

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0024751 (43) 공개일자 2011년03월09일
(51) Int. Cl. <i>C12N 1/02</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12P 21/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0082877 (22) 출원일자 2009년09월03일 심사청구일자 2009년09월03일	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 (72) 발명자 송원근 서울특별시 영등포구 대림1동 948-1 강남성심병원 진단검사의학과 정석훈 서울특별시 서대문구 신촌동 134 세브란스병원 진 단검사의학과 (뒷면에 계속) (74) 대리인 강성혜	

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 액체배지 미량희석법을 이용한 기질확장성 베타-락타메이즈 또는 Amp C 베타-락타메이즈 탐지방법

(57) 요약

본 발명은 기질확장형 β -락타메이즈(ESBL) 또는 플라스미드 매개 AmpC β -락타메이즈(PABL)를 신속하고 정확하게 분류하고 탐지하는 액체배지 미량희석법에 관한 것이다.

(72) 발명자

김재석

서울특별시 강동구 길동 445 강동성심병원 진단검
사의학과

김한성

경기도 안양시 동안구 평촌동 896 한림대학교 성심
병원 진단검사의학과

이규만

서울특별시 영등포구 영등포동 94-200 한강성심병
원 진단검사의학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 08072항생제140

부처명 식품의약품안전청

연구관리전문기관

연구사업명 용역연구

연구과제명 국내 종합병원을 대상으로 항균제내성 모니터링 및 특성연구

기여율

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2008년 06월 16일 ~ 2009년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

액체배지 미량희석법을 이용하여 기질확장형 β -락타메이즈(ESBL) 생산균주를 탐지하는 방법에 있어서,

- (1) 세포탁심-PABL 저해제 액체배지 대 세포탁심-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- (2) 세프트리지딤-PABL 저해제 액체배지 대 세프트리지딤-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- (3) 아스트레오남-PABL 저해제 액체배지 대 아스트레오남-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- (4) 세페핌-PABL 저해제 액체배지 대 세페핌-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합;
- (5) 세프트리악손(ceftriaxone)-PABL 저해제 액체배지 대 세프트리악손(ceftriaxone)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합; 및
- (6) 세포독심(cefepodoxime)-PABL 저해제 액체배지 대 세포독심(cefepodoxime)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합;중 선택된 1 이상의 조합을 이용하여 기질확장형 β -락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 PABL 저해제는 페닐보론산, 3-아미노페닐보론산을 포함하는 보론산및 클록사실린(cloxacillin) 중에서 선택되는 1종 이상임을 특징으로 하는 기질확장형 β -락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 ESBL 저해제는 클라블란산임을 특징으로 하는 기질확장형 β -락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 액체배지에는 세포탁심, 세프트리지딤, 아스트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone) 또는 세포독심(cefepodoxime)이 각각 0.25 내지 1024 μ g/ml 함유되며, PABL 저해제는 100~500 μ g/ml, ESBL 저해제는 1~10 μ g/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 기질확장형 β -락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

ESBL 저해제와 PABL 저해제를 모두 함유한 액체배지의 최소생육억제농도가 ESBL 저해제를 함유하고 PABL 저해제를 함유하지 않은 액체배지의 최소생육억제농도보다 8배 이상 작은 때 그 세균을 ESBL 생산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 기질확장형 β -락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 6

액체배지 미량희석법을 이용하여 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈(PABL) 생산균주를 탐지하는 방법에 있어서,

- (1) 세포탁심-ESBL 저해제 액체배지 대 세포탁심-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,

- (2) 세프트리지딤-ESBL 저해제 액체배지 대 세프트리지딤-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- (3) 아스트레오남-ESBL 저해제 액체배지 대 아스트레오남-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- (4) 세폭시틴(cefoxitin)-ESBL 저해제 액체배지 대 세폭시틴(cefoxitin)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합 및
- (5) 세포테탄(cefotetan)-ESBL 저해제 액체배지 대 세포테탄(cefotetan)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합; 중 선택된 1 이상의 조합을 이용한 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 PABL 저해제는 페닐보론산, 3-아미노페닐보론산을 포함하는 보론산 및 클록사실린(cloxacillin) 중에서 선택되는 1종 이상임을 특징으로 하는 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 ESBL 저해제는 클라불란산임을 특징으로 하는 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서,

