으로 했을 때 ESBL을 100% 검출하였다는 보고가 있고[25], 10µg을 함유한 디스크 또는 2µg/mL의 cefpodoxime을 함유한 평판배지로 선별검사시에도 97-100%의 민감도를 보여[18, 26] 가장 우수한 선별항균제로 인식되고 있다.

그러나, 본 연구에서 cefpodoxime에 의해 ESBL로 선별된 것 중 *E. coli*는 DDS 음성이 49%, *K. pneumoniae*는 20%에 달했고, cefpodoxime 선별에만 양성이고, 다른 3세대 cephalosporin 항균제들인 cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime 등과 aztreonam 선별에는 음성인 경우 DDS 양성은 각각 12%, 11%에 불과하여 특이도에 문제가 있었다. Thomson 등[27]은 *E. coli*와 *Klebsiella spp.*의 ESBL을 검출하는데 cefpodoxime MIC $\geq 2.0\mu\text{g/mL}$ 을 기준으로 했을 때 민감도가 96%, 특이도가 100%로 매우 우수한 검사라고 했지만, Fuchs 등[28]이 복미의 10개 병원을 대상으로 시행한 연구에서 cefpodoxime의 민감도는 100% 였지만 특이도는 *Klebsiella spp.* 경우 위양성율이 17%, *E. coli*는 82%에 달해서 *E. coli*의 경우 cefpodoxime을 선별검사로 사용할 수 없다고 보고하였다. 이 연구에서는 ESBL 빈도가 *E. coli*는 3% 미만, *Klebsiella spp.*는 5% 미만으로 낮았기 때문에 *E. coli*에서 cefpodoxime의 위양성율이 더욱 심각하게 나타났을 것이다. 다른 MicroScan 제품 중 cefpodoxime 2µg/mL을 추가한 Gram Negative Urine MIC 7(NU7)과 Gram Negative MIC Plus 2(N+2) panel에 대한 연구에서는 3세대 cephalosporin이나 aztreonam에도 감수성이상을 기준으로 하였을 때, ESBL과 고도 AmpC 형 β -lactamase 생성 균주가 모두 검출되지만 두 가지 경우 모두 치료제를 선택하는 데 있어서는 같은 한계를 가지고 있기 때문에 둘을 반드시 감별할 필요는 없다고 주장하였다[25]. 그러나, Willey 등이 Type 21 panel로 연구한 바에 따르면 ESBL 균주로 선별된 *E. coli*의 54%, *Klebsiella spp.*의 7%가 3세대 cephalosporin에 대한 MIC가 모두 감수성으로서, 이는 *E. coli*가 생산하는 기저수준의 AmpC β -lactamase에 의해 cefpodoxime이 비특이적으로 분해되는 것이 주원인이기 때문에 이 경우 3세대 cephalosporin과 aztreonam

에 감수성인 것으로 보고하여야 한다고 주장하였다[29]. 따라서 Type 21 panel을 사용할 때 다른 선별 항균제에 대한 ESBL 기준을 만족하지 않으면서 cefpodoxime에만 양성인 경우, carbapenem계 항균제의 과잉사용을 줄이기 위해 별도의 확인검사가 필요하다고 사료된다.

Type 21 panel에서는 cephalosporin제와 aztreonam의 희석배수가 4-32µg/mL 정도로, 실제 MIC가 아니기 때문에 Type 21 panel의 감수성 결과로 β -lactamase의 성상을 구별하기는 어렵다. 하지만, DDS 음성인 균주의 84%가 cefoxitin에 감수성이 저하되어 AmpC형 β -lactamase가 있을 것으로 추정된다. Cefpodoxime 뿐 아니라 3세대 cephalosporin이나 aztreonam에도 감수성이 저하된 균주 중 DDS 음성인 16균주는 모두 cefoxitin에 중등도 감수성 또는 내성으로서 과다생산되는 AmpC형 β -lactamase에 의한 내성일 가능성이 높고, cefpodoxime 선별에만 양성이면서 DDS 음성인 31균주 중 cefoxitin에 감수성이 아닌 24 균주 또한 기저 수준의 AmpC형 β -lactamase에 의해 cefpodoxime이 분해되었을 것으로 사료된다. Willey 등[29]은 cefpodoxime에만 내성이고, 3세대 cephalosporin이나 aztreonam에는 감수성인 균주들 모두 염색체성 AmpC β -lactamase 생성 균주로 설명하였으나, 본 연구에서는 7균주가 cefoxitin에도 감수성으로서 DDS가 위음성이었거나, TEM, SHV 계열이 아닌 ESBL에 의해 cefpodoxime이 분해되었을 가능성이 있지만 판단하기 어렵다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 Type 21에서 ESBL균주로 선별된 경우 중 3세대 cephalosporin이나 aztreonam에도 감수성이면서 cefpodoxime으로만 선별된 균주를 모아서 β -lactamase 등전점 검사를 실시하였다.

