

Vitek ESBL Test를 이용하여 검출된 *Escherichia coli*와 *Klebsiella* spp.의 항균제 감수성 양상

조은혜, 이남용

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학교실

Antibiogram of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Detected by Vitek ESBL Test

Eun Hae Cho, Nam Yong Lee

Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates are clinically resistant to all the β -lactams except carapenems and cephamycins. This study was to determine the prevalence of ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. and the rates and trends of resistance to extended-spectrum β -lactams and other antimicrobial agents in ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* spp..

Methods: During the periods of 2002, a total 2,551 clinical isolates of *E. coli* & *Klebsiella* spp. were collected from patients of the Samsung medical center, Seoul, Korea. Antimicrobial susceptibility test and determination of ESBL production were performed by Vitek GNS-433 card.

Results: 151/1,594 (9.5%) of *E. coli* isolates, 128/896 (14.3%) of *K. pneumoniae* isolates and 11/61 (18.0%) of *K. oxytica* were ESBL producing strains. Resistance to ceftiofuran and ceftazidime were 2.4% and 13.4% in ESBL producing isolates. Imipenem had excellent activity against *E. coli* and *Klebsiella* spp. (100% susceptible).

Conclusion: In this study, ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp were more resistant to β -lactams including ceftiofuran than ESBL non-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp.. ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. showed a high level of co-resistance with aminoglycosides and fluoroquinolones. Imipenem showed the highest level of activity against *E. coli* and *Klebsiella* spp..

(*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(1):47-51)

Key words : Vitek GNS 433 Card, ESBL, Ceftiofuran, Ceftazidime, Imipenem

서 론

1980년대 초 독일에서 cefotaxime에 내성인 *Klebsiella pneumoniae*가 처음 보고된 후[1], 국내외를 막론하고

extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성 균종의 급격한 증가로 인하여 치료 약제를 선택하는데 커다란 문제가 되고 있다. ESBL 생성균은 penicillin, 헤파범 위 cephalosporin뿐 아니라 제 3세대 cephalosporin과 monobactam도 가수분해할 수 있다. 그러나 ESBL 생성균은 특징적으로 항균제 기질에 대한 특이도가 매우 다양하여 각 항균제에 대한 내성 양상이 일관적이지 않고, 일부 ESBL 균주는 비교적 낮은 최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)를 보여 통상적으로 그람음성균에 적용하는 내성 기준으로는 감수성으로 판독될 오류가 높다.

접수번호: CM 6-1-10

교신저자: 이남용

(135-710) 서울시 강남구 일원동 50

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학교실

TEL : (02) 3410-2706 FAX : (02) 3410-2719

E-mail : mmmicro@samsung.co.kr

이에 미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 ESBL 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella* spp.는 항생제 감수성 결과에 상관없이 모든 penicillin, cefepime과 cefepirome을 포함한 모든 cephalosproins과 aztreonam에 내성으로 보고할 것을 권고하고, ESBL 생성균을 검출하는 선별법 및 확인법을 제안하였다[2]. 또한 ESBL 생성균은 aminoglycoside, trimethoprim/sulfamethoxazole 등 다른 계열의 항균제에도 내성인 경우가 많고, cefotaxime과 cefotetan과 같은 cephamycin, moxalactam과 carbapenem에는 활성이 없으며, clavulanic acid에 의해서 활성이 억제되는 특성이 있는 것으로 알려져 있다. ESBL 균주를 검출하는 방법으로는 NCCLS에서 제안한 방법외에 이중 디스크 확산법, E-test, 분자생물학적 방법, 자동화기기를 이용한 방법등이 있다. 이중에서 최근에 개발된 자동화기기를 이용한 ESBL 검출법은 기존의 검출법과 비교시 매우 일치율이 높으며, 또한 빠르고 간편하게 ESBL 생성균을 검출할 수 있는 장점이 있다. 국내에서는 자동화장비인 MicroScan (Dade International, West Sacramento, CA, USA)에서 ESBL 선별검사용 kit가 도입되었으며, 생성 균주를 검출할 수 있는 Vitek ESBL (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO, USA)시험도 도입되어 항균제 감수성 검사를 동시에 시행할 수 있다.