ESBL 저해제와 PABL 저해제를 모두 함유한 액체배지의 최소생육억제농도가 ESBL 저해제를 함유하고 PABL 저해제를 함유하지 않은 액체배지의 최소생육억제농도보다 8배 이상 작은 때 그 세균을 PABL 생산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 10

청구항 6에 있어서,

상기 액체배지에는 세포탁심, 세프트리지딤, 아스트레오남, 세페핌, 세폭시틴(cefoxitin) 또는 세포테탄(cefotetan)이 각각 $0.25\sim 1024\mu\text{g/ml}$ 함유되며, PABL 저해제는 $100\sim 500\mu\text{g/ml}$, ESBL 저해제는 $1\sim 10\mu\text{g/ml}$ 함유되는 것을 특징으로 하는 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈 생산균주 탐지방법.

청구항 11

세포탁심, 세프트리지딤, 아스트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone), 세포독심(cefepodoxime), 세폭시틴(cefoxitin) 및 세포테탄(cefotetan) 중 선택된 1종과 PABL 저해제 및 ESBL 저해제가 함유된 베타-락타메이즈 생산균주 스크리닝용 액체배지.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 액체배지에는 세포탁심, 세프트리지딤, 아스트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone), 세포독심(cefepodoxime), 세폭시틴(cefoxitin) 또는 세포테탄(cefotetan)이 각각 $0.25\sim 1024\mu\text{g/ml}$ 함유되며, PABL 저해제는 $100\sim 500\mu\text{g/ml}$, ESBL 저해제는 $1\sim 10\mu\text{g/ml}$ 함유되는 것을 특징으로 하는 베타-락타메이즈 생산균주 스크리닝용

액체배지.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기질확장형 β -락타메이즈(ESBL) 또는 플라스미드 매개 AmpC β -락타메이즈(PABL)를 신속하고 정확하게 분류하고 탐지하는 액체배지 미량희석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플라스미드 유래 광범위 β -락타메이즈(plasmid-borne extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)) 및 플라스미드 매개 AmpC β -락타메이즈(plasmid-mediated AmpC β -lactamases (PABLs))를 함유한 장내세균의 급속한 전 세계적 확산은 임상에 심각한 위협이 되고 있다 (Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933-951, Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 36:S11-S23). ESBL은 숙주에 페니실린(penicillins), 옥시이미노-세팔로스포린(oxyimino-cephalosporins) 및 모노박탐(monobactams)에 대한 내성을 부여할 수 있으며, ESBL의 가수분해 활성은 통상 클라불란산(clavulanic acid (CA))에 의해 억제된다(Paterson, D. L. and R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657-686). PABL은 또한 카바페넴(carbapenems)을 제외한 광범위한 β -락탐에 대한 내성을 제공하지만, 그 가수분해 활성은 클라불란산에 의해 거의 저해를 받지 않는다(Philippon, A., G. Arlet, and G. A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1-11). 장내세균의 ESBL 및 PABL을 빠르고 정확하게 탐지하는 것은 알맞은 항생제 치료 및 적절한 감염 조절에 있어서 매우 중요하다. ESBLs 및 PABLs를 탐지하는 많은 방법들이 제안되었지만, 어떤 방법들은 수행하기가 어렵고, 많은 시간이 소요되며, 결과를 해석하기가 용이하지 않았다 (Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff, and V. Jarier. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(Suppl 1):90-103, Jacoby, G. A. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161-182). KPC 효소를 비롯한 클래스 A 카바페네메이즈(carbapenemases)의 확산은 탐지를 더욱 어렵게 만든다 (Bratu, S., D. Landman, R. Haag, R. Recco, A. Eramo, M. Alam, and J. Quale. 2005. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new treat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.* 165:1430-1435, Queenan, A. M., and K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:440-458).

[0003] 임상 및 실험실 표준화 기구(Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI)는 이.콜라이(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) 및 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 내에서 ESBL 생산을 구분하고 확인하기 위한 표준 액체배지 미량희석법(standard broth microdilution) 및 디스크 감수성 시험법(disk susceptibility test)에 대해 기재한다. 그러나, 최근 다른 종에 대해 이용할 수 있는 가이드라인은 없다(Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. Document M100-S19, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA). 클라불란산의 저해효과를 이용하여 ESBL 생산을 추측하는 반자동 항균제 감수성 검사 시스템은 현재 상업적으로 판매되고 있다. 그러나, 그것은 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) 및 이.콜라이(*Escherichia coli*)에만 제한적으로 적용할 수 있는 것이다.