이번 연구에서는 1999년 1월부터 5월까지 분리된 총 2,245균주의 *E. coli*와 *K. pneumoniae* 중 74균주(3%)가 Type 21 panel에서 cefpodoxime 선별로서만 ESBL이 의심되었다. 이들을 대상으로 β -lactamase 등전점 검사를 실시한 결과 β -lactamase의 대부분이 pI 5.4와 7.6 단일밴드였고, DDS 양성 *E. coli* 균주 중 2균주씩이 pI 5.4/5.9, 5.4/7.8인 β -lactamase를 나타냈다. 배 등[6]이 한국에서 분리되는 ESBL 균주는 *K. pneumoniae*의 경우 SHV-12, SHV-2a가 많고, *E. coli* 경우 TEM-52 또는 TEM-1/TEM-52가 주종을 이룬다고 보고를 고려할 때 DDS 양성 균주에서 나타나는 pI 5.9, pI 7.8, pI 7.6의 밴드는 각각 TEM-52, SHV-4, SHV-2a로 추정되었다. pI 5.4, 7.6은 각각 TEM-1, SHV-1에 해당하는 pI값으로서, *K. pneumoniae*는 염색체성 SHV-1을, *E. coli*는 플라스미드 매개성 TEM-1을 가지고 있는 경우가 많기 때문에[30, 31] DDS 음성인 경우 이들이 ESBL이기 보다는 cefpodoxime이 위양성일 가능성이 높다. 특히 pI 5.4의 TEM 계열 ESBL은 외국에서는 보고되었으나[3] 아직 국내에서는 보고된 적이 없어서[6, 32, 33], DDS 양성인 경우에도 이들 모두 ESBL이기 보다는 cefpodoxime

과 DDS 둘 다 위양성일 가능성도 있다. 이 문제는 향후 정식 MIC 검사와 플라스미드의 염기서열분석이 이루어져야 정확히 판단할 수 있을 것이다. 74균주 중 54균주(73%)는 cefoxitin에 중등도 감수성 또는 내성으로 기저수준의 AmpC형 β -lactamase를 가지고 있는 것으로 판단되었다. 하지만 AmpC에 해당하는 pI의 β -lactamase 밴드가 나타나지 않았던 것은 기저수준의 AmpC형 β -lactamase가 매우 소량으로서[22] 본 연구의 등전점 실험조건에서 검출하지 못한 것으로 사료된다.

DDS 결과에 따라 판단하면 본원에서 분리된 균주 중 최소한 *E. coli* 중 8%, *K. pneumoniae* 중 17%가 ESBL로서 *K. pneumoniae*에서의 ESBL 빈도가 높았고, 외래환자에서 분리된 균주 중 ESBL 생산 *E. coli*, *K. pneumoniae* 균주는 각각 3%, 7%에 불과한데 비해 일반병동 입원환자에서 분리된 경우 각각 11%, 19%였고, 중환자실환자에서 분리된 균주는 8%, 22%로서 ESBL 균주는 입원한 환자, 중환자실 환자에서 높은 빈도로 발생하여 주로 병원감염균주임을 확인할 수 있었다. 이는 김 등[34]이 1993년 본원에서 cefotaxime에 중등도 또는 내성인 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 병원 감염 균주의 33%, 36%인 반면, 원외감염에서 분리된 균주는 1%, 8%였다고 보고하였고, 정 등[7]이 1994-5년에 *K. pneumoniae*의 감수성검사결과 외래환자의 18%, 일반병동 입원환자의 42%, 중환자실 환자는 82%가 cefotaxime에 중등도 감수성 내지 내성이라는 보고에서도 확인할 수 있는데, 같은 지역내에서도 병원에 따라 ESBL 균주의 확산정도가 상당히 다른 것으로 사료된다. ESBL 균주의 빈도가 낮은 병원일수록 cefpodoxime의 위양성을 줄이기 위해 ESBL을 확인하는 검사가 필요할 것이다.

