

Isolation Frequency of Extended Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis*

Young Uh¹, Gyu Yul Hwang¹, Ohgun Kwon¹, Kap Jun Yoon¹, Hyo Youl Kim²

Departments of ¹Laboratory Medicine and ²Infectious Diseases,
Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background: Accurate detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) is important because ESBL-producing organisms may appear susceptible to oxymino- β -lactams in standard susceptibility tests, but are considered to be clinically resistant to these drugs. And continued monitoring of isolation trend of ESBL-producing organisms is essential for the guideline settlement of antibiotic usage and infection control program.

Methods: Disk diffusion test using the Clinical and Laboratory Standards Institute's ESBL phenotypic confirmatory test were performed on 5,511 clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Proteus mirabilis* during the recent six years (April 2001-March 2007). The ESBL producer was defined as an organism showing an increase in the zone diameter of ≥ 5 mm for either cefotaxime or ceftazidime with clavulanic acid versus that without clavulanic acid (CTC confirmatory test, CZC confirmatory test, respectively).

Results: The ESBL-positive rates were 34.8% in *K.*

pneumoniae, 9.3% in *K. oxytoca*, 8.4% in *E. coli*, and 6.5% in *P. mirabilis*. Among the ESBL-positive organisms, the detection rates of ESBL CTC and CZC confirmatory tests were as follows: 91.3% vs 68.7% in *K. pneumoniae*, 96.3% vs 44.4% in *K. oxytoca*, 94.8% vs 45.4% in *E. coli*, and 100% vs 20% in *P. mirabilis*. ESBL-producing *K. pneumoniae* had shown a continuously increasing trend from 24.3% in 2001 to 46.4% in 2006.

Conclusion: Both of the ESBL confirmatory tests should be simultaneously tested for the accurate detection of ESBL-producing *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, and *P. mirabilis*. In addition, an active infection control approach is needed for ESBL-producing *K. pneumoniae*. (Korean J Clin Microbiol 2007; 10:119-122)

Key Words: Extended-spectrum β -lactamase, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*

서 론

최근 들어 국내외를 막론하고 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성 균종의 급격한 증가로 인하여 치료 약제를 선택하는 데 커다란 문제가 되고 있다[1]. 이에 따라 진단검사의학과에서는 ESBL 균주를 신속하고 정확하게 검출할 필요성이 높아지고 있다. 그러나 ESBL 생성 균주 중에는 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)의 감수성검사서에서 ceftazidime, cefotaxime, aztreonam 등과 같은 oxymino- 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 항균제감수성 검사만으로는 ESBL 생성 균주를 검출하기에는 미흡하다[2,3]. ESBL 균주를 검출하는 방법으로는 여러 가지가 있으며, 검사법의 선택은 각 병원의 여건이나 감수성 시험 방법에 따라 달라질 수 있을 것이다[4-6]. CLSI는 1999년에 *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*와 *Escherichia coli* 균종을 대상으로 ESBL의 디스크 억제대 지름 및 최소억제농도에 따른 선별과 확인 검사법을 제시하였고, 2006년에는 *Proteus mirabilis*를 추가하였다[7,8].

본 조사에서는 CLSI의 ESBL 디스크 확산법에 의한 확인법으로 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*와 *P. mirabilis*의 연도별 ESBL 양성률 추이를 살펴보았다.

Received 20 August, 2007, Accepted 20 September, 2007

Correspondence: Young Uh, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, 162, Ilsan-dong, Wonju 220-701, Korea. (Tel) 82-33-741-1592, (Fax) 82-33-731-0506, (E-mail) u931018@yonsei.ac.kr

Table 1. Comparison of CLSI ESBL confirmatory tests in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis*

