

***Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*의 Extended-spectrum β -lactamase 검출법의 비교**

황규열, 어 영, 김현주, 장인호, 윤갑준

연세대학교 원주의과대학 임상병리학과교실

Comparison of Detection Methods of Extended-spectrum β -lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*

Gyu Yel Hwang, Young Uh, Hyun-Joo Kim, In Ho Jang, and Kap Jun Yoon

Department of Clinical Pathology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background : Accurate detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) is important because ESBLs producing organisms may appear susceptible to oxyimino- β -lactams in standard susceptibility tests, but are considered to be clinically resistant to these drugs. Conventional antimicrobial susceptibility test methods do not reliably detect ESBL production. Molecular techniques and NCCLS broth dilution method, which detect ESBL production, may be time consuming, expensive and technically difficult to perform. The purpose of this study is to evaluate the clinical usefulness of NCCLS ESBL phenotypic confirmatory test by disk diffusion method.

Methods : For 96 *Escherichia coli* and 49 *Klebsiella pneumoniae* isolates collected between December 2000 to February 2001, double disk synergy test, NCCLS ESBL screening and phenotypic confirmatory test by disk diffusion test were performed. The ESBL producer was defined as organism showed an increase in the zone diameter of ≥ 5 mm for either antimicrobial agent such as cefotaxime and ceftazidime tested in combination with clavulanic acid versus its zone when tested alone.

Results : The sensitivity of NCCLS ESBL phenotypic confirmatory test were as follows: cefotaxime/clavulanic acid disk; 100% in *K. pneumoniae* and 83% in *E. coli*, and ceftazidime/clavulanic acid disk; 94% in *K. pneumoniae* and 67% in *E. coli*, respectively. Among the organisms with positive to NCCLS ESBL phenotypic confirmatory test, the detection rate of antimicrobial agents in double disk synergy test were as follows: *K. pneumoniae*; cefotaxime (84%), aztreonam (74%), and ceftazidime (52%), and *E. coli*; cefotaxime (44%), ceftazidime (44%), and aztreonam (39%).

Conclusions : The NCCLS ESBL phenotypic confirmatory test by disk diffusion method is easy, rapid, and sensitive method, suitable for routine use in the clinical laboratory.

(Korean J Clin Microbiol 2001;4:62-66)

Key Words : Extended-spectrum β -lactamase, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, Cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime/clavulanic acid

서 론

접수번호 : CM 4-1-13

교신저자 : 어 영

(220-701)강원도 원주시 일산동 162

원주기독병원 임상병리과

Tel : (033) 741-1593 Fax : (033) 731-0506

최근들어 국내외를 막론하고 extended-spectrum β -lactamase (ESBL로 약함) 생성 균종의 급격한 증가로 인하여 치료 약제를 선택하는데 커다란 문제가 되고

있다[1]. 그러므로 임상병리과에서는 ESBL 균주를 신속하고 정확하게 검출할 필요성이 높아지고 있다. 그러나 ESBL 생성 균주 중에는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 감수성 시험에서 ceftazidime, cefotaxime, aztreonam 등과 같은 oxyimino- β -lactam 제제의 일부에 대하여 내성을 보이지 않는 경우도 있고, ESBL의 종류에 따라서 생성되는 양이 다양하며 한 균주가 여러 가지 효소를 동시에 생성하는 경우도 있어 통상적인 항균제 감수성 시험만으로는 ESBL 생성 균주를 검출하기에는 미흡하다[2,3].

