

Strategies for Interpretive Standards of β -Lactams Susceptibility Testing and Identification of Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*

Yeon-Joon Park¹, Wonkeun Song²

Department of Laboratory Medicine, ¹College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul,
²Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) have recently revised the susceptibility interpretive criteria of oxyimino- β -lactams and carbapenems for *Enterobacteriaceae*. According to the new criteria, susceptibility testing results are sufficient to detect extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases; it is not necessary to perform ESBL or carbapenemase detection tests for therapeutic purposes. Thus, it has been recommended that these related tests be performed only for infection control. These changes in the susceptibility guidelines are supported by some clinical cases and the results of pharmacodynamic and animal studies. However, differences still exist between the breakpoints established by the CLSI and EUCAST with regard to some oxyimino- β -lactam and carbapenem antibiotics, in particular, the breakpoints for ceftazidime and cefepime established by the CLSI are higher than

those established by the EUCAST. Also, similar numbers of successful and unsuccessful cases have been reported regarding the use of cephalosporins or carbapenems in treating infections caused by low-minimal inhibitory concentration (MIC) ESBL-producers or low-MIC carbapenemase-producers. Finally, routine susceptibility test methods are not as accurate as research-purpose test methods, showing differences in MICs ranging approximately from 1 to 8 μ g/mL. In conclusion, it is strategically prudent to continue to perform ESBL and carbapenemase detection tests and to avoid the use of the corresponding antimicrobial agents for the treatment of ESBL- or carbapenemase-producing bacterial infections. (Ann Clin Microbiol 2013;16:111-119)

Key Words: β -Lactams, Carbapenemase, *Enterobacteriaceae*, Extended-spectrum β -lactamases, Microbial sensitivity tests

INTRODUCTION

2010년 이전까지 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서는 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)가 *Enterobacteriaceae*에 대한 cephalosporin제의 감수성을 저하시키기 때문에 ESBL 검출시험을 시행하여 ESBL 양성인 균주는 감수성시험 결과와 관계없이 모든 cephalosporin제를 내성으로 보고하라고 하였으며 carbapenem에 대한 감수성이 저하된 *Enterobacteriaceae*는 carbapenemase 생성을 검출하기 위하여 modified Hodge 시험(MHT)을 시행할 것을 권고하였다[1].

그러나, 최근에는 CLSI와 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)에서 일부 oxyimino- β -

lactam제와 carbapenem제의 감수성기준을 변경하면서 새로운 지침을 채택하였다[2,3]. 즉, 새롭게 변경된 감수성기준을 적용하면 ESBL 생성이나 carbapenemase 생성 여부와 관계없이 oxyimino- β -lactam제나 carbapenem제에 대하여 감수성시험 결과대로 보고하면 되고, ESBL 검출시험이나 carbapenemase 검출시험은 치료 목적으로는 시행할 필요가 없고 역학 또는 감염 관리 목적으로만 시행하면 된다고 하였다.

이에 현재까지 개발된 ESBL과 carbapenemase 검출시험법에 대하여 알아보고 *Enterobacteriaceae*에 대한 새로운 감수성기준과 지침의 적절성 여부를 분석하여 국내의 현실에 적합한 전략을 제시하고자 한다.

Received 11 June, 2013, Revised 3 July, 2013, Accepted 3 July, 2013

Correspondence: Wonkeun Song, Department of Laboratory Medicine, Kangnam Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, 948-1, Daerim 1-dong, Youngdeungpo-gu, Seoul 150-950, Korea. (Tel) 82-2-829-5259, (Fax) 82-2-847-2403, (E-mail) swonkeun@hallym.or.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ESBL PHENOTYPIC TEST

1. Double disk synergy (DDS) 시험

DDS 시험은 amoxicillin-clavulanate와 각각의 cefotaxime, ceftazidime, cefpodoxime, cefepime 또는 aztreonam 디스크 사이에서 억제대의 증가현상(potentiation, synergy)이 나타나면 ESBL 생성균주로 판정하는 시험이다[4]. 저렴하고 간편하게 시행할 수 있으며 모든 세균을 대상으로 시행할 수 있는 장점이 있으나 균종이나 β -lactamase의 종류에 따라 두 디스크 간의 적절한 간격이 다르고 판독이 검사자의 주관적인 판단에 의해 이뤄지기 때문에 객관성이 떨어지는 것이 단점이다.

2. CLSI ESBL 확진시험

디스크법을 이용한 CLSI 확진시험은 cefotaxime-clavulanate 또는 ceftazidime-clavulanate 디스크의 억제대가 각각의 cefotaxime 또는 ceftazidime 디스크의 억제대에 비해 5 mm 이상 증가하면 ESBL 생성균주로 판정하는 시험이다. 액체배지 미량 희석법을 이용한 CLSI 확진시험은 cefotaxime-clavulanate의 minimal inhibitory concentration (MIC)이 cefotaxime의 MIC 보다 3 희석배수 이상 낮거나 ceftazidime-clavulanate의 MIC가 ceftazidime의 MIC 보다 3배 이상 낮으면 ESBL 생성균주로 판정한다. 감수성시험 자동화장비들은 대부분 이 원리를 이용하여 ESBL을 검출하고 있다. 간편하게 시행할 수 있으며 판정기준이 정해져 있어서 검사자가 객관적인 판정을 할 수 있다는 장점이 있으나 *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*에 대해서만 검사가 가능하다[2].

