

Use of Boronic Acid Disks for the Detection of Extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis*

Soon Deok Park¹, Young Uh¹, In Ho Jang¹, 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 organisms producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase is very important for treatment of patients. However, unlike the ESBL confirmatory test, there are no guidelines for detection of organisms producing AmpC β -lactamase. We evaluated a detection method using boronic acid (BA) for ESBL and AmpC β -lactamase.

Methods: Clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Proteus mirabilis* showing intermediate resistance or resistance to cefoxitin (FOX) or positive for ESBL were tested. A ≥ 5 mm increase in zone diameter of ceftazidime/clavulanic acid/BA (CAZ/CA/BA) and/or cefotaxime/clavulanic acid/BA (CTX/CA/BA) versus CAZ/BA and/or CTX /BA was considered positive for ESBL. Likewise, a ≥ 5 mm increase in zone diameter of FOX/BA and/or cefotetan/BA (CTT/BA) versus FOX and/or CTT alone was considered positive for AmpC β -lactamase.

Results: Among 622 clinical isolates, ESBL positive rates by the CLSI ESBL confirmatory test or by the BA method were 18.1% or 18.4% for *E. coli*, 38.3% or 40.4% for *K. pneumoniae*, 8.7% or 8.7% for *K. oxytoca*, and 14.8% or 14.8% for *P. mirabilis*, respectively. AmpC β -lactamase positive rates using the BA method were 3.7% for *E. coli*, 33.3% for *K. pneumoniae*, 0% for *K. oxytoca*, and 7.4% for *P. mirabilis*. The detection rates of coproducing ESBL and AmpC β -lactamase were 2.4% in *E. coli* 27.1% in *K. pneumoniae*, and 3.7% in *P. mirabilis*.

Conclusion: The ESBL confirmatory method using BA was found to enhance the detection of ESBLs, even when potentially masked by AmpC β -lactamase. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:24-29)

Key Words: Extended-spectrum β -lactamase, Plasmid-mediated AmpC β -lactamase, Boronic acid, Coproducers

서 론

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 장내세균은 항균제감수성검사에서 penicillins, cephalosporins와 aztreonam에 감수성 결과를 보여도 임상적으로 치료효과가 없기 때문에 임상검사실에서는 ESBLs를 생성하는지를 확인한 후 항균제감수성 결과를 보고해야 한다[1]. 또한 최근에는 cephamycins를 가수분해하고 β -lactamase 억제제에 억제되지 않으며 4세대 cephalosporins에 감수성인 플라스미드 매개성 AmpC β -lactamase를 생성하는 장내세균이 증가하는 추세에 있어 항균제 선택에 어려움을 더하고 있다. 더욱이 ESBL과 AmpC

β -lactamase를 동시에 생성하는 장내세균일 경우에는 ESBL 선별 및 확진검사에서 ESBL 활성이 AmpC β -lactamase에 의해 억제되어 위음성 결과를 초래할 수 있기 때문에 치료 항균제 선택에 오류를 유도할 위험이 있다. AmpC β -lactamase를 검출하는 표준방법은 제안되지 않고 있으며, 현재까지 주로 연구된 three-dimensional extract test, cefoxitin Hodge test, AmpC disk test 등의 AmpC β -lactamase 검출법들은 판독이 어렵고 시험하기가 불편하며 해석이 주관적인 단점이 있다. 1982년에 boronic acid가 AmpC 효소의 가역적인 억제제로 보고된[2] 이후 boronic acid를 이용한 AmpC β -lactamase 검출법의 효용성에 대한 연구가 있어 왔고[3-5], 국내에서는 Song 등[6,7]이 boronic acid와 clavulanic acid를 이용하여 AmpC β -lactamase와 ESBLs 동시 생성 균주의 검출법을 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서는 디스크 확산법에 의한 ESBL 확진법에 boronic acid를 병용하여 AmpC β -lactamase와 ESBLs 검사를 동시에 검사할 수 있는 방법을 개발하였다. 이 방법으로 *Kle-*

Received 5 August, 2008, Revised 2 September, 2008
Accepted 20 October, 2008

Correspondence: Soon Deok Park, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, 162, Ilsan-dong, Wonju 220-701, Korea. (Tel) 82-33-741-1578, (Fax) 82-33-731-0506, (E-mail) mizpark66@empal.com