ESBL 균주를 검출하는 방법으로는 분자생물학적 방법, E-test, Vitek ESBL, 이중 디스크 확산법, NCCLS의 디스크 확산법을 이용한 방법 등 여러 가지가 있으며 검사법의 선택은 각 병원의 여건이나 감수성 시험방법에 따라 달라질 수 있을 것이다[4-6]. 원주기독병원에서는 ESBL 생성 장내세균의 검출을 위하여 clavulanic acid와 ceftazidime, cefotaxime 및 aztreonam 디스크 가장자리와의 간격이 2.3 mm인 이중 디스크법과 NCCLS의 ESBL 선별법을 병행하여 사용하였으나 이중 디스크법은 검출 예민도가 낮았고 NCCLS의 ESBL 선별법은 확인시험을 시행하지 않았기 때문에 “ESBL 생성 균주일 가능성이 있음”이라는 모호한 해석 결과를 보고하는 문제점이 있었다[7]. 최근 BBL 회사에서는 cefotaxime 및 ceftazidime 각각에 clavulanic acid 10 g을 첨가한 디스크를 시판하였고 국내에서도 사용이 가능하게 되었다. 이에 본 연구에서는 장내세균 중 ESBL의 대부분을 차지하는 *Klebsiella pneumoniae*와 *Escherichia coli*를 대상으로 NCCLS 디스크확산법의 ESBL 검출법과 이중 디스크 확산법을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

2000년 12월부터 2001년 2월까지 임상검체에서 분리된 일련의 *E. coli* 96균주와 *K. pneumoniae* 49균주를 대상으로 ESBL 검출방법인 이중디스크확산법, NCCLS의 디스크확산법에 의한 ESBL 선별법 및 확인법을 비교하였다. *K. pneumoniae*와 *E. coli*의 동정은 20개의 생화학 시험으로 구성된 microplate 동정법[8]을 사용하였다. ESBL 검출을 위한 이중디스크확산법은 20/10 μ g의 amoxicillin/clavulanic acid 디스크(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD., USA)와 30 μ g의 aztreonam (BBL), cefotaxime (BBL) 및 ceftazidime (BBL) 디스크와의 가장자리 간격이 1.5 cm가 되도록 놓은 다음, 35 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양후 상승작용에 의해 억제대의 크기가 증가하였을 때 양성으로 판정하였다[1]. NCCLS의 디스크확산법에 의한 ESBL 선별법 및 확인법은 aztreonam (BBL, 30 μ g), cefotaxime (BBL, 30 μ g), ceftazidime (BBL, 30 μ g), cefpodoxime (BBL, 10 μ g) ceftazidime/clavulanic acid (30/10 μ g, BBL) 및 cefotaxime/clavulanic acid (30/10 μ g,

BBL)의 억제대 지름을 측정 한 후 aztreonam과 cefotaxime은 27 mm이하, ceftazidime과 cefpodoxime은 22 mm 이하이면 선별시험 양성으로 판정하였고, 확인시험은 cefotaxime과 cefotaxime/clavulanic acid (이하 CTC로 약함)의 억제대를 측정하여(이하 “ESBL CTC 확인시험”으로 표현함) CTC의 억제대가 5 mm이상 증가하거나 ceftazidime과 ceftazidime/clavulanic acid (30/10 μ g, BBL, 이하 CCV로 약함)의 억제대를 측정하여(이하 ESBL CCV 확인시험”으로 표현함) CCV의 억제대가 5 mm이상 증가하면 양성, 즉 ESBL 생성균주로 판정하였다[9]. 또한 *K. pneumoniae*와 *E. coli*의 ESBL 생성 유무에 따른 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefoxitin (BBL), cefpodoxime 및 cefepime (BBL)의 감수성률을 분석하였다.