3. AmpC β -lactamase 억제제 함유 ESBL 디스크시험

ESBL과 AmpC β -lactamase (AmpC)를 함께 생성하는 균주는 DDS 시험이나 CLSI ESBL 확진시험에서 ESBL 위음성을 보일 수 있다. 이는 clavulanate에 의한 ESBL 억제를 AmpC가 저해할 수 있기 때문이다[5]. 이를 보완할 수 있는 방법으로 CLSI 디스크 확진시험에 사용하는 항생제 디스크인 cefotaxime, ceftazidime, cefotaxime-clavulanate, ceftazidime-clavulanate에 AmpC 억제제인 phenylboronic acid나 cloxacillin을 첨가하여 CLSI 확진시험과 같은 방법과 판정기준을 적용하면 ESBL과 AmpC를 동시에 생성하는 *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*에서도 ESBL을 대부분 검출할 수 있을 뿐만 아니라 AmpC를 선천적으로 갖고 있는 *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* 등에서도 ESBL 생성을 정확히 검출할 수 있다[6-8].

CARBAPENEMASE PHENOTYPIC TEST

국내의 경우, 최근 들어 imipenem이나 meropenem 등의 car-

bapenem제에도 내성인 *Acinetobacter baumannii*가 중환자실을 중심으로 급격하게 증가하고 있으며 아직은 드물지만 carbapenemase 생성 *Enterobacteriaceae* (CPE)의 보고도 점차 증가하고 있다. 이러한 세균들은 β -lactam제는 물론, fluoroquinolone 제, aminoglycoside제, trimethoprim-sulfamethoxazole 등에도 내성을 보여 환자의 치료와 감염관리에 커다란 문제가 되고 있다. 특히, 이 세균에 의한 중증감염은 사망률과 이환율이 매우 높다[9].

이동성 내성유전자에 의해 carbapenem제에 내성을 일으키는 대표적인 β -lactamase인 carbapenemase는 amino acid 서열에 따라 Ambler class A (serine carbapenemases), class B (metallo- β -lactamase, MBL), class D (OXA carbapenemases)로 나뉜다. Class A는 염색체성인 NmcA, Sme, IMI-1, SFC가 있고 plasmid성인 KPC, IMI-2, GES-5 등이 있다[10]. Class A에서는 KPC가 가장 흔하며 1996년에 미국 동부에서 처음 발견된 이후 수년만에 전세계적으로 전파되었다[11]. 국내는 아직 매우 드물지만 몇 예가 보고된 바 있다[12,13]. Class B는 VIM과 IMP가 흔하고 최근에는 NDM이 급속히 증가하고 있다[14]. 일본에서 보고된 IMP-1 생성 *S. marcescens*가 최초의 MBL 생성균주였고[15], 한국에서는 SIM 형이 보고된 바가 있다[16]. Class D에는 OXA, PSE가 있고 OXA-48과 관련된 새로운 변종들이 계속 나타나고 있다[10,17]. 현재 CPE는 plasmid에 의해 발현되는 KPC (class A), VIM과 NDM (class B), OXA-48 (class D) 등이 가장 흔하다. AmpC 또는 CTX-M ESBL 생성에 porin 결손이 동반되는 경우에도 carbapenem MIC를 증가시킬 수 있으며 국내에서 분리되는 carbapenem 내성 *Enterobacteriaceae* (CRE)의 대부분이 AmpC 생성과 porin 결손이 동반된 경우이다[18-20].

최근 주요 다제내성 그람음성균인 다제내성 *Pseudomonas aeruginosa* (MRPA), 다제내성 *A. baumannii* (MRAB), CRE에 의한 감염이 methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*, vancomycin 내성 *S. aureus*, vancomycin 내성 *Enterococcus* 감염과 함께 의료관련감염증으로 지정되었고, 일부 carbapenemase 검출시험이 보험에 등재되면서 carbapenemase 검출시험의 필요성이 증대되고 있다.

Carbapenemase 표현형 시험에는 carbapenemase의 생성 여부를 검출하는 MHT와 Carba NP 시험 등이 있으며 carbapenemase의 type (class A, B, D)을 감별할 수 있는 Carba NP II 시험과 carbapenemase 억제시험 등이 있다(Table 1).

1. Modified hodge 시험

MHT는 CLSI 지침에 따라서 0.5 McFarland에 맞춘 *E. coli* ATCC 25922 균액을 Mueller-Hinton 배지에 바르고 meropenem (또는 ertapenem) 디스크를 놓은 후, 대상 균집락을 따서 디스크 끝부분에서 바깥쪽으로 긁는다. 35±2°C, 대기환경에

Table 1. Interpretation of carbapenemase phenotypic tests

Test	Carbapenemase			AmpC with porin loss	ESBL with porin loss
	Class A	Class B	Class D		
Modified hodge	+	+	+	+/-	+/-
Carba NP	+	+	+	-	-
Carba NP II					
Imipenem+tazobactam	-	+	+	-	-
Imipenem+EDTA	+	-	+	-	-
Carbapenemase inhibition					
Meropenem±PBA	+	-	-	+/-	-
Meropenem±CLX	-	-	-	+/-	-
Meropenem±DPA	-	+	-	-	-

Abbreviations: EDTA, ethylene diamine tetra-acetic acid; PBA, phenylboronic acid; CLX, cloxacillin; DPA, dipicolinic acid.