Organisms	No. of isolates	No. (%) positivity according to ESBL tests			
		Total	CTC+CZC-	CTC-CZC+	CTC+CZC+
<i>K. pneumoniae</i>	2,054	715 (34.8)	224 (31.3)	62 (8.7)	429 (60.0)
<i>K. oxytoca</i>	290	27 (9.3)	15 (55.6)	1 (3.7)	11 (40.7)
<i>E. coli</i>	3,012	253 (8.4)	138 (54.5)	13 (5.1)	102 (40.3)
<i>P. mirabilis</i>	155	10 (6.5)	8 (80.0)	0 (0)	2 (20.0)
Total	5,511	1,391 (15.3)	523 (37.6)	127 (9.1)	741 (53.3)

Abbreviations: CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; CTC, cefotaxime/clavulanic acid; CZC, ceftazidime/clavulanic acid; CTC+CZC-, positive in CTC ESBL confirmatory test; CTC-CZC+, positive in CZC ESBL confirmatory test; CTC+CZC+, positive in CTC and CZC ESBL confirmatory tests.

Table 2. Isolation rates of ESBL-positive strains among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis* by year

Year	% (No.) of ESBL-positive strains by organisms			
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
2001	24.3 (61/251)	16.7 (6/36)	3.3 (15/457)	6.9 (2/29)
2002	23.2 (63/272)	6.1 (2/33)	9.9 (43/433)	0 (0/25)
2003	29.7 (84/283)	9.4 (5/53)	6.4 (27/425)	0 (0/20)
2004	36.5 (133/364)	11.6 (5/43)	6.2 (30/482)	11.8 (2/17)
2005	37.8 (158/418)	10.2 (6/59)	8.7 (50/575)	12.1 (4/33)
2006	46.4 (216/466)	4.5 (3/66)	13.8 (88/639)	6.5 (2/31)

재료 및 방법

2001년 4월부터 2007년 3월까지 6년간 원주기독병원(종합요양의료기관)의 임상검체에서 분리된 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*와 *P. mirabilis*를 대상으로 동일 환자에서 반복하여 분리되는 균주는 제외하고 처음 분리된 5,511 균주를 대상으로 균종별 ESBL 양성률을 분석하였다. 장내세균의 동정은 microplate 동정법[9]을 이용하였으며, 항균제감수성검사는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 디스크확산법을 사용하였다[8]. CLSI의 디스크확산법에 의한 ESBL 확인법은 cefotaxime (30 μ g, BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD., USA), ceftazidime (BBL, 30 μ g), ceftazidime/clavulanic acid (CZC; BBL, 30/10 μ g) 및 cefotaxime/clavulanic acid (CTC; BBL, 30/10 μ g)의 억제대 지름을 측정 후 cefotaxime 억제대 지름보다 CTC의 억제대 지름이 5 mm 이상 증가하거나(이하 "ESBL CTC 확인시험"으로 표현함) 또는 ceftazidime 억제대 지름보다 CZC의 억제대가 5 mm 이상 증가하면(이하 "ESBL CZC 확인시험"으로 표현함) ESBL 생성 균주로 판정하였다[8].

결과

CLSI 디스크확산법에 의한 ESBL 확인검사서 *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* 및 *P. mirabilis*의 양성률은 각각 34.8%, 9.3%, 8.4% 및 6.5%였다. ESBL 생성 균주의 ESBL CTC 및 CZC 확인시험의 양성률은 *K. pneumoniae*가 91.3%와 68.7%, *K. oxytoca*는 96.3%와 44.4%, *E. coli*는 94.8%와 45.4%, *P. mirabilis*는 100%와 20%였다(Table 1).

연도별 ESBL 양성률은 *K. pneumoniae*가 2001년의 24.3%에서 2006년의 46.4%로 지속적으로 증가하는 경향을 보인 반면, *K. oxytoca*, *E. coli* 및 *P. mirabilis*는 증감이 반복되었다(Table 2).