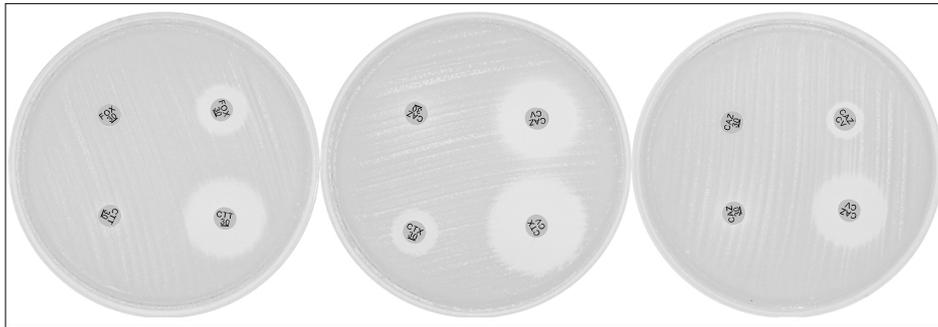


Fig. 1. Representative results using the Clinical and Laboratory Standards Institute extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test and AmpC disk test without and with boronic acid (two disks positioned in right side on media). Abbreviations: FOX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; CV, clavulanic acid; CTX, cefotaxime; CTX, cefotaxime. Left media shows AmpC positive, center media shows ESBL positive, and right media shows that isolate is negative in CLSI method and positive in boronic acid disk.

bsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* 및 *Proteus mirabilis*를 대상으로 각 균종들의 ESBL과 AmpC β -lactamase의 생성 빈도 및 두 효소를 동시에 생성하는 균주의 비율을 조사하였다.

재료 및 방법

2008년 1월부터 5월까지 원주기독병원 진단검사의학과에 배양이 의뢰된 임상검체에서 분리된 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*와 *P. mirabilis* 622균주의 항균제감수성검사서에서 cefoxitin 내성 또는 중간내성을 보이거나 ESBL 확진시험에서 양성을 보인 200균주를 대상으로 ESBL과 AmpC β -lactamase 검출을 위하여 Boronic acid로 추가 검사하였다. 동일 환자에서 반복하여 분리된 균주는 제외하였다.

장내세균의 동정은 microplate 동정법[8]을 이용하였으며 ESBL 확진시험을 포함한 항균제감수성검사는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)[9]의 디스크 확산법을 사용하였다. 항균제디스크는 BBL 사(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) 또는 Oxoid 사(Oxoid Ltd., UK)의 제품을 이용하였다.

Boronic acid를 이용한 ESBL과 AmpC β -lactamase 검출은 Coudron 등[4]의 방법에 따랐다. 즉, boronic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액은 120 mg phenylboronic acid를 3 mL dimethyl sulfoxide로 녹인 후 여기에 3 mL 멸균 증류수를 넣어 제조하였고, 이 용액 20 μ L를 ceftazidime (30 μ g, CAZ), cefotaxime (30 μ g, CTX), ceftaxime (FOX), cefotetan (CTT), ceftazidime/clavulanic acid (30/10 μ g, CAZ/CA)와 cefotaxime/clavulanic acid (30/10 μ g, CTX/CA) 디스크에 분주하여 60분 정도 말린 후 즉시 사용하거나 4°C 냉장고에 공기가 들어가지 않게 보관하였다. Boronic acid 디스크 검사는 CLSI 방법대로 균액을 Mueller-Hinton agar plate에 접종한 뒤 boronic acid (BA)가

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

Organisms (No. of isolates)	CLSI ESBL test		
	CTX/CLA vs. CTX	CAZ/CLA vs. CAZ	CTX/CLA vs. CTX and/or CAZ/CLA vs. CAZ
<i>E. coli</i> (332)	58 (96.7)	35 (58.3)	60 (18.1)
<i>K. pneumoniae</i> (240)	90 (97.8)	57 (62.0)	92 (38.3)
<i>K. oxytoca</i> (23)	2 (100)	1 (50)	2 (8.7)
<i>P. mirabilis</i> (27)	4 (100)	1 (33.3)	4 (14.8)
Total (622)	154 (24.8)	94 (15.1)	158 (25.4)

Abbreviations: CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; CTX, cefotaxime; CLA, clavulanic acid; CAZ, ceftazidime.