서 16-20시간 배양한 후 대상균주를 그은 부위의 균성장이 증가되면 carbapenemase 양성으로 판정한다[2]. CTX-M ESBL 또는 AmpC 생성과 porin 결손이 동반된 carbapenem 비감수성 균주도 간혹 위양성을 보일 수 있고[21], 일부 NDM-1 생성균 주 등은 위음성을 보이기도 한다[22].

2. Carba NP 및 Carba NP II 시험

Carba NP 시험 방법은 다음과 같다. 1.5 mL tube에 100 μ L의 20 mM Tris-HCl lysis buffer를 넣고 대상 균 집락을 따서 이 tube에 넣어 섞는다. 세균이 용해되도록 실온에 30분 방치한 후 10,000 g으로 5분간 원심분리한다. 각 검사 균주당 96 well microplate의 2개의 well (solution A, 100 μ L; solution A+imipenem 3 mg/mL, 100 μ L)을 이용한다. 원심분리한 tube의 상층액 30 μ L를 1번 well과 2번 well에 각각 분주하고 pipette을 이용하여 섞는다. 37°C에 최대 2시간 동안 배양 후 색의 변화를 판정한다. 1번 well과 2번 well이 모두 빨강색이면 carbapenemase 음성, 1번 well이 빨강색이고 2번 well이 오렌지색 또는 노랑색이면 carbapenemase 양성, 1번 well과 2번 well이 모두 노랑색이면 판독 불가로 판정한다. Solution A는 2 mL의 0.5% (wt/vol) phenol red solution과 16.6 mL 멸균증류수를 섞은 용액에 1N NaOH 용액을 한 방울씩 첨가하여 pH 7.8로 맞춘 후 최종농도가 0.1 mM 이 되도록 180 μ L의 10 mM ZnSO₄를 넣어서 제조한다. Carba NP 시험은 KPC, MBL, OXA 생성 *Enterobacteriaceae*와 MBL 생성 *P. aeruginosa*에 모두 양성을 보이고 AmpC 생성과 porin 결손이 동반된 *Enterobacteriaceae*는 모두 음성을 보여 MHT에서와 같은 혼한 위음성과 위양성이 거의 없는 검사로 알려져 있다. MHT는 하룻밤 배양이 필요하나 이 검사는 2시간 정도의 배양 후 결과를 알 수 있는 신속한 검사이다. Carba NP 시험이 100%의 예민도와 100%의 특이도를 보였다는 보고가 있다[23].

Carba NP II 시험은 carbapenemase의 생성 여부와 carbapenemase type을 동시에 검출할 수 있는 검사법으로 각 검사 균주당 96 well microplate의 4개의 well (solution A well, solution

A+imipenem well, solution A+imipenem+tazobactam well, solution A+imipenem+EDTA well)을 이용하여 Carba NP 시험과 같은 방법으로 시행한다. Solution A+imipenem well과 solution A+imipenem+EDTA well이 양성이면 class A carbapenemase로, solution A+imipenem well과 solution A+imipenem+tazobactam well이 양성이면 class B carbapenemase로, solution A+imipenem well, solution A+imipenem+tazobactam well, solution A+imipenem+EDTA well이 모두 양성이면 class D carbapenemase로 판정한다. Carba NP II 시험도 100%의 예민도와 100%의 특이도를 보였다고 하였다[24].

3. Carbapenemase 억제시험

Carbapenemase 억제시험은 carbapenem제에 특정 carbapenemase 억제제를 추가하여 carbapenemase의 활성을 억제하는 원리를 이용한 검사이다. Class A carbapenemase의 검출을 위해서는 phenylboronic acid를, class B carbapenemase (MBL)의 검출을 위해서는 EDTA나 dipicolinic acid를 억제제로 이용한다. Carbapenemase 억제시험은 meropenem 디스크의 억제대 보다 carbapenemase 억제제를 혼합한 meropenem 디스크의 억제대가 증가(4-5 mm 이상)하는지를 보는 combination 디스크 시험이다[25,26]. 예를 들어 class A carbapenemase인 KPC 생성 *K. pneumoniae*는 combination 디스크 시험에서 phenylboronic acid를 첨가한 meropenem 디스크의 억제대가 5 mm 이상 증가한다. Class B carbapenemase인 VIM 생성 *P. aeruginosa*와 NDM-1 생성 *K. pneumoniae*는 combination 디스크 시험에서 dipicolinic acid를 첨가한 meropenem 디스크의 억제대가 5 mm 이상 증가한다. AmpC 생성과 porin 결손이 동반된 *K. pneumoniae*는 combination 디스크 시험에서 phenylboronic acid를 첨가한 meropenem 디스크와 cloxacillin을 첨가한 meropenem 디스크의 억제대가 5 mm 이상 증가한다. 이 외에도 MBL 생성 여부를 검출할 수 있는 상품화된 Etest MBL strip (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) 등이 있다.

Table 2. Old and new interpretative standards for *Enterobacteriaceae*

Organization		Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)										
		Old					New					
		CTX CRO	CAZ ATM	FEP	IPM MPM	EPM	CTX CRO	CAZ ATM	FEP	IPM MPM	EPM	DPM
CLSI	S \leq	8	8	8	4	2	1	4	8	1	0.5	1
	R \geq	64	32	32	16	8	4	16	32	4	1	4
EUCAST	S \leq	1	1	1	2	0.5	1	1	1	2	0.5	1
	R \geq	4	16	16	16	2	4	8	8	16	2	8

Abbreviations: CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MPM, meropenem; EPM, ertapenem; DPM, doripenem; S, susceptible; R, resistant.