고찰

임상검사실에서 시행하는 항균제감수성검사는 균종의 약제별 clinical breakpoint를 기준으로 감수성과 내성을 구분한다. 그러나 ESBL을 생성하는 균종은 extended-spectrum cephalosporins로 분류되는 3세대와 4세대 cephalosporins와 monobactam 등을 가수분해하므로 이러한 균주들은 carbapenem제나

cephamycin제를 제외한 모든 β -lactam제에 내성으로 보고해야 하지만, 각 약제의 최소억제농도는 효소의 종류에 따라 다르기 때문에 CLSI의 extended-spectrum cephalosporins 및 aztreonam에 대한 디스크 확산법에서 내성을 나타내지 않는 경우가 있다 [7,8]. 그러므로 진단검사의학과에서는 ESBL 생성 균종을 정확하고 신속하게 검출하는 검사법이 필요하다.

ESBL 균주를 검출하는 방법은 선별검사로 3세대 cephalosporins, aztreonam 등을 이용하여 선별기준이 되는 억제대 지름이나 최소억제농도를 측정하는 방법[8]과 확인 검사로 clavulanic acid에 의해 ESBL 활성이 억제되는 것을 이용하는 Vitek ESBL 시험[4], E-test[6], 이중 또는 3차원 디스크 확산법 [5], 분자유전학적 방법[5] 등이 있으며, CLSI에서는 디스크 확산법과 액체배지희석법에서 clavulanic acid의 첨가에 의한 억제대 또는 최소억제농도(MIC)의 증가를 확인하는 것이 참고방법이다[8].

CLSI의 디스크확산법에 의한 ESBL 확인검사의 검출률은 보고자에 따라서 신과 손[10] 및 이[11]는 CTC 확인시험의 검출률이 높았고, M'Zali 등[6]과 이 등[12]은 CZC 확인시험 검출률이 높은 것으로 보고하였다. 본 조사에서는 이전의 연구[13]와 마찬가지로 *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 CTC 확인시험의 검출률이 높았으며, 본 조사에서 추가로 분석한 *K. oxytoca*와 *P. mirabilis*의 ESBL 검출도 CTC 확인시험이 CZC 확인시험보다 검출률이 높았다. ESBL을 생성하는 균주 중에는 ESBL 표현형을 유지하면서 β -lactamase 억제제에도 내성을 갖는 TEM의 복합 변이주(CMT, complex mutant of TEM)에 속하는 것도 있고[14], CTX-M type의 β -lactamases는 clavulanic acid보다 tazobactam에 억제가 더 잘되므로 이러한 균주들에서는 ESBL을 검출하기가 어려울 수 있다[15]. 또한 β -lactamase 억제제에 억제가 안 되는 AmpC type β -lactamase와 ESBL을 동시에 생성하는 균주에서도 ESBL을 검출하기가 어렵다[16]. 최근 송 등 [17]은 boronic acid를 이용하여 AmpC type β -lactamase와 ESBL을 동시에 검출하는 방법을 제안한 바 있다. 이와 같은 결과로 볼 때 디스크확산법으로 ESBL을 검출할 때는 두 종류의 확인 시험을 병행해야 하며, 병원 검사실간 ESBL 확인시험에 따른 양성률 차이를 규명하기 위해서는 전국적인 ESBL 검출에 관련된 정도관리 사업이 필요할 것으로 생각되었다. 또한 디스크확산법에 의한 ESBL 검출법의 위음성 요인을 다각적으로 연구하여 보다 정확한 검출방법의 확립이 필요하다고 생각되었다.