함유된 디스크와 BA가 없는 디스크를 배지에 올려놓은 후 35°C에서 하룻밤 배양하였다. 결과 판독은 CAZ/CA/BA의 억제대 지름에서 CAZ/BA의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이거나 CTX/CA/BA의 억제대 지름에서 CTX/BA의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이면 ESBL로 확정하고, FOX/BA의 억제대 지름에서 FOX의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이거나 CTT/BA의 억제대 지름에서 CTT의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이면 AmpC β -lactamase 생성 균주로 판정하였다[7] (Fig. 1). ESBL과 AmpC β -lactamase 검출법이 모두 양성이면 ESBL과 AmpC β -lactamase 동시 생성 균주로 판정하였다.

결 과

총 622균주를 대상으로 CLSI ESBL 확진검사로 확인한 균종

Table 2. Comparative results in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *P. mirabilis* by combination with the boronic acid

Organisms (No.)	No. (%) of positive results in AmpC test with boronic acid			No. (%) of positive results in ESBL test with boronic acid		
	FOX/BA vs. FOX	CTT/BA vs. CTT	FOX/BA vs. FOX and/or CTT/BA vs. CTT	CTX/CLA/BA vs. CTX/BA	CAZ/CLA/BA vs. CAZ/BA	CTX/CLA/BA vs. CTX/BA and/or CAZ/CLA/BA vs. CAZ/BA
<i>E. coli</i> (332)	5	11	12 (3.7)	55	35	61 (18.4)
<i>K. pneumoniae</i> (240)	59	77	80 (33.3)	94	86	97 (40.4)
<i>K. oxytoca</i> (23)	0	0	0 (0)	2	1	2 (8.7)
<i>P. mirabilis</i> (27)	1	2	2 (7.4)	4	1	4 (14.8)
Total (622)	65	90	94 (15.1)	155	123	164 (26.4)

Abbreviations: FOX, cefoxitin; BA, boronic acid; CTT, cefotetan; others, see Table 1.

Table 3. Prevalence of AmpC and ESBL in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *P. mirabilis* by combination with the boronic acid

Organisms	No. of isolates with			
	AmpC and no ESBL	ESBL and no AmpC	AmpC and ESBL	No AmpC and no ESBL
<i>E. coli</i> (332)	4	53	8	267
<i>K. pneumoniae</i> (240)	15	32	65	128
<i>K. oxytoca</i> (23)	0	2	0	21
<i>P. mirabilis</i> (27)	1	3	1	22
Total (622)	20	90	74	438

Abbreviation: ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

별 ESBL 양성률은 *E. coli* 18.1%, *K. pneumoniae* 38.3%, *K. oxytoca* 8.7%, *P. mirabilis* 14.8%였고 전체적으로는 158균주 (25.4%)가 양성을 보였으며, CTX 디스크를 이용한 방법이 CAZ 디스크를 이용한 방법보다 양성률이 높았다(Table 1). Boronic acid를 첨가한 ESBL 검출법에서는 *E. coli* 18.4%, *K. pneumoniae* 40.4%, *K. oxytoca* 8.7%, *P. mirabilis* 14.8%의 양성률을 보였으며 CAZ보다 CTX 디스크에서 양성률이 높았다. Boronic acid를 이용한 AmpC 검사에서 AmpC 양성률은 균종별로 *E. coli* 3.7%, *K. pneumoniae* 33.3%, *K. oxytoca* 0%, *P. mirabilis* 7.4%였고 FOX보다 CTT에서 양성률이 높았다(Table 2). 균종별로 AmpC와 ESBL의 동시 생성 균종의 비율은 *E. coli* 2.4%, *K. pneumoniae* 27.1%, *K. oxytoca* 0%, *P. mirabilis* 3.7%였다(Table 3). 항균제 감수성 시험을 살펴보면 AmpC만 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 FOX에 모두 내성이었고 cefepime (FEP로 약함)에는 모두 감수성이었으며, CTX, CAZ, aztreonam (ATM), cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam에는 20~100%의 감수성을 보였다. ESBL만 생성하는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*는 CTT에는 모두 감수성이었고, FOX에

대한 감수성을 살펴보면 *E. coli*는 60.4%, *K. pneumoniae*는 75.0%였으며, FEP에 대한 감수성을 살펴보면 *E. coli*는 39.6%, *K. pneumoniae*는 56.3%였다. AmpC와 ESBL을 동시에 생성하는 *E. coli*는 FOX와 FEP에 감수성인 균주가 없었고, AmpC와 ESBL을 동시 생성하는 *K. pneumoniae*는 FOX와 FEP에 3.1%와 36.9%가 감수성이었으며 ATM, CTX와 CAZ 항균제에 모두 내성이었다. 시험한 622균주 모두 imipenem에 감수성이었다(Table 4).