NEW INTERPRETIVE STANDARDS AND GUIDELINES OF CEPHALOSPORINS, AZTREONAM, AND CARBAPENEM SUSCEPTIBILITY TESTING

CLSI는 약동학, 약력학, 임상치료효과, MIC 분포 등을 분석하여 일부 cephalosporin제(cefazolin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftazidime)와 aztreonam 및 carbapenem제(ertapenem, imipenem, meropenem)의 감수성시험 해석기준을 2010-2011년에 변경하였다(Table 2). 이 기준을 적용하면 위의 항균제에 대한 감수성시험 결과를 ESBL이나 carbapenemase 생성 여부와 관계없이 그대로 보고하기 때문에 감수성시험 결과 보고를 위한 ESBL 검출시험은 더 이상 필요 없다고 하였다. 단, moxalactam, cefonicid, cefamandole, cefoperazone에 대해서는 아직 평가가 이뤄지지 않았기 때문에 *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.에 대하여 이 약제의 감수성시험을 할 때는 ESBL 검출시험을 같이 시행하여 ESBL 양성이 나오면 내성으로 보고해야 한다고 하였다. MHT도 역학 또는 감염관리 목적으로만 시행하도록 하였다. Carbapenem제의 MIC나 억제대가 중간 범위에 속하는 균주에 의한 감염시에는 carbapenem제를 최대 용량으로 투여하거나 정맥주사 사용기간을 연장하라고 하였다. 변경된 carbapenem제 감수성기준을 적용할 때는 다음을 주의해야 한다고 하였다. 첫째, carbapenem제의 MIC나 억제대가 중간 범위에 속하는 균주 감염에 대한 carbapenem제 치료의 임상적 효과는 불확실하다. 둘째, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp.의 imipenem MIC는 meropenem이나 doripenem의 MIC보다 높은 경향을 보인다(MIC가 중간 또는 내성을 보임). 이 균종들은 carbapenemase 이외의 기전에 의해서 MIC가 증가할 수 있다[2].

EUCAST에서는 EUCAST에서 정한 *Enterobacteriaceae*에 대한 cephalosporin제와 carbapenem제의 감수성기준을 따르면 ESBL, plasmid-mediated AmpC, carbapenemase를 포함한 임상적으로 중요한 내성기전을 모두 검출할 수 있다고 하였다

(Table 2). 일부 균주는 3, 4세대 cephalosporin제 또는 carbapenem제에 감수성이나 중간을 보일 수 있으나 검사 결과대로 보고하고 ESBL과 carbapenemase 검출시험은 감염관리 목적으로만 시행하라고 하였다. ESBL 생성 *Enterobacteriaceae* (EPE) 또는 CPE가 각각의 cephalosporin제 또는 carbapenem제에 감수성을 보여도 검사 결과대로 보고하라고 하였다. Imipenem은 *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp.에서 저농도 내성이 흔하다고 하였다[27].

1. 새로운 감수성기준과 지침의 근거

새로운 감수성기준과 지침의 근거는 첫째, 약동학 모델 연구에 의하면 cephalosporin제의 breakpoint를 1-4 $\mu\text{g/mL}$ 로 줄여도 cephalosporin의 혈청농도가 MIC 이상으로 유지된다고 하였고[28], 둘째, 동물실험에서 MIC가 같은 EPE 감염과 비 EPE 감염의 예후에 차이가 없었고 MIC가 더 중요한 예후인자라는 것을 입증했다는 점[29], 셋째, cephalosporin 감수성 EPE 감염의 치료 실패에 대한 이전의 많은 보고들이 8-16 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보였던 균주의 감염으로 이 균주는 새로 개정된 기준에 의하면 감수성이 아니라는 것이다[30]. Carbapenem MIC와 CPE 감염의 관계도 이와 유사하여, carbapenem MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 미만인 경우에는 VIM 생성 *K. pneumoniae* 혈류감염이나 carbapenemase 음성 *K. pneumoniae* 혈류감염의 사망률에 차이가 없었으나 MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었던 VIM 양성 *Klebsiella* 혈류감염의 사망률은 42.9%로 급격히 증가하였다는 보고가 있다[31]. 특히 약하게 활성화된 β -lactamase 생성균주감염은 치료실패의 주요인자가 될 수 없다는 것이 확실하며 1세대 cephalosporin은 전형적인 TEM β -lactamase에 의해 파괴될 수 있지만 이 효소생성균에 의한 요로감염에는 여전히 광범위한 효과가 있다[32]. 더군다나 전형적인 β -lactamase와 광범위 β -lactamase의 경계가 불분명하다. 예를 들어 TEM-12는 ceftazidime에 큰 영향을 주지만 cefotaxime과 ceftriaxone에 대해서는 1-2 희석배수 만큼의 MIC (0.03 $\mu\text{g/mL}$ →0.06-0.12 $\mu\text{g/mL}$)만을 증가시킬 뿐이다[33]. 이와 같이 약한 EPE에 대해서까지 일괄적으로

cefotaxime과 ceftriaxone에 내성이라고 규정하는 것은 문제가 있다.

2. 새로운 지침의 문제점

*Enterobacteriaceae*에 대하여 ESBL과 carbapenemase 검출시험을 하지 않고 감수성 기준에 의한 결과만으로 치료를 결정한다는 지침은 3가지 중요한 문제점이 있다.