Vitek ESBL 시험은 4개의 well에 cefotaxime, cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime/clavulanic acid가 들어 있고 균 접종 및 배양후에 약물만 들어있는 well과 clavulanic acid가 첨가된 well에서의 성장을 비교하여 ESBL을 검출하는 방법이다. Sanders 등[3]은 ESBL 균주로 확인된 157균주의 Vitek ESBL 시험의 검출 예민도와 특이도는 각각 99.5%와 100%로 매우 높음을 보고하였다. 국내에서는 Vitek ESBL 시험이 신등[4]에 의해 ESBL 생성 68주를 이용하여 NCCLS ESBL 확인법과 비교하여 1예의 위양성(특이도; 99.6%), 7예의 위음성(예민도; 89.7%)과 97.5%의 일치도를 보이는 것으로 보고되었으며, 이등[5]은 이중 디스크 확산법과 비교하여 Vitek ESBL 시험의 검출 민감도는 97%, 특이도는 99%, 양성 예측도는 99%로 임상 미생물 검사실에서 통상적인 ESBL 검출검사로 사용하기에 적절한 것으로 보고하였다. 본원에서는 2002년 1년간 분리된 장내세균의 일부를 Vitek system의 GNS 433 card를 이용하여 항균제 감수성 시험 시행과 동시에 ESBL 생성균을 검출하였다. 이에 본 연구에

서는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.에서 균종별 ESBL 생성균의 비율을 알아보고, ESBL 생성 균주와 ESBL 비생성 균주의 항균제 감수성 양상을 살펴보고, 비교 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상균주

2002년 1월부터 12월 사이에 본원 미생물 검사실에서 분리된 *E. coli*와 *Klebsiella* spp. 2,551주를 대상으로 하였다.

2. Vitek ESBL card에 의한 ESBL 검출

균종의 동정은 Vitek 장비와 GNI card를 이용하였으며, 항균제 감수성 검사와 ESBL 검출은 Vitek ESBL GNS-433 card를 사용하였다. ESBL card에 균주 부유액이 접종되면, Vitek 장비내에서 35°C 조건으로 배양되고 약 4-15 시간 후 항균제 감수성 결과를 얻을 수 있다. Vitek GNS 433 card는 ceftazidime 및 cefotaxime (각 0.5 µg/mL)이 단독으로 들어있는 well과 이들 항균제에 clavulanic acid (4 µg/mL)와 첨가한 well 등 총 4개의 well 중 clavulanic acid가 첨가된 well에서 어느 한쪽이라도 ceftazidime 및 cefotaxime 단독 well에 비해 성장감소율이 50% 이상이면 ESBL 생성양성 균주로 판정한다[3]. 판정결과에 따라 각 균주별 ESBL 양성율을 구하였다.

3. 항균제 감수성 양상

Vitek ESBL GNS-433 card는 시험항균제로 amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefoxitin, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, piperacillin/tazobactam, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole을 포함한다. 각각의 항균제에 대한 내성율을 ESBL 생성균과 비생성균으로 나누어 구하고, 비교분석하였다.

결 과

1. 균주별 ESBL 양성율

ESBL 생성균주는 *E. coli* 1,594주 중 151주(9.5%), *K.*

Table 1. ESBL positivity of clinical isolates of *E. coli* & *Klebsiella* spp.

Species	No. of ESBL positive	% positivity of ESBL	No. of ESBL negative	Total
<i>E. coli</i>	151	9.5	1,443	1,594
<i>K. pneumoniae</i>	128	14.3	768	896
<i>K. oxytoca</i>	11	18.0	50	61
Total	290	11.4	2,261	2,551