고찰

ESBL을 생성하는 균종은 extended-spectrum cephalosporins로 분류되는 3세대와 4세대 cephalosporins와 monobactam 등으로 구분되므로 이러한 균주들은 carbapenem제나 cephamycin제를 제외한 모든 β -lactam제에 내성으로 보고해야 한다. 그러나 ESBL을 생성하는 균종의 extended-spectrum cephalosporins에 대한 억제별 최소억제농도는 효소의 종류에 따라 다르기 때문에 CLSI의 extended-spectrum cephalosporins 및 aztreonam에 대한 디스크 확산법에서 내성을 나타내지 않는 경우가 있다. 그러므로 진단검사의학과에서는 ESBL 생성 균종을 정확하고 신속하게 검출하는 검사법이 필요하다. 현재 ESBL 균주를 검출하는 방법으로 CLSI에서는 디스크 확산법과 액체배지희석법에서 clavulanic acid의 첨가에 의한 억제대 또는 최소억제농도(MIC)의 증가를 확인하는 것이 참고 방법이다.

최근 *Escherichia*와 *Klebsiella* spp.에서 플라스미드 매개성 AmpC β -lactamase 생성균주의 문제점이 증가하고 있는데 이는 ESBL과는 달리 β -lactamase 억제제에 억제가 되지 않으며 플라스미드에서 기인한 유도성 내성유전자가 염색체 유전자에 전이되기도 하고[10-12] 이러한 유전자를 가지고 있는 플라스미드는 다른 장내세균들에 확산될 수도 있으며[13-15] 병원 내 감염으로도 확산될 수 있다[16,17]. 특히 하나의 균종에서

Table 4. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *P. mirabilis* according to the presence of AmpC and/or ESBL

Organisms (No.)	% susceptible to antimicrobial agents															
	SXT	CIP	AMK	GM	TOB	MAN	CFS	PPT	ATM	CTX	CAZ	FEP	FOX	CTT	IPM	
AmpC and non-ESBL																
<i>E. coli</i> (4)	50	75	75	50	50	25	100	75	50	50	75	100	0	50	100	
<i>K. pneumoniae</i> (15)	53.3	33.3	20	40	20	20	66.7	66.7	73.3	60	20	100	0	26.7	100	
ESBL and non-AmpC																
<i>E. coli</i> (53)	34	18.9	81.8	50.9	37.7	1.9	60.4	66.0	30.2	1.9	58.5	39.6	60.4	100	100	
<i>K. pneumoniae</i> (32)	34.4	18.8	46.9	56.3	28.1	0	53.1	43.8	9.4	0	12.5	56.3	75.0	100	100	
AmpC and ESBL																
<i>E. coli</i> (8)	12.5	0	75.0	12.5	12.5	0	75.0	75.0	0	0	12.5	0	0	25.0	100	
<i>K. pneumoniae</i> (65)	27.7	4.6	16.9	7.7	15.4	0	40.0	18.5	0	0	0	36.9	3.1	15.4	100	
Non-AmpC and non-ESBL																
<i>E. coli</i> (267)	100	74.2	97.8	82.0	85.0	97.3	97.8	95.9	98.1	97.4	98.1	98.1	97.8	NT	100	
<i>K. pneumoniae</i> (128)	100	95.3	96.1	100	93.8	97.7	99.2	100	100	100	100	100	98.4	NT	100	
<i>K. oxytoca</i> (21)	100	95.2	100	97.7	95.2	95.2	95.2	95.2	100	95.2	95.2	95.2	95.2	NT	100	
<i>P. mirabilis</i> (22)	54.5	81.8	100	81.8	95.5	95.5	100	100	100	95.5	100	100	95.5	NT	100	

Abbreviations: ESBL, extended-spectrum β -lactamase; SXT, cotrimoxazole; CIP, ciprofloxacin; AMK, amikacin; GM, gentamicin; TOB, tobramycin; MAN, cefamandole; CFS, cefoperazone/sulbactam; PPT, piperacillin/tazobactam; ATM, aztreonam; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; FOX, ceftaxitin; CTT, cefotetan; IPM, imipenem.