첫째, CLSI와 EUCAST의 일부 oxyimino- β -lactam제와 carbapenem제의 감수성기준에 차이가 큰 편이다. 2012년 국내 30개 병원에서 수집한 282주의 ESBL 생성 *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대하여 cefotaxime, ceftazidime, cefepime의 MIC를 한천 희석법으로 측정한 결과, 새로운 CLSI 기준을 적용하였을 때 cefotaxime은 대부분의 균주가 MIC 4 μ g/mL 이상으로 내성이었으나, ceftazidime은 *E. coli*의 39.7%, *K. pneumoniae*의 6.0%가 감수성이었고, cefepime은 *E. coli*의 62.1%, *K. pneumoniae*의 43.4%가 감수성이었다(Fig. 1, 미발표 자료). Song 등[34]의 연구에서도 국내에서 분리된 94주의 ESBL 또는 AmpC 생성 *Enterobacteriaceae* 중, 새로운 CLSI/EUCAST 기준에 의한 ceftazidime, aztreonam, cefepime, imipenem의 감수성률이 각각 27.7%/8.5%, 39.4%/14.9%, 75.5%/33.0%, 80.9%/95.7%로 나타

나 큰 차이를 보였다.

둘째, MIC가 낮은 EPE 또는 CPE에 의한 감염에 cephalosporin제나 carbapenem제로 치료하는 것이 효과가 있다는 증거가 아직 충분하지 못하다는 것이다. Paterson 등[30]의 연구에 의하면 낮은 MIC (0.5-2 μ g/mL)를 보인 5예의 균혈증 중 2예는 cephalosporin 치료에 실패하였고 3예는 성공하였다. MIC가 0.5 μ g/mL였던 2예 중 한 예는 cephalosporin 치료에 성공하였고 한 예는 실패하였다. 그리고 cephalosporin MIC가 0.5-4 μ g/mL인 여러 예들이 cephalosporin 치료에 실패하였다. 즉, MIC가 낮을수록 치료 성공률은 증가하지만 EPE의 낮은 MIC가 치료성공의 명확한 지표는 아니라는 것을 알 수 있다.

CTX-M 생성균주에 대한 ceftazidime 치료효과도 다양한 결과를 보인다. Bin 등[35]은 중국에서 발생한 7예의 MIC 0.5-8 μ g/mL인 CTX-M 생성 *K. pneumoniae* 균혈증이 모두 ceftazidime에 성공적으로 치료됐다고 보고하였다. 반면에 Ho 등[36]은 ceftazidime 디스크에 18 mm 이상의 억제대를 보인 7예의 ESBL 생성 *E. coli* 감염에서 4예는 ceftazidime 치료에 실패하였고 이 중 3예는 사망하였다고 하였다. 이 7예 중 6예가 CTX-M-9 또는 CTX-M-14였고 Etest로 측정한 ceftazidime의 MIC는 0.06-1 μ g/mL였다. 치료에 실패한 예 중 3예는 ceftazidime