Table 2. Antibiogram of ESBL producing isolates & ESBL non-producing isolates

Antimicrobial agent (resistance breakpoint, $\mu\text{g}/\text{mL}$)	ESBL producing isolates (N=290)			ESBL non-producing isolates (N=2261)		
	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)
Amikacin (≥ 64)	82.4	7.6	10.0	97.7	1.0	1.3
Ampicillin (≥ 32)	0.0	0.0	100.0	22.3	0.5	77.2
Ampicillin/sulbactam ($\geq 32/16$)	2.8	39.6	57.6	52.2	32.5	15.3
Aztreonam (≥ 32)	53.1	10.7	36.2	96.3	1.5	2.2
Cefazolin (≥ 32)	7.2	4.5	88.3	88.4	2.8	8.8
Cefepime (≥ 32)	76.6	10.0	13.4	99.2	0.1	0.7
Cefoxitin (≥ 32)	94.8	2.8	2.4	94.1	1.2	4.7
Ceftriaxone (≥ 64)	43.4	26.6	30.0	97.1	1.3	1.6
Ciprofloxacin (≥ 4)	54.1	3.8	42.1	76.6	0.2	23.2
Gentamicin (≥ 16)	31.0	8.6	60.4	79.0	2.4	18.6
Imipenem (≥ 16)	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
Piperacillin/Tazobactam ($\geq 128/4$)	66.2	12.4	21.4	93.8	3.3	2.9
Tobramycin (≥ 16)	20.4	17.9	61.7	80.4	7.8	11.8
Trimethoprim/Sulfamethoxazole ($\geq 4/76$)	49.0	0.0	51.0	70.1	0.0	29.9

pneumoniae 896주 중 128주(14.3%)와 *Klebsiella oxytica* 61주 중의 11주(18.0%)였다(Table 1).

2. 항생제 감수성 양상

ESBL 생성 균주의 경우 cephamycin계 항균제인 cefoxitin과 4세대 cephalosporin계 항균제인 cefepime에 각각 2.4%, 13.4%의 내성율을 보였다.(Table 2). 관찰한 모든 균주에서 carbapenem계 항균제인 imipenem의 MIC가 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 감수성으로 나타났다.

ESBL 생성균주와 비생성균주의 내성율을 비교하면 amikacin에 대해서 각각 10.0%와 1.3%, gentamicin에는 60.4%와 18.6%, tobramycin에는 61.7%와 11.8%, trimethoprim/sulfamethoxazole에는 51.0%와 29.9%, ciprofloxacin에 대해서는 각각 42.1%와 23.2%이었다 (Table 2).

고 찰

ESBL 생성균주는 1980년대 초 유럽에서 처음으로 보고된 후 전 세계적으로 많이 보고되고 있다. ESBL 생성균주의 대부분은 주로 *Klebsiella* 균속과 *E. coli*에서 관찰되며, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* 및 *Enterobacter* 등 다른 그람음성균속에서도 관찰된다. 본원에서는 2002년 1년간 분리된 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 9.5%와 14.3%가 ESBL을 생성하는 것으로 추측되며, 이는 1999년 송등[6]이 전국 12개 병원을 대상으로 조사한 평균 ESBL 생성율 9.8%와 25.6%와 비교할 때 *E. coli*의 경우 비슷한 비율이며, *K. pneumoniae*의 경우 낮은 수치