결 과

NCCLS 기준에 따른 ESBL CTC 및 CCV 확인시험에서 *K. pneumoniae*는 각각 100%와 94%의 양성률이었으며, *E. coli*는 각각 83%와 67%의 양성률이었다. ESBL CTC 또는 CCV 확인시험에서 양성이었던 균종의 NCCLS 기준에 따른 ESBL 선별시험 양성률은 *K. pneumoniae*가 87-97%였고 *E. coli*는 61-89%였으며, 항균제 디스크별로 *K. pneumoniae*는 cefotaxime과 ceftazidime이 97%로 가장 높았으며 cefpodoxime이 가장 낮았고, *E. coli*는 ceftazidime이 다른 세가지 디스크보다 20%이상 양성률이 높았다. 또한, ESBL 확인시험 양성인 균종의 이중디스크확산법 양성률은 *K. pneumoniae*가 52-84%였고 *E. coli*는 39-44%였으며, 항균제 디스크별로 *K. pneumoniae*는 cefotaxime, aztreonam, ceftazidime의 순서로서 각각 84%, 74% 및 52%에서 양성이었으며, *E. coli*는 cefotaxime과 ceftazidime이 44%로 동일하였으며 aztreonam은 39%의 양성률로 가장 낮았다. NCCLS의 ESBL 선별시험의 항균제 디스크별 위 양성률은 *K. pneumoniae*의 경우 cefotaxime이 72%로 가장 높았고 cefpodoxime이 17%로 가장 낮았으며, *E. coli*도 cefpodoxime이 19%로 가장 낮았으며 다른 항균제는 30-35%사이였다(Table 1).

고 찰

임상검사실에서 시행하는 항균제 감수성 시험은 균종의 약제별 clinical breakpoint를 기준으로 감수성과 내성을 구분한다. 그러나 ESBL을 생성하는 균종은 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam 등을 분해하므로 이들 약제에 내성이지만 각 약제의 최소억제농도는 효소의 종류에 따라 다르기 때문에 NCCLS의 cefotaxime, ceftazidime 및 aztreonam에 대한 디스크 확산법에서 내성을 나타내지 않는 경우가 있으며 이러한 균주들은

Table 1. Comparison of various methods for detection of ESBL producing *K. pneumoniae* and *E. coli*

Organism (No.)	% susceptibility to:						% DDS positivity to:			% positivity of ESBL test*					
	CTX	CAZ	ATM	FOX	CPD	FEP	CTX	CAZ	ATM	Screening			Confirmatory		
										CTX	CAZ	ATM	CPD	CCV	CTC
<i>E. coli</i>															
ESBL-nonproducer (78)	91	94	92	90	91	99	0	0	0	33	35	33	19	0	0
ESBL-producer (18)	44	56	56	78	39	72	44	44	39	67	89	61	61	67	83
<i>K. pneumoniae</i>															
ESBL-nonproducer (18)	89	89	94	78	89	100	0	0	0	72	33	56	17	0	0
ESBL-producer(31)	16	23	16	65	16	52	84	52	74	97	97	94	87	94	100

*NCCLS recommended method.

Abbreviations: DDS, double disk synergy test; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FOX, ceftazidime; CPD, cefpodoxime; FEP, cefepime; CCV, ceftazidime and ceftazidime/clavulanic acid; CTC, cefotaxime and cefotaxime/clavulanic acid.

carbapenem제나 cephamycin제를 제외한 모든 β -lactam 제에 치료 효과가 없다[2]. 그러므로 임상병리과에서는 ESBL 생성 균종을 정확하고 신속하게 검출하는 검사 방법이 필요하다.

ESBL 균주를 검출하는 방법은 선별시험으로 3세대 cephalosporin, aztreonam 등을 이용하여 선별기준이 되는 억제대 지름이나 최소억제농도를 측정하는 방법[9]과 clavulanic acid에 의해 ESBL 활성이 억제되는 것을 이용하는 Vitek ESBL 시험[4], E-test[6], 이중 또는 3차원 디스크 확산법[5] 등이 있고 확진 검사로 분자유전학적 방법[10] 등이 있으며, NCCLS에서는 디스크 확산법과 액체배지희석법에서 clavulanic acid의 첨가에 의한 억제대 또는 최소억제농도(MIC)의 증가를 확인하는 것이 참고방법이다[9]. 그러나 NCCLS의 액체배지희석법과 분자유전학적 방법은 술식이 번거롭고 특수 장비와 시약이 필요하므로 임상검사실에서 통상 검사로 사용하기에는 부적합하다.