임상미생물검사실에서 통상적으로 ESBL을 검사하려면 자동화된 감수성검사 장비에서 ESBL을 민감하게 검출해주는 것이 가장 이상적이라고 할 수 있다. MicroScan의 Type 21 panel은 균의 동정 및 감수성검사와 동시에 신속하게 ESBL을 검출할 수 있는 장점이 있었으나, 특이도가 낮은 단점이 있었다. 따라서 본원에서는 MicroScan Type 21 panel 검사에서 ESBL로 의심시에 즉시 ESBL에 준해서 치료하도록 보고한 후, 다른 3세대 cephalosporin 또는 aztreonam에 대해서 한가지 이상 내성인 경우는 확인검사를 하지 않고, cefpodoxime 선별에만 양성일 때는 DDS 검사를 실시하여 음성이면 각각의 cephalosporin에 대한 MIC 검사 결과에 준해서 감수성을 판정하도록 보고하고 있다 [35].

요 약

배 경 : 한국의 3차병원에서는 근래 3세대 cephalosporin에 내성인 extended-spectrum β -lactamase

(ESBL)를 생산하는 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*가 증가하고 있다. MicroScan Neg Combo Panel Type 21은 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam 외에 1 μ g/mL의 cefpodoxime을 선별항균제로 추가하여 ESBL을 생산하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*를 민감하게 검출하도록 제작되었다. 이에 Type 21 panel의 ESBL 검출능을 평가하고자 하였다.

방 법 : 1998년 11월부터 12월까지 임상검체에서 분리된 *E. coli* 496균주, *K. pneumoniae* 326균주를 Type 21 panel로 검사하였다. Type 21 panel에서 ESBL로 판독된 균주들은 double disk synergy 검사(DDS)로 확인하였다. 또한, cefpodoxime의 특이도를 판단하고자 1999년 1월부터 5월까지 MicroScan의 감수성 결과상 cefpodoxime에만 내성을 보이고 다른 3세대 cephalosporin 및 aztreonam 항균제에 대해서는 감수성을 보인 *E. coli* 54균주, *K. pneumoniae* 20균주에 대해서 β -lactamase 등전점 검사를 실시하였다.

결 과 : *E. coli* 496균주 중 75균주(15%)와 *K. pneumoniae* 326균주 중 68균주(21%)가 Type 21 panel에서 ESBL 생산균주로 판독되었다. 이 중 DDS 양성인 *E. coli* 75균주 중 38균주(51%)와 *K. pneumoniae* 68균주 중 56균주(82%)로 총 94균주였다. 94 ESBL 균주 중 cefpodoxime이 94균주 모두(100%)를, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, aztreonam 등은 각각 85%, 84%, 84%, 86%를 검출하였다. Cefpodoxime에 의해 ESBL 균주로 선별된 *E. coli*의 49%, *K. pneumoniae* 20%가 DDS 음성이었다. Cefpodoxime에만 내성을 보인 74 균주를 대상으로 등전점 검사를 한 결과 대부분이 DDS 음성, cefoxitin 내성이고, pI 5.4 또는 pI 7.6의 β -lactamase 단일밴드를 보이거나 밴드가 관찰되지 않았으므로 TEM-1, 2 또는 SHV-1 β -lactamase 생성 균주이거나 기저 수준의 Amp C β -lactamase 생성 균주일 가능성이 높다.

결 론 : MicroScan Neg Combo Panel Type 21은 cefpodoxime을 추가함으로써 ESBL을 검출하는 민감도를 높였다. 그러나 cefpodoxime은 상당수의 DDS 음성 균주도 ESBL 균주로 선별하여 Type 21의 특이도를 낮추었다. 따라서 cefpodoxime에 내성이면서 다른 3세대 cephalosporin 또는 aztreonam 제제 중 한가지 이상에 동시 내성을 보이는 경우는 모든 3세대 cephalosporin과 aztreonam에 대하여 내성으로 보고하고, cefpodoxime에만 내성을 보이는 경우는 DDS로 확인하도록 하였다.