를 보였다. 이는 Vitek ESBL kit내에 포함된 cefotaxime과 ceftazidime의 농도가 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이므로 이 이하의 항균제 최소억제농도를 보이는 ESBL 생성균주는 음성으로 나올 수 있다는 점을 고려하여 해석해야 할 것이다. 본 연구에서는 다른 균주에 대한 ESBL 양성율은 *E. cloacae* (40/209, 19.1%), *E. aerogenes* (11/126, 8.7%), *C. freundii* (20/179, 11.1%)등이었으나, 이들 균주에 대한 Vitek ESBL 검출의 정확도는 *E. coli*나 *Klebsiella* spp.보다는 낮을 것으로 알려져 있다[3]. 4세대 cephalosporin인 cefepime과 cefepirome은 3세대 cephalosporin보다 세포막 투과속도가 빠르기 때문에 ESBL 생성균에 대해 항생제 감수성 검사에서는 활성도가 높은 것으로 나타나지만 [7], 아직까지 ESBL 생성균에 의한 감염증의 치료효과에 대한 임상적인 자료가 불충분한 상태이다. 또한 cefepime은 세균의 접종량이 표준량보다 많을 경우 최소억제농도가 증가하는 집종효과를 보여 심내막염, 뇌막염, 골수염, 농양등 세균량이 많은 감염에서의 효과가 의문시되고 있다[8]. 분리된 ESBL 생성 *E. coli*, *K. pneumoniae*와 *K. oxytica*의 cefepime 내성율은 각각 15.9%, 10.2%, 18.2%으로 나타나 모두 10%이상의 내성율을 보여, cefepime의 실험적 치료적 사용에서의 효용성도 점점 줄어들고 있다. ESBL 비생성 *E. coli*, *K. pneumoniae*와 *K. oxytica*의 내성율을 각각 0.2%, 1.7%와 0%로 나타나 ESBL 생성균주에 비하여 낮은 내성율을 보였다.세균이 cefoxitin에 내성을 획득하는 기전으로는 외막의 porin 소실에 의한 항균제 투과성 저하[9] 및 plasmid에 매개되는 ampC형 β -lactamase 유전자 획득[10,11]이 알려져 있다. 1989년 서울의 대학병원 환자의 창상검체에서 plasmid에 의해 매개되는 AmpC β -lactamase 생성 *K. pneumoniae*가 분리되었

는데, 이 효소는 제 3세대 cephalosporin 뿐 아니라 cephamycin계 항균제인 cefoxitin도 가수분해할 수 있었기에 CMY-1이라 명명되고[12], 근래 그 빈도가 현저히 증가했다고 보고되었다[13]. 본 연구에서도 ESBL 생성균주중 cefoxitin에 내성율은 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*에 각각 1.3%, 3.1%와 9.1%로 나타났다. 이는 1999년 송등[6]이 발표한 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 21.7%와 7.3%에 비하여 낮은 수치이다. ESBL 비생성균주중 cefoxitin에 대한 내성율은 *E. coli*, *K. pneumoniae*와 *K. oxytoca*에 각각 3.2%, 7.4%와 6.0%로 나타났다. CMY-1 효소는 β -lactamase inhibitor인 clavulanic acid, sulbactam, tazobactam등에 저해되지 않는다. *E. coli*와 *Klebsiella* spp.에서 cefoxitin에 대한 내성율이 ESBL 생성균주가 ESBL 비생성균주에 비해서 낮게 나타나는데 이는 AmpC- β -lactamase가 동시에 존재하여 clavulanic acid에 의한 억제효과를 감소시켰을 가능성을 시사한다. 염생체성 K1 β -lactamase과 생성 *K. oxytoca*의 경우에도 AmpC- β -lactamase와 마찬가지로 β -lactamase inhibitor에 저해되지 않아 Vitek ESBL검사에서 위음성을 보일 수 있다. 신등[4]의 보고에서도 Vitek ESBL 검사에서 위음성을 보인 7균주가 모두 cefoxitin 내성인 것으로 밝혀져, cefoxitin에 내성이면서 Vitek ESBL 검사에서 음성이면 다른 방법을 첨가해야 할 것으로 생각되었다. Cephamycin은 항생제 감수성 검사에서는 감수성으로 나타나더라도 항균효과가 떨어지는 경우가 있어, 치료효과는 아직 불명확하다[14].

Imipenem은 살균능력과 항정능력을 모두 가지고 있는 항생제로써, 치료 효과도 높은 것으로 알려져 있다. 아직까지 imipenem 등의 carbapenem제에 내성인 *E. coli*나 *K. pneumoniae*는 우리 나라에 없는 것으로 알려져 있으며 본 연구에서도 imipenem에 내성인 균주는 관찰되지 않았다. Babini와 Livermore는 1997년에서 1998년 사이에 유럽에서 분리된 *Klebsiella* spp.를 대상으로 ESBL 생성균주와 비생성균주간의 aminoglycoside제에 대한 내성율의 차이를 비교한 결과, gentamicin은 각각 71%와 9.5%, amikacin은 61%와 4%로 ESBL 생성균주가 다른 약제에 대한 내성도 많다고 보고하였다[15]. 이는 aminoglycoside제와 trimethoprim/sulfamethoxazole 내성 유전자가 ESBL 생성 유전자와 같은 plasmid에 있기 때문이라고 하였다[16]. 본 연구에서도 aminoglycoside제와 trimethoprim/sulfamethoxazole 등에 대한 ESBL 생성주의 내성율은 ESBL 비생성균주보다 현저히 높았다. ESBL 생성균주는 fluoroquinolone제에도 내성인 균주가 많다고 알려져 있으며[15] 본 연구에서도 모든 균주에서 ESBL 생성주의 내성율이 ESBL 비생성균주보다 높은 것을 관찰할 수 있었다. ESBL 비생성균주에 비하여 ESBL 생성균주는 Cefepime을 포함한 β -lactam 항생제에 대한 내성율이 높았고, aminoglycoside, trimethoprim/sulfamethoxazole, fluoroquinolone제에 대한 교차내성율도 높았으나,