[0004] AmpC 효소의 존재를 선별 또는 확인하는 표준화된 방법은 아직 없다. 세포막이신 저항성은 AmpC 효소의 존재를 암시하지만, 포린 결손(porin loss)에 의해 유사한 현상이 나타날 수 있다 (Hernandez-Alles, S., M. Conejo, A. Pascual, J. M. Tomas, V. J. Benedi, and L. Martinez-Martinez. 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:273-277, Martinez-Martinez, L., A. Pascual, S. Hernandez-Alles, D. Alvarez-Diaz, A. I. Suarez, J. Tran, V. J. Benedi, and G. A. Jacoby. 1999. Roles of β -

lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1669-1673). 최근, AmpC 저해제인 보론산 화합물에 의한 세포탁심(cefotaxime; CTX) 세프트지딤(ceftazidime; CAZ) 및 세포테탄(cefotetan; CTT) 디스크 주위의 성장억제존의 확대와 관련된 AmpC β -락타메이즈 시험법이 제안되었다(Coudron, P. E. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4163-4167, Yagi, T., J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, and T. Arakawa. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2551-2558). 보론산(BA) 시험법은 플라스미드-유래와 염색체-유래 AmpC β -락타메이즈를 구별할 수 없다.

[0005]

본 발명자들은 최근 ESBL 확인용 CLSI 디스크 시험법과 유사하게, ESBL과 PABL을 모두 생산하는 종을 탐지하는 보론산 디스크 시험법의 진단학적 유용성을 평가하였다. 본 발명자들은 보론산 디스크 시험법이 장내세균(*Enterobacteriaceae*)에서 ESBL 및 PABL을 탐지하는 정확하고도 간단한 도구임을 발견하였다(Jeong, S. H., W. Song, M. J. Park, J. S. Kim, H. S. Kim, I. K. Bae, and K. M. Lee. 2008. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamases production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31:467-471, Song, W., I. K. Bae, Y. N. Lee, C. H. Lee, S. H. Lee, and S. H. Jeong. 2007. 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.* 45:1180-1184, Song, W., S. H. Jeong, J. S. Kim, H. S. Kim, D. H. Shin, K. H. Roh, and K. M. Lee. 2007. 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.* 57:315-318).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006]

본 발명의 목적은 각각 ESBL과 PABL을 저해하는 클라블란산 및 보론산을 이용하여 ESBL 및 PABL을 탐지할 수 있고, 상업적으로 판매되는 반자동 시스템에 사용 가능한 액체배지 미량희석법을 제공하려는 것이다.

과제 해결수단

[0007]

최근 SENTRY 아시아-태평양 데이터를 기초로 하여 양성 ESBL 선별 결과를 나타내지만 ESBL 확인 결과에서는 음성을 나타내는 이.콜라이 및 클렙시엘라 뉴모니에(*K. pneumoniae*) 분리주에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 표현형은 이.콜라이 및 클렙시엘라 뉴모니에에서 각각 8.9% 및 20.3%로 관찰되었고, 이들 분리주 중 높게는 75%가 PABL 유전자를 보유하고 있었다(Bell, J. M., M. Chitsaz, J. D. Turnidge, M. Barton, L. J. Walters, and R. N. Jones. 2007. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 45:1478-1482).

[0008]

동일 군주 내에 PABL 및 ESBL이 공존하는 경우는 ESBL 확인 시험에서 오류 음성판정을 일으키는 가장 중요한 원인이다(Coudron, P. E. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4163-4167). 본 발명자들은 CLSI 디스크 확인 시험법이 PABL 및 ESBL을 모두 생산하는 이.콜라이 및 클렙시엘라 뉴모니에 분리주에서 각각 19% 및 14%의 오류 음성결과를 나타냄을 발견하였다(Song, W., I. K. Bae, Y. N. Lee, C. H. Lee, S. H. Lee, and S. H. Jeong. 2007. 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.* 45:1180-1184). 염색체 유래 AmpC 효소를 보유한 장내세균속(*Enterobacter* spp.),