Vitek ESBL 시험은 4개의 well에 cefotaxime (0.5 μ g/mL), cefotaxime/clavulanic acid (0.5/4 μ g/mL), ceftazidime (0.5 μ g/mL) 및 ceftazidime/clavulanic acid (0.5/4 μ g/mL)가 들어 있고 균 접종 및 배양후에 약물만 들어있는 well과 clavulanic acid가 첨가된 well에서의 성장을 비교하여 ESBL을 검출하는 방법으로서 Sanders 등[4]은 ESBL 균주로 확인된 157균주의 Vitek ESBL 시험의 검출 예민도와 특이도는 각각 99.5%와 100%로 매우 높음을 보고하였다. E-test ESBL 선별시험은 한 개의 strip 양쪽에 한쪽은 ceftazidime이 mL당 0.5-32 μ g의 농도가 순차적으로 묻어 있고 다른 한쪽은 ceftazidime이 0.125-8 μ g까지 농도와 함께 4 μ g/mL의 고정된 농도의 clavulanic acid가 첨가되어 있으며 시험 세균의 ceftazidime MIC/ceftazidime-clavulanic acid MIC의 비(ratio)가 8이상이면 ESBL 선별양성으로 판독하는 방법으로서 Vercauteren 등[11]은 ESBL 효소 종류에 따라 TEM 형은 69%, SHV

형은 94%의 검출률을 보고하였다. Vitek ESBL 시험과 E-test ESBL 선별시험은 예민도와 특이도가 높지만 ESBL 생성균주의 분리율이 높고 의료보험 수가가 낮은 우리나라의 실정에서는 추가 검사 비용이 부담스럽다.

이중 디스크 확산법에 의한 ESBL 검출 시험은 양성 예측도는 높으나 검사술식에 대한 표준화된 방법이 없으며[10,12], ESBL 생성 *E. coli*의 검출 예민도가 낮은 것이 문제가 된다[10].

NCCLS 디스크 확산법의 ESBL 선별시험[9]의 기준은 감수성 판정 기준보다 크기 때문에 검출 예민도는 높일 수 있으나 위양성을 또한 높기 때문에 확인시험이 필요하다[10,13,14]. 그러나 NCCLS 디스크확산법의 ESBL CTC 및 CCV 확인시험은 clavulanic acid 용액을 제조하여 시험할 경우에는 검사 업무량이 너무 많아져 임상검사실에서 통상 검사로 사용하기에는 어려웠다. 최근 BBL, MAST, Oxoid 등의 회사에서는 cefotaxime과 ceftazidime 각각에 10 μ g의 clavulanic acid를 첨가한 디스크를 상품화하여 임상검사실에서 손쉽게 ESBL 균주를 확인할 수 있게 되었다[6,15]. M' Zali 등[6]은 ESBL CCV 및 CTC 확인시험의 검출 예민도는 각각 86%와 65.5%였고 두가지를 모두 사용하면 93%의 예민도로서 이중디스크 확산법의 양성률과 유사함을 보고하였는데 본 연구에서는 CTC 확인 시험의 양성률이 더 높았으며 이중 디스크 확산법보다 NCCLS ESBL 확인방법의 예민도가 더 높았다. 이러한 차이는 ESBL 균주 자체의 특성 또는 검사법과 판독방법이 다른 것이 원인이거나 Bedenic 등[5]의 지적대로 특이성이 낮은 것이 원인일 가능성도 있으나 대상균주수가 적고 확진 시험을 시행하지 않아 정확한 원인은 알 수 없었으며 앞으로 NCCLS의 ESBL 확인방법의 예민도와 특이도에 대한 연구가 필요하다고 생각되었다.

결론적으로 NCCLS 디스크확산법을 이용한 ESBL 확

인방법은 검사방법이 쉽고 검사비용이 저렴하며 예민도가 높은 검사법으로서 임상검사실에서 통상검사로 사용하기에 적합한 검사였다.