ESBL과 플라스미드 매개성 AmpC β -lactamase를 동시 생성할 때에는 환자의 진단이나 치료에도 많은 제한을 줄 수 있다. AmpC β -lactamase (AmpC로 약함) 생성 균주의 분리율이 최근 증가하는 추세에 있으나[18] 이를 검출하는 표준 방법이 없는 상태이다. 임상미생물 검사실에서 AmpC 생성 균주의 검출이 중요함을 인지하여 이를 검사하고자 하더라도 어떤 검출법을 적용해야 할지 혼란스러울 수 있다. AmpC를 검출하는 방법으로 3-dimensional test는 기술적으로 매우 복잡하고 검사에 소요되는 시간이 길어[4] 통상적으로 임상 검사실에서 시행하기에는 부적당하다. Cefoxitin-Hodge test[19]와 AmpC disk test[20]는 간단하고 편리하며 플라스미드 매개성 AmpC 검출에는 정확도가 높으나 결과 해석이 매우 어렵다. PCR 분석은 β -lactamase 유전자의 동정과 분류에 있어서 만족할 만한 결과를 가져다 줄 수 있고 AmpC multiplex PCR은 AmpC 검출을 위한 연구방법으로서의 효용성은 높지만 임상 검사실에서 통상적으로 사용하기에는 어렵다[21]. 최근에는 AmpC 억제제인 BA를 첨가한 디스크를 이용한 검출법이 ESBL 검출방법과 가장 유사한 방법으로서 간단하면서도 정확도가 높은 검사라는 보고가 많다[3-7]. BA 디스크를 이용한 검출법은 AmpC 효소가 ESBL 검출을 방해함에도 불구하고 ESBL과 AmpC 효소를 동시에 생성하는 균주들의 검출률을 높일 수 있는 장점이 있다[4,7]. 본 연구에서 BA를 이용한 ESBL 검출법은 기존의 디스크 확산법에 의한 ESBL 확진시험보다 검출률이 *E. coli* 0.3%, *K. pneumoniae* 2.1% 향상되었으며, ESBL과 AmpC를 동시에 생성하는 균주도 검출할 수 있었다. 본 연구에서 ESBL과 AmpC를 동시에 생성하는 균주의 비율은 11.9%로 Song 등[6]의 8.7%보다 높았다. 또한 ESBL 검출법을 사용하면 AmpC 때

문에 기존의 ESBL 검출법에서 ESBL이 검출되지 않았던 균주에서도 BA를 이용한 방법에서는 ESBL 생성을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 플라스미드 매개성 KPC 효소와 같은 class A carbapenemases는 clavulanic acid에 양성으로 반응해서 ESBL 생성 균주로 위양성을 나타낼 수도 있으나[22] 우리나라에서 KPC 효소를 생성하는 균주는 보고된 바가 없다[7].

Song 등[6]은 ESBL 검출을 위하여 높은 민감도와 특이도를 가지는 방법으로 ceftazidime/clavulanic acid/BA (CAZ/CA/BA)와 cefotaxime/CA/BA (CTX/CA/BA) 양쪽검사에서 3 mm 이상의 증가를 보일 때 ESBL로 확진하는 판정 기준을 제안하였고, BA를 이용한 방법은 AmpC 때문에 가려지는 ESBL 생성 균주의 검출을 높일 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 3 mm 증가를 기준으로 ESBL 검출률을 분석하여 보았으나 억제제 지름 증가폭이 적어 판독 오차의 가능성이 있었다. Jeong 등[23]은 염색체성 AmpC를 생성하는 *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*에서도 CAZ/CA/BA와 CTX/CA/BA 양쪽 검사에서 5 mm 증가를 보일 때를 ESBL 판정기준으로 하면 98.4%를 검출할 수 있었으며 위양성은 없다고 보고하였다.