Acknowledgement

β -lactamase 등전점 검사를 위한 표준 균주들인 J53 pCFF04 (TEM-3), C600 pUD16 (TEM-4), J53 pMG229 (SHV-2), J53 pUD18 (SHV-3), J53 pUD21 (SHV-4), ClaNal pAFF2 (SHV-5)를 제공해 주신 Dr. Jacoby 께 감사드립니다.

나다.

참 고 문 헌

- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum. β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-1704.
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
- Sanders CC, Sanders WE, Jr. β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992;15:824-39.
- 이경원, 조성란, 이창숙, 정윤섭, 권오현. Extended broad-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. *감염* 1994;26:341-8.
- Pai H. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases in Korean isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Medical Journal* 1998;39:514-9.
- 정석훈, 서설송, 신희봉, 정윤섭, 권오현 등. Extended-spectrum β -lactamase 생성 *Klebsiella pneumoniae* 감염의 pulsed-field gel electrophoresis를 이용한 역학적 분석. *감염* 1996;28:405-12.
- 이수연, 이선화, 배직현. *Klebsiella pneumoniae*의 extended-spectrum β -lactamase 검출. *대한임상병리학 회지* 1997;17:1076-88.
- 이선화, 정재심, 이수연, 배현주, 나준, 박성종, 피수영, 배직현. Extended-spectrum β -lactamase를 생산하는 *Klebsiella pneumoniae* 패혈증 집단발생의 분자역학적 조사. *병원감염관리* 1997;2:13-28.
- Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med* 1993;119:428-30.
- Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* 1993;119:353-8.
- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, et al. Resistance to cefotaxime and seven other β -lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1677-81.
- Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877-82.
- Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. Problems with detection of β -lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:411-25.
- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 1994;32:691-6.
- Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996;34:908-11.
- Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol* 1997;35:2191-7.
- Wiley B, Bertolin J, Schoer K, Small GW, Low DE, McGeer A. Evaluation of 2 μ g/mL cefpodoxime screen plate for detection of 3rd generation cephalosporin resistance in *E. coli* and *Klebsiella* spp. In Abstracts of 99th General Meeting of the American Society of Microbiology 1995. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
- Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol* 1996;34:1880-4.
- Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with the Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol* 1996;34:2997-3001.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement. NCCLS document M7-A4. NCCLS, Wayne, Pa. 1999.
- Livermore DM, Williams JD. β -lactams: mode of action and mechanism of bacterial resistance. In : Lorian V ed. *Antibiotics In Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:502-78.
- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 1996;32:691-696.

24. Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *J Clin Microbiol* 1997;35:2593-7.
25. Moland ES, Sanders CC, Thomson KS. Can results obtained with commercially available MiroScan microdilution panels serve as an indicator of β -lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam. *J Clin Microbiol* 1998;36:2575-9.
26. 송원근, 김현태, 이규만. Cefpodoxime 디스크를 이용한 extended-spectrum β -lactamases 생성 *Klebsiella pneumoniae* 와 *Escherichia coli* 선별법. 대한임상병리학회지 1999;19:196-201.
27. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: a comparison of the double disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agent Chemother* 1992; 36: 1877-82.
28. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Multicenter survey of the in vitro activity of four expanded-spectrum β -lactams against consecutive contemporary clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:281-7.
29. Willey BM, Khan N, Schoer K, Ricitano D, Kapala MA, McGeer A, et al. Evaluation of the MicroScan NEG Combo Type 21 panel for detection of 3rd generation cephalosporin resistance in *E. coli* and *Klebsiella* spp, C-255. In Abstracts of 99th General Meeting of the American Society of Microbiology 1999. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
30. Reig R, Roy C, Hermida A, Teruel D, Coira A. A survey of β -lactamases from 618 isolates of *Klebsiella* spp. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:29-35.
31. Ling TKW, Lyon DJ, Cheng FB, French GL. In-vitro antimicrobial susceptibility and β -lactamases of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:65-71.
32. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim J, Cho DT. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol* 1998;36:1446-9.
33. 정윤섭, 이경원, 오카모도 료이찌, 이노우에 마쓰히사. 임상검체에서 분리된 extended-spectrum β -lactam 항균제 분해 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 성장. 감염 1997;29:477-85.
34. 김미나, 정재심, 김봉철, 배직현. 원내감염균과 원외 감염에서 분리된 원인균의 항균제 감수성 비교. 감염 1993;25:333-42.
35. Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In Murray PR et al. ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington DC: ASM press, 1999:1569-70.