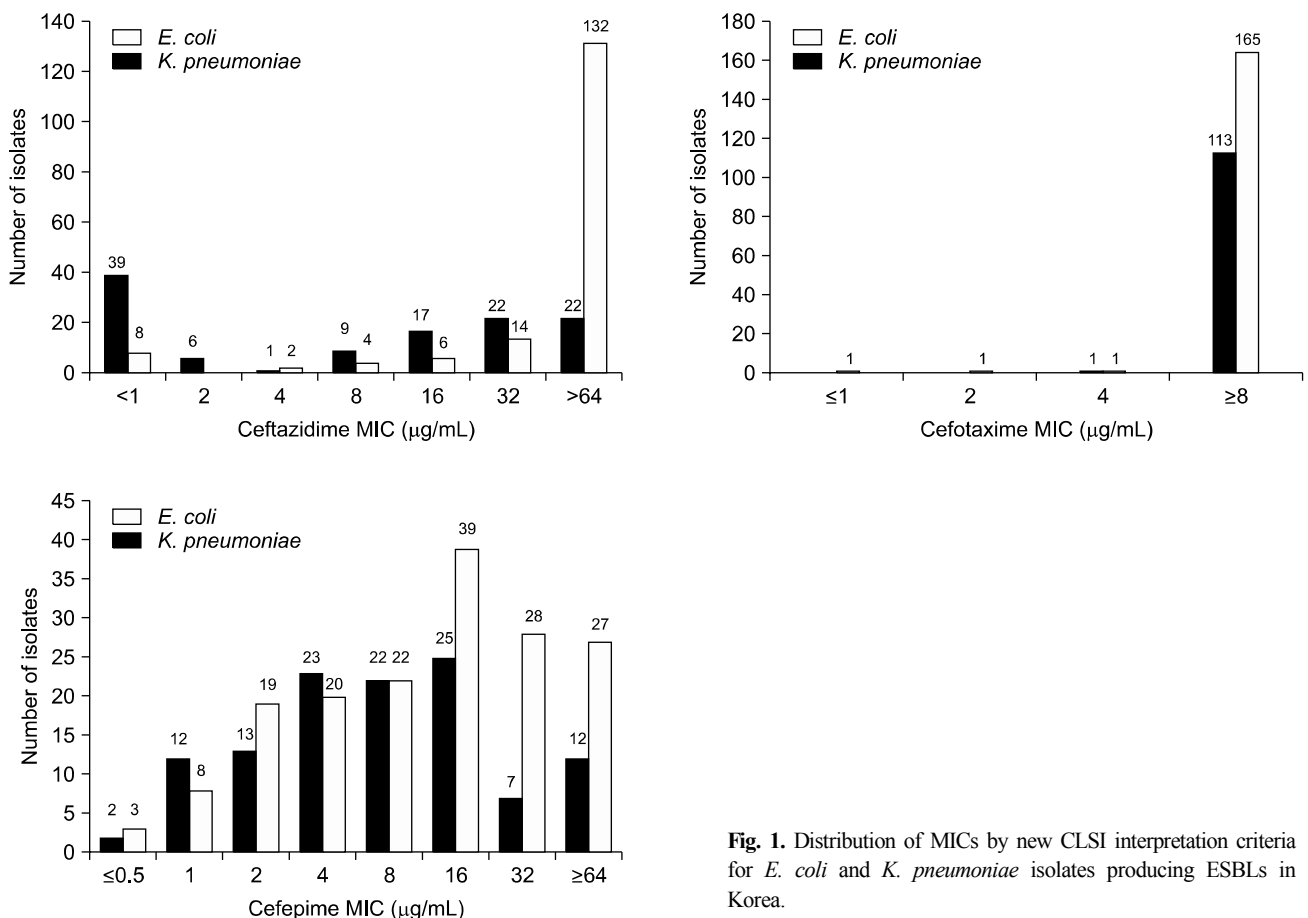


Fig. 1. Distribution of MICs by new CLSI interpretation criteria for *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates producing ESBLs in Korea.

MIC가 0.75-1 $\mu\text{g/mL}$ 였고 치료에 성공했던 예 중 3에는 0.06-0.5 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 따라서 MIC가 치료 효과와 관련이 있음을 나타냄과 동시에 ceftazidime의 감수성기준이 EUCAST 또는 특히 CLSI에서 주장하는 것보다 더 낮아야 한다는 것을 의미하기도 하며 낮은 MIC를 보이는 CTX-M 균주감염에 ceftazidime을 사용할 수 있다는 확신을 할 수 없게 한다.

Carbapenem과 CPE에 대해서도 아직 데이터가 부족하나 같은 문제점이 있다. Daikos 등[31]은 VIM 생성 *K. pneumoniae* 균혈증의 치료효과를 구분하는데 carbapenem MIC 4 $\mu\text{g/mL}$ 를 제시하였으나, Weisenberg 등[37]이 KPC 생성 *K. pneumoniae*의 다양한 연구 결과를 분석한 결과에 의하면, MIC 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 같은 구분점은 없다고 하였다. 또한 carbapenemase 생성이 의심되는 경우에는 carbapenemase 검출시험을 시행하는 것이 더 확실하며 carbapenemase 양성인 경우에는 최대한 주의해서 carbapenem을 사용해야 하며 특히 carbapenem 단독치료를 피해야 한다고 하였다.

셋째, 통상적으로 시행하는 감수성시험법은 감수성/중간/내성을 정확히 구분할 수 있는 검사법이 아니다. 통상적으로 시행하는 감수성시험의 MIC가 정확하다는 전제하에 ESBL 또는 carbapenemase 검출 없이 감수성시험 결과만으로 치료 약제를 선택할 수 있다는 견해가 가능하다고 할 수 있다. 대부분의 임상미생물검사실에서는 자동화장비나 디스크법을 이용해 감수성시험을 하고 있다. 일반적으로 정도관리균주의 MIC가 기준치의 4-8배(2-3 회석배수) 범위 내에 있으면 적합으로 판정한다[38]. 따라서 *Enterobacteriaceae*에 대한 cephalosporin MIC의 경우, 확실한 감수성 범위인 0.06-0.25 $\mu\text{g/mL}$ 인 균주에 비해 1-4 $\mu\text{g/mL}$ 인 경우는 감수성 결과를 그대로 보고하는 것이 부정확할 수 있다.

국내에서 분리된 262주의 EPE를 대상으로 Vitek 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA)와 MicroScan (Siemens, West Sacramento, CA, USA) 자동화장비의 cefotaxime, ceftazidime, cefepime MIC를 한천희석법과 비교한 결과, 특히 ceftazidime과 cefepime에 대한 일치율(categorical agreement)이 매우 낮았다(미발표 자료). 영국의 4개 검사실에 TEM-10 ceftazidimase 생성 *E. coli* NCTC 13352 균주를 보내 디스크법으로 항균제 당 10회 검사를 시행하였다. 모든 검사실에서 ceftazidime 내성을 보였으나 cefotaxime은 감수성과 중간 결과가 다양하게 나타났다고 cefepime은 중간과 내성이 다양하게 나타났다[32].

CPE의 감수성시험 결과는 더 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 11주의 KPC 생성 *K. pneumoniae*에 대한 Vitek 2와 Etest의 MIC 결과가 모두 일치하지 않았다는 보고가 있었고[37], KPC 생성 *K. pneumoniae*에 대한 Vitek 2와 전통적인 방법을 이용한 meropenem MIC 일치도가 23%에 불과하였다[39]. 5주의 VIM 생성 *K. pneumoniae*에 대해서도 액체배지 미량희석법에 의한 imipenem MIC는 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 였으나 Vitek 2에서

는 8- ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ 였고 Phoenix에서는 ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ 를 보여 많은 차이를 보였다[40]. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) 한천희석법으로 imipenem 8 $\mu\text{g/mL}$, meropenem 16 $\mu\text{g/mL}$ 인 *K. pneumoniae* 0555 (세계적 유행균주인 KPC 생성 *K. pneumoniae* ST258)를 이용하여 영국의 여러 기관에서 자동화장비로 시험한 MIC 결과는 매우 다양하여, imipenem 0.5- ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, meropenem 0.25- ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. BSAC법으로 시험한 경우에서도 56기관 중 38기관이 imipenem 감수성, 117개 기관 중 10기관이 meropenem 감수성이었다[41,42]. 이와 같이 세계적인 유행균주들이 carbapenem 제에 매우 다양한 감수성시험 결과를 보이게 되어 감수성시험 결과로 인해 부적절한 치료가 우려된다. 이러한 부정확성을 고려할 때, ESBL이나 carbapenemase 검출은 반드시 필요하며 이 효소가 검출된 경우에는 치료에도 반영을 해야 한다.