결론적으로 ESBL과 AmpC 검출을 위한 BA 디스크 검사 방법은 통상적으로 임상미생물 검사실에서 사용하기에 간편한 방법이고 ESBL과 AmpC를 동시에 생성하는 균종도 검출이 가능하며 잠재적으로 AmpC에 가려진 ESBL 검출이 가능하였다. 추후 분자유전학적 검사의 추가로 확진 검사의 필요성을 느꼈다. 이 방법은 각 병원의 ESBL과 AmpC 생성 균종의 빈도와 검사실 여건 등에 따라 효율적으로 적용한다면 적절한 항균제 선택에 많은 도움을 줄 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Uh Y, Kim HY, et al. eds. Antimicrobial Agents and Antimicrobial Susceptibility Test. 1st ed. Paju; KIS, 2007:118-9.
- Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al. The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. *Biochem J* 1983;209:229-33.
- Brenwald NP, Jevons G, Andrews J, Ang L, Fraise P. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:600-1.
- Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000;38:1791-6.
- Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005;43:2551-8.
- 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.
- Song W, Jeong SH, Kim JS, Kim HS, Shin DH, Roh KH, et al. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:315-8.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement. Document M100-S16. Wayne, PA; CLSI, 2006.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:221-4.
- Queenan AM, Jenkins S, Bush K. Cloning and biochemical characterization of FOX-5, an AmpC-type plasmid-encoded β -lactamase from a New York City *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3189-94.
- Walther-Rasmussen J and Høiby N. Plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Can J Microbiol* 2002;48:479-93.
- Bauernfeind A, Hohl P, Schneider I, Jungwirth R, Frei R. *Escherichia coli* producing a cephamycinase (CMY-2) from a patient from the Libyan-Tunisian border region. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:168-70.
- Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003;41:772-7.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:563-9.
- Nadjar D, Rouveau M, Verdet C, Donay L, Herrmann J, Lagrange PH, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type β -lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;187:35-40.
- Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4163-7.
- Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, et al. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:219-24.
- Lee K, Hong SG, Park YJ, Lee HS, Song W, Jeong J, et al. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC β -lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:319-23.
- Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol* 2005;43:3110-3.
- Pérez-Pérez FJ and Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153-62.
- Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:711-4.
- Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS, Bae IK, et al. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:467-71.

=국문초록=

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*와 *Proteus mirabilis*에서 Boronic Acid Disk를 이용한 Extended-spectrum β -lactamase와 AmpC β -lactamase 검출

연세대학교 원주의과대학 원주기독병원 ¹진단검사의학과, ²감염내과

박순덕¹, 어 영¹, 장인호¹, 권오건¹, 윤갑준¹, 김효열²

배경: Extended spectrum β -lactamase (ESBL)와 AmpC β -lactamase를 생성하는 균종의 정확한 검출은 환자의 치료에 매우 중요하다. 그러나 ESBL 검출법과는 달리 AmpC β -lactamase는 표준화된 검출 방법이 없다. 본 연구에서는 boronic acid를 이용한 ESBL과 AmpC β -lactamase 검출법을 평가하였다.

방법: Cefoxitin 중간내성이거나 내성 또는 ESBL 시험에서 양성을 보인 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*와 *Proteus mirabilis* 균종을 대상으로 하였다. ESBL 생성은 ceftazidime/clavulanic acid/boronic acid (CAZ/CA/BA)의 억제대 지름에서 CAZ/BA의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이거나 cefotaxime/clavulanic acid/boronic acid (CTX/CA/BA)의 억제대 지름에서 CTX/BA의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이면 ESBL로 판정하고, cefoxitin/boronic acid (FOX/BA)의 억제대 지름에서 FOX의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이거나 cefotetan/boronic acid (CTT/BA)의 억제대 지름에서 CTT의 억제대 지름을 뺀 값이 5 mm 이상이면 AmpC β -lactamase 생성 균주로 판정하였다.

결과: 총 622 균주로 CLSI ESBL 확진검사를 시행한 결과, 균종별 ESBL 양성률은 *E. coli* 18.1%, *K. pneumoniae* 38.3%, *K. oxytoca* 8.7%, *P. mirabilis* 14.8%였고, boronic acid를 이용한 ESBL 검출법으로 측정된 ESBL 양성률은 *E. coli* 18.4%, *K. pneumoniae* 40.4%, *K. oxytoca* 8.7%, *P. mirabilis* 14.8%였다. Boronic acid를 이용한 AmpC 검출 양성률은 *E. coli* 3.7%, *K. pneumoniae* 33.3%, *K. oxytoca* 0%, *P. mirabilis* 7.4%였고 균종별로 ESBL과 AmpC를 동시에 생성하는 균의 비율은 *E. coli* 2.4%, *K. pneumoniae* 27.1%, *P. mirabilis* 3.7%였다.

결론: Boronic acid를 이용한 ESBL 확진법은 ESBLs 검출력을 높일 수 있었고 AmpC에 의해 가려져 있는 ESBLs도 검출할 수 있었다. [대한임상미생물학회지 2009;12:24-29]

교신저자 : 박순덕, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주기독병원 진단검사의학과
Tel: 033-741-1578, Fax: 033-731-0506
E-mail: mizpark66@empal.com