세라티아 마르세센스(*S. marcescens*) 및 시트로박터 프룬디(*C. freundii*)에서의 ESBL 탐지 또한 용이하지 않다. 본 발명자들의 앞선 데이터에서는 CLSI 디스크 확인 시험법이 이들 종의 ESBL 생산 분리주 28%에서 오류 음성 결과를 나타냄을 발견하였다 (Jeong, S. H., W. Song, M. J. Park, J. S. Kim, H. S. Kim, I. K. Bae, and K. M. Lee. 2008. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamases production in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**:467-471). 최근의 연구는 CA를 넣은 또는 넣지 않은 CTX 및 CAZ를 이용한 CLSI BMD 확인 시험법이 64개의 ESBL 생산 장내세균 분리주 중 16개(25%)에서 오류 음성 결과를 나타냄을 보여준다. 오류 음성 결과를 나타내는 모든 분리주들은 ESBL 및 AmpC 효소를 모두 보유하고 있었다 (데이터 나타내지 않음). 그러나, CA 없이 또는 CA 존재 하에 CTX-BA 및 CAZ-BA를 이용한 본 발명의 변형 CLSI BMD 확인 시험법은 PABL 존재와 관계 없이 ESBL을 탐지함에 있어서 완벽한 성과를 보여주었다. 이와 같은 결과는 BA 및/또는 CA의 존재 또는 부재 하에 CTX 및 CAZ로 수행하는 BMD 시험이 종에 대한 참조자료 없이도 임상 미생물 실험실에서 ESBL- 및/또는 AmpC 생산 장내세균을 탐지하는데 유용함을 암시한다.

[0009] BMD 시험법은 최근의 반자동 항생제 내성 시험 시스템 도입으로 인하여 임상 실험실에서 최소생육저해농도(MIC)를 결정하는데 가장 잘 알려진 방법 중 하나이다 (Yagi, T., J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, and T. Arakawa. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2551-2558). 그러나, ESBL 양성 장내세균을 탐지함에 있어서 반자동 시스템인 Vitek 2™, MicroScan™ 및 BD Phoenix™의 수행능력은 천차만별이며, 특히 AmpC 생산 엔테로박터(*Enterobacter*) 및 시트로박터(*Citrobacter*) 종과 같은 미생물에서는 그 수행능력에 많은 차이가 있었다 (Wiegand, I., H. K. Geiss, D. Mack, E. Struening, and H. Seifert. 2007. Detection of extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1167-1174). BD Phoenix™는 PABL과 공존하는 ESBL 확인시험에서 저조한 수행결과를 나타내었다 (Robberts, F. J. L., P. C. Kohner, and R. Patel. 2009. Unreliable extended-spectrum β -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**:358-361). 반면, CA 없이 또는 CA 존재 하에 CTX-BA 및 CAZ-BA를 이용하는 본 발명의 BMD 시험법은 ESBLs 및 PABLs 탐지 목적으로 상업적으로 판매 중인 반자동 시스템의 일상적 이용에 적용할 수 있다.

[0010] 본 발명자들은 각각 ESBL(extended-spectrum β -lactamases)과 PABL(AmpC β -lactamase)을 저해하는 클라불란산 및 보론산을 이용하여 ESBL 및 PABL의 생산을 탐지하는 액체배지 미량희석법을 발명하여 그 효율을 평가하였다. 총 100개의 장내세균 임상 분리주가 분석되었다. CTX, CAZ, 아스트레오남(aztreonam; ATM) 또는 세페핌(cefepime; FEP)을 두 배씩 희석하고, 클라불란산 및/또는 보론산을 넣거나 넣지 않은 뮐러-힌튼 액체배지(Mueller-Hinton broth)를 제조하였다. 클라불란산 및 보론산 존재 하에 CTX, CAZ, ATM, 또는 FEP의 최소생육억제농도가 8배 또는 그 이상 감소하면 각각 ESBL 및/또는 플라스미드-매개 AmpC β -락타메이즈(PABL) 양성인 것으로 판단한다. 클라불란산을 이용한 시험법에서 보론산 함유 광범위 β -락탐(CTX-BA, CAZ-BA, ATM-BA, 및 FEP-BA)은 보론산을 넣지 않은 것에 비하여 ESBL 생산주를 탐지함에 있어서 높은 양성 확률을 나타내었다. 클라불란산 및 보론산을 넣은 CTX- 및 CAZ-기반 BMD 시험법의 조합은 ESBL 및 PABL 탐지에 있어서 100%의 민감성과 특이성을 나타내었다. 이러한 액체배지 미량희석 시험법(BMD)은 장내세균에서 ESBL 및 PABL을 탐지함에 있어서 상업적으로 판매 중인 반자동 시스템을 이용할 수 있다.