REPORTING OF ESBL AND CARBAPENEMASE DETECTION TESTS

*Enterobacteriaceae*에 대한 감수성시험을 한 다음에 ESBL 의심균주에 대하여 ESBL 검출시험을 하게 되면 추가로 하부가 더 길리게 된다. 특히 중증감염환자인 경우는 이로 인해 치료가 늦어져 경과가 나빠질 수 있다[43, 44]. 따라서 ESBL 검출시험이 감수성시험과 동시에 이뤄지는 것이 좋다. 이미 자동화장비에서는 ESBL 검출시험이 동시에 이뤄지고 있다. 디스크법을 사용하는 검사실에서는 감수성시험을 할 때 ceftazidime과 cefotaxime 디스크 사이에 amoxicillin-clavulanate를 놓는거나 combination 디스크를 함께 사용하는 것이 좋다. Cephalosporin 비감수성을 검출하는 상품화된 배지를 이용하여 검체에서 바로 신속하게 검출할 수도 있다. 단, 이 배지는 ESBL 뿐만 아니라 AmpC나 carbapenemase 생성균주도 자랄 수 있다.

2010년 이전의 CLSI 기준을 적용하여 MIC법(자동화장비 등) 또는 디스크확산법으로 감수성시험을 시행하는 경우에는 ESBL 검출시험을 시행하여 양성이 나오면 cephalosporin제(cephamycin제는 제외)와 aztreonam은 감수성 시험 결과와 상관없이 모두 내성으로 보고해야 한다. 2010년 또는 그 이후의 CLSI 기준을 적용하여 MIC법(자동화장비 등) 또는 디스크확산법으로 감수성시험을 시행하는 경우에는 ESBL 검출시험을 시행하되 그 결과와 상관없이 cephalosporin제와 aztreonam의 감수성시험 결과를 그대로 보고하고, ESBL 양성인 경우에는 “EPE에 대한 cephalosporin제와 aztreonam의 치료 효과는 불확실하다.”는 내용을 보고서에 추가하는 것이 적절할 것이다.

CPE의 carbapenem제에 대한 감수성 결과도 CLSI 또는 EUCAST의 감수성 판정기준에 따라 보고한다. 2010년 이전의 CLSI 기준을 적용하여 MIC법 또는 디스크확산법으로 감수성시험을 시행하는 경우에는 carbapenemase 검출시험을 시행하

여 양성이 나오면 carbapenem제는 감수성 시험 결과와 상관없이 모두 내성으로 보고해야 한다. 2010년 또는 그 이후의 CLSI 기준을 적용하여 MIC법 또는 디스크확산법으로 감수성시험을 시행하는 경우에는 carbapenemase 검출시험을 시행하되 그 결과와 상관없이 carbapenem제의 감수성시험 결과를 그대로 보고한다. 그러나 carbapenemase 유전자를 갖고 있으면서 carbapenem제에 감수성을 보이는 균주의 임상적 의의는 아직 불확실하므로 “carbapenem제 감수성인 CPE는 carbapenem제에 대한 치료효과 불확실하며 carbapenem제의 단독치료는 삼가한다.”는 내용을 보고서에 추가하는 것이 적절할 것이다.

DISCUSSION

CLSI와 EUCAST의 *Enterobacteriaceae*에 대한 새로운 지침에서 권장하는 “ESBL이나 carbapenemase 생성여부와는 관계없이 oxyimino- β -lactam제 또는 carbapenem제를 감수성시험 결과대로 보고하고 ESBL 검출시험이나 carbapenemase 검출시험은 감염관리 목적으로만 시행한다”는 지침은 첫째, CLSI와 EUCAST의 일부 항균제에 대한 감수성기준이 차이가 크고, 둘째, 아직 임상적 치료효과에 대한 데이터가 불분명하고, 셋째, 통상적인 감수성시험법이 정확도가 높지 않은 검사라는 점에 서 문제가 있다.

낮은 MIC를 보이는 CPE 감염은 아직 MIC와 치료효과에 대한 임상적 데이터가 부족하고, 치료 실패 후에 다음으로 사용할 수 있는 확실한 항균제가 아직 없기 때문에 carbapenem 사용에 세심한 주의가 필요하다.