imipenem에 내성인 균주는 관찰되지 않아, 아직까지는 imipenem이 ESBL 생성균주에 대한 치료약제로 유용할 것으로 사료된다. ESBL 비생성균주가 ESBL 생성균주에 비하여 cefoxitin 내성율이 높은 것은 AmpC β -lactamase에 의한 효과를 고려하여 판단해야 할 것이다.

요 약

배 경 : Extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia. coli*와 *Klebsiella* spp.는 carbapenem과 cephamycin을 제외한 모든 β -lactam항생제에 임상적으로 내성이다. 본 연구는 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.의 ESBL 생성율과 ESBL 생성균주와 ESBL 비생성균주의 항생제 내성 양상을 비교분석하고자 하였다.

방 법 : 2002년 1년간 본원의 임상검체에서 분리된 2551주의 *E. coli*와 *Klebsiella* spp.를 대상으로 하였다. 항균제 감수성 검사와 ESBL 검출검사는 Vitek GNS-433 card를 이용하였다.

결 과 : *E. coli* 총 1594주 중 151주 (9.5%), *K. pneumoniae* 896주 중 128주, *K. oxytoca* 61주 중 11가 ESBL 생성균주로 나타났다. ESBL 생성 균주의 cefoxitin과 cefepime의 내성율은 각각 2.4%와 13.4%로 나타났다. Imipenem은 *E. coli*와 *Klebsiella* spp. 모든 균주에 감수성을 보였다.

결 론 : ESBL 비생성균주에 비하여 ESBL 생성균주는 cefepime을 포함한 β -lactam 항생제에 대한 내성율이 높았고, aminoglycoside, trimethoprim/sulfamethoxazole, fluoroquinolone제에 대한 교차내성율도 높았으나, imipenem에 내성인 균주는 관찰되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315-7.
2. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 12th informational supplement. NCCLS document M100-S12. Pennsylvania: NCCLS, USA, 2002.
3. 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 Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol* 1996;34:2997-3001.
4. 신경섭, 손보라. *Escherichia coli*와 *Klebsiella* Species에서 Extended-Spectrum β -Lactamase 검출을 위한 Vitek ESBL Test와 그 외 방법의 비교. 대한임상병리학회지

- 2002;22:21-6.
5. 이보영, 정석훈, 정태식, 남희준, 지중현, 홍유라. Vitek GNS 121 Card를 이용한 Extended-spectrum β -Lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella* spp. 검출. 대한임상병리학회지 2001;21:350-4.
 6. 송원근, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈, 신혜정 등. 전국 12개 병원 환자에서 분리된 Extended-spectrum β -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*. 대한 화학요법학회지 2000;18:401-10.
 7. Sanders CC. *In vitro* activity of fourth generation cephalosporins against enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta lactamase. *J chemother* 1996;8(S2):57-62.
 8. Kenneth ST and Ellen SM. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3548-54.
 9. Martinez ML, Hernandez AS, 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
 10. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1987;17:316-21.
 11. 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;34:2200-9.12. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989;17:316-21.
 13. 정윤섭 및 이경원. 1997년 1-12월에 분리된 세균의 항균제 감수성. 항균제 내성 소식 1998;6:1-2.
 14. 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.
 15. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:183-9.
 16. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1350-4.