요 약

배 경 : Extended spectrum β -lactamase (ESBL로 약함)를 생성하는 세균은 감수성 시험에서 oxyimino- β -lactam 계열 약물에 감수성을 보일 수 있으나 임상적으로는 효과가 없기 때문에 ESBL 생성 균주의 정확한 검출은 매우 중요하다. 통상적인 항균제 감수성시험은 ESBL 균종을 정확히 검출하지 못하며 ESBL 생성을 검출하기 위한 분자생물학적 방법과 액체배지 희석법은 시간이 오래 걸리고 검사비용이 많이 들며 시험방법이 어렵다. 이에 본 연구에서는 NCCLS의 디스크 확산법에 의한 ESBL 확인 검출법의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

방 법 : 2000년 12월부터 2001년 2월까지 분리되어 보관하였던 *Escherichia coli* 96균주와 *Klebsiella pneumoniae* 49균주를 대상으로 이중디스크확산법, NCCLS의 디스크확산법에 의한 ESBL 선별법 및 확인법을 시행하였다. ESBL 생성균주는 NCCLS ESBL 확인 시험에서 cefotaxime과 ceftazidime의 억제대와 cefotaxime과 ceftazidime 항균제에 clavulanic acid가 첨가된 디스크의 억제대를 비교하여 한가지라도 5 mm이상 증가되는 균종으로 정의하였다.

결 과 : NCCLS의 ESBL 확인시험에서 cefotaxime/clavulanic acid 디스크의 예민도는 *K. pneumoniae*에서 100%였고 *E. coli*는 83%였으며 ceftazidime/clavulanic acid 디스크의 예민도는 *K. pneumoniae*에서 94%였고 *E. coli*는 67%였다. NCCLS의 ESBL 확인시험 양성이었던 균종의 이중디스크확산법 양성률은 항균제 디스크별로 *K. pneumoniae*는 cefotaxime 84%, aztreonam 74% 및 ceftazidime 52%였고 *E. coli*는 cefotaxime 44%, ceftazidime 44% 및 aztreonam 39%였다.

결 론 : NCCLS 디스크확산법을 이용한 ESBL 확인 방법은 검사방법이 쉽고 검사비용이 저렴하며 예민도가 높은 검사법으로서 임상검사실에서 통상검사로 사용하기에 적합한 검사였다.

참 고 문 헌

1. 송원근, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈, 신혜정, 등. 전국 12개 병원 환자에서 분리된 extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 대한화학요법학회지 2000;18:401-10.
2. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Rev 1995;8:557-84.
3. Jacoby GA and Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996;34:908-11.
4. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, et al. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. J Clin Microbiol 1996;34:2997-3001.
5. Bedenic B, Randegger C, Boras A, Haeckler H. Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. J Chemother. 2001;13:24-33.
6. M' Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family enterobacteriaceae : comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. J Antimicrob Chemother. 2000;45:881-5.
7. 어 영, 박순덕, 손정석, 이현교, 정안숙, 조현미 등. 임상검체에서 분리되는 *Klebsiella* 균속의 동정, 항균제 감수성 및 역학. 대한임상미생물학회지 2000;3:99-110.
8. 어 영, 손정석, 황규열, 장인호, 윤갑준, 서동민. Microplate를 이용한 장내세균 동정법. 대한임상미생물학회지 1999;2:135-43.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement. NCCLS, Villanova, PA, 2001.
10. 김병립, 정석훈, 구자영, 이경원, 정윤섭, 정태진 등. Extended-spectrum beta-lactamase 생성 장내세균의 분리율 및 선별 검사. 대한임상미생물학회지 1999;2:28-39.
11. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-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.
12. 이수연, 이선화, 배직현. *Klebsiella pneumoniae*의 Extended broad-spectrum β -lactamase 검출. 대한임상병리학학회지 1997;17:1076-88.
13. Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. APMIS 2000; 108:237-40.
14. Hadziyannis E, Tuohy M, Thomas L, Procop GW,

Washington JA, Hall GS. *Screening and confirmatory testing for extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Klebsiella oxytoca clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:113-7.

15. Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. J Clin Microbiol* 2000;38:4228-32.