ACKNOWLEDGMENTS

이 연구는 2012년 대한임상미생물학회의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

이 연구에 대한 자문을 해주신 연세의대 세브란스병원 이경원 교수님, 이화의대 이대목동병원 이미애 교수님, 성균관의대 삼성서울병원 이남용 교수님, 울산의대 서울아산병원 김미나 교수님, 연세의대 강남세브란스병원 정석훈 교수님, 질병관리본부 국립보건연구원 이영선 박사님께 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement. Document M100-S21. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
3. Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 2013;19:141-60.
4. Thomson KS and Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1877-82.
5. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005;43:4163-7.
6. 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 beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;57:315-8.
7. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2007;45:1180-4.
8. Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS, Bae IK, et al. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC beta-lactamases. Int J Antimicrob Agents 2008;31:467-71.
9. Lee K, Kim MN, Kim JS, Hong HL, Kang JO, Shin JH, et al; KONSAR Group. Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009. Yonsei Med J 2011; 52:793-802.
10. Queenan AM and Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58.
11. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009;9:228-36.
12. Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Peck KR, et al. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:2278-9.
13. Roh KH, Lee CK, Sohn JW, Song W, Yong D, Lee K. Isolation of a *Klebsiella pneumoniae* isolate of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Korea. Korean J Lab Med 2011;31:298-301.
14. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18:306-25.
15. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:824-9.
16. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91.
17. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother 2012;67:1597-606.
18. Song W, Suh B, Choi JY, Jeong SH, Jeon EH, Lee YK, et al. In vivo selection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by *OmpK36* loss during meropenem treatment. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65:447-9.

19. Shin SY, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Kim JM, et al. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. J Med Microbiol 2012;61:239-45.
20. Park YJ, Yu JK, Park KG, Park YG, Lee S, Kim SY, et al. Prevalence and contributing factors of nonsusceptibility to imipenem or meropenem in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;71:87-9.
21. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents 2010;36:205-10.
22. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2012;50:477-9.
23. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2012;18:1503-7.
24. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:6437-40.
25. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect 2011;17:552-6.
26. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vroni G, Voulgari E, Koumaki V, et al. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *enterobacteriaceae* clinical isolates. J Clin Microbiol 2011;49:2804-9.
27. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoint v 3.1. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ [Online] (last visited on 1 June 2013).
28. Andes D and Craig WA. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Clin Microbiol Infect 2005;11(Suppl 6):10-7.
29. Maglio D, Ong C, Banevicius MA, Geng Q, Nightingale CH, Nicolau DP. Determination of the in vivo pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* at various inocula. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1941-7.
30. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2001;39:2206-12.
31. Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1868-73.
32. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? J Antimicrob Chemother 2012;67:1569-77.
33. Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol 1994;32:691-6.
34. Song W, Park MJ, Kim HS, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints for beta-lactams in *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases and/or plasmid-mediated Ampc beta-lactamases. Korean J Clin Microbiol 2011;14:24-9.
35. Bin C, Hui W, Renyuan Z, Yongzhong N, Xiuli X, Yingchun X, et al. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;56:351-7.
36. Ho PL, Chan WM, Tsang KW, Wong SS, Young K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes. Scand J Infect Dis 2002;34:567-73.
37. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;64:233-5.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Seventh Edition. Document M7-A7. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
39. Lat A, Clock SA, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, Fauntleroy K, et al. Comparison of polymyxin B, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. J Clin Microbiol 2011;49:1795-8.
40. Giakkoupi P, Tzouveleakis LS, Daikos GL, Miriagou V, Petrikos G, Legakis NJ, et al. Discrepancies and interpretation problems in susceptibility testing of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol 2005;43:494-6.
41. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2011;35:736-55.
42. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3365-70.
43. Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4851-63.
44. Schwaber MJ and Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2007;60:913-20.

=국문초록=

*Enterobacteriaceae*에 대한 β -Lactam제 감수성시험 기준 및 Extended-Spectrum β -Lactamase와 Carbapenemase 검출을 위한 전략

¹가톨릭대학교, ²한림대학교 의과대학 진단검사의학교실

박연준¹, 송원근²

최근 CLSI와 EUCAST에서는 oxyimino- β -lactam제와 carbapenem제의 감수성 기준을 변경하였고 이로 인해 감수성시험 결과만으로 ESBL과 carbapenemase를 검출할 수 있기 때문에 ESBL이나 carbapenemase 검출시험은 치료 목적으로 시행할 필요가 없으며 단지 감염관리 목적으로만 시행할 것을 권고하였다. 여러 임상 증례와 함께 약동학과 동물실험 결과가 이와 같은 감수성지침의 변화를 뒷받침하고 있다. 그러나 CLSI와 EUCAST의 일부 oxyimino- β -lactam제와 carbapenem제의 기준에 차이가 있다. 특히 ceftazidime과 cefepime의 감수성 기준은 CLSI가 EUCAST에 비해 비교적 높게 설정되어 있다. 둘째, MIC가 낮은 ESBL 생성 또는 carbapenemase 생성 *Enterobacteriaceae*에 의한 감염에 cephalosporin제나 carbapenem제로 치료하는 것이 효과가 있다는 증례만큼 치료에 실패했다는 증례가 적지않게 보고되고 있다. 셋째, 일반적으로 시행하는 감수성시험은 연구용 시험에 비해 부정확하여 MIC가 1-8 $\mu\text{g/mL}$ 정도의 차이를 보이게 된다. 결론적으로, ESBL과 carbapenemase 검출시험을 계속 시행하고 ESBL 또는 carbapenemase 생성균주 감염 시 대상 약제의 사용을 피하는 것이 신중한 전략이라고 판단된다. [Ann Clin Microbiol 2013;16:111-119]

교신저자 : 송원근, 150-950, 서울시 영등포구 대림1동 948-1
한림대학교 강남성심병원 진단검사의학과
Tel: 02-829-5259, Fax: 02-847-2403
E-mail: swonkeun@hallym.or.kr