참 고 문 헌

- Lee H, Kim CK, Lee J, Lee SH, Ahn JY, Hong SG, et al. Antimicrobial resistance of clinically important bacteria isolated from 12 hospitals in Korea in 2005 and 2006. Korean J Clin Microbiol 2007;10:56-69.
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
- 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.
- 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.
- Bedenic B, Randegger C, Boras A, Haechler H. Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. J Chemother 2001;13:24-33.
- 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.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. NCCLS document M7-A4. NCCLS, Wayne, PA., 1999.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S9, Wayne, PA., 2001.
- Uh Y, Son JS, Hwang GY, Jang IH, Yoon KJ, Seo DM. Microplate identification system of *Enterobacteriaceae*. Korean J Clin Microbiol 1999;2:135-43.
- Shin KS and Son BR. Comparison of Vitek ESBL test and other methods for detecting extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. Korean J Clin Pathol 2002;22:21-6.
- Lee MH. Comparison of MicroScan and Vitek ESBL test with NCCLS ESBL confirmatory test. Korean J Clin Microbiol 2003; 6:41-6.
- Yi K, Kang JO, Kim KS, Choi TY. Evaluation of the VITEK 2 advanced expert system to detect extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Korean J Clin Microbiol 2002;5:15-20.
- Hwang GY, Uh Y, Kim HJ, Jang IH, Yoon KJ. Comparison of detection methods of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Korean J Clin Microbiol 2001;4:62-6.
- Robin F, Delmas J, Schweitzer C, Tournilhac O, Lesens O, Chanal C, et al. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a single patient. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1304-9.
- Uh Y, Kim HY, et al. eds. Antimicrobial agents and antimicrobial susceptibility test. 1st ed, Paju; KIS, 2007:118-9.
- Song W, Lee KM, Kim HS, Kim JS, Kim J, Jeong SH, et al. Clonal spread of both oxyimino-cephalosporin- and cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates co-producing SHV-2a and DHA-1 β -lactamase at a burns intensive care unit. Int J Antimicrob Agents 2006;28:520-4.
- Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum β -lactamases by using boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2007;45:1180-4.

=국문초록=

Extended Spectrum β -Lactamase를 생성하는 *Escherichia coli*, *Klebsiella* species 및 *Proteus mirabilis*의 분리빈도

연세대학교 원주의과대학 ¹진단검사의학과, ²감염내과

어 영¹, 황규열¹, 권오건¹, 윤갑준¹, 김효열²

배경: Extended spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 세균은 감수성검사에서 oxyimino- β -lactam 계열 약물에 감수성을 보일 수 있으나 임상적으로는 효과가 없기 때문에 ESBL 생성 균주의 정확한 검출은 매우 중요하다. 또한 ESBL 생성 균주의 분리 추이의 지속적인 조사는 항균제 사용 지침과 병원감염관리의 방향을 설정하는 데도 필수적이다.

방법: 2001년 4월부터 2007년 3월까지 6년간 임상검체에서 분리된 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* 및 *Proteus mirabilis* 5,511 균주를 대상으로 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 extended spectrum β -lactamase (ESBL) 디스크확인시험에 따라 cefotaxime과 cefotaxime/clavulanic acid (CTC), ceftazidime과 ceftazidime/clavulanic acid (CZC)의 억제대를 비교하여(각각 CTC 확인시험, CZC 확인시험) 한 가지라도 clavulanic acid에 의해 5 mm 이상 억제대가 증가되는 균종을 ESBL 양성으로 정의하였다.

결과: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*와 *P. mirabilis*의 양성률은 각각 34.8%, 9.3%, 8.4% 및 6.5%였다. ESBL 양성 균주의 ESBL CTC 및 CZC 확인시험의 양성률은 *K. pneumoniae*가 91.3%와 68.7%, *K. oxytoca*는 96.3%와 44.4%, *E. coli*는 94.8%와 45.4%, *P. mirabilis*는 100%와 20%였다. *K. pneumoniae*는 2001년의 24.3%에서 2006년의 46.4%로 ESBL 양성률이 지속적으로 증가하였다.

결론: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*와 *P. mirabilis*의 ESBL을 검출하기 위해서는 두 종류의 ESBL 확인시험을 병행해야 하며, ESBL 생성 *K. pneumoniae*에 대한 적극적인 감염관리대책이 필요할 것으로 생각되었다. [대한임상미생물학회지 2007;10:119-122]

교신저자 : 어 영, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주기독병원 진단검사의학과
Tel: 033-741-1592, Fax: 033-731-0506
E-mail: u931018@yonsei.ac.kr