[0011] 본 발명은 액체배지 미량희석법을 이용하여 기질확장성 β -락타메이즈(ESBL) 생산균주를 탐지하는 방법에 있어서,

[0012] (1) 세포탁심-PABL 저해제 액체배지 대 세포탁심-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,

[0013] (2) 세프트리악손-PABL 저해제 액체배지 대 세프트리악손-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,

[0014] (3) 아스트레오남-PABL 저해제 액체배지 대 아스트레오남-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,

[0015] (4) 세페핌-PABL 저해제 액체배지 대 세페핌-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,

[0016] (5) 세프트리악손(ceftriaxone)-PABL 저해제 액체배지 대 세프트리악손(ceftriaxone)-ESBL 저해제-PABL 저해제

액체배지의 조합, 및

- [0017] (6) 세포독심(cefepodoxime)-PABL 저해제 액체배지 대 세포독심(cefepodoxime)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합; 중 선택된 1 이상의 조합을 이용하여 ESBL 생산균주 탐지방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 액체배지에 세포탁심, 세프트리지딤, 아즈트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone) 또는 세포독심(cefepodoxime)이 각각 0.25 내지 1024 μ g/ml 함유되며, PABL 저해제는 100~500 μ g/ml, ESBL 저해제는 1~10 μ g/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 ESBL 생산균주 탐지방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 ESBL 저해제와 PABL 저해제를 모두 함유한 액체배지의 최소생육억제농도가 ESBL 저해제를 함유하고 PABL 저해제를 함유하지 않은 액체배지의 최소생육억제농도보다 8배 이상 작은 때 그 세균을 ESBL 생산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 ESBL 생산균주 탐지방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 액체배지 미량희석법을 이용하여 플라스미드-매개 AmpC 락타메이즈(PABL) 생산균주를 탐지하는 방법에 있어서,
- [0021] (1) 세포탁심-ESBL 저해제 액체배지 대 세포탁심-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- [0022] (2) 세프트리지딤-ESBL 저해제 액체배지 대 세프트리지딤-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- [0023] (3) 아즈트레오남-ESBL 저해제 액체배지 대 아즈트레오남-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합,
- [0024] (4) 세폭시틴(cefepoxitin)-ESBL 저해제 액체배지 대 세폭시틴(cefepoxitin)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합 및
- [0025] (5) 세포테탄(cefepotetan)-ESBL 저해제 액체배지 대 세포테탄(cefepotetan)-ESBL 저해제-PABL 저해제 액체배지의 조합; 중 선택된 1 이상의 조합을 이용한 PABL 생산균주 탐지방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 ESBL 저해제와 PABL 저해제를 모두 함유한 액체배지의 최소생육억제농도가 ESBL 저해제를 함유하고 PABL 저해제를 함유하지 않은 액체배지의 최소생육억제농도보다 8배 이상 작은 때 그 세균을 PABL 생산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 PABL 생산균주 탐지방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 액체배지에 세포탁심, 세프트리지딤, 아즈트레오남, 세페핌, 세폭시틴(cefepoxitin) 또는 세포테탄(cefepotetan)이 각각 0.25~1024 μ g/ml 함유되며, PABL 저해제는 100~500 μ g/ml, ESBL 저해제는 1~10 μ g/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 PABL 생산균주 탐지방법을 제공한다. 세포탁심, 세프트리지딤, 아즈트레오남, 세페핌, 세폭시틴(cefepoxitin) 또는 세포테탄(cefepotetan) 등은 0.25 ~ 1024 μ g/ml 범위에서 사용하는 것이 바람직하다. 상기 항생제가 0.25 μ g/ml 미만 농도일 때 항생제로서의 기능을 잘 발휘하지 못하며, 또한, 1024 μ g/ml 이내의 농도에서도 충분히 균주 탐지가 가능하므로 1024 μ g/ml를 초과하는 범위에서의 균주 탐지는 경제적이지 못하다. 또, 상기 PABL 저해제 및 ESBL 저해제의 농도 범위는 PABL 또는 ESBL 활성을 억제하기에 적합한 범위이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 PABL 저해제가 페닐보론산, 3-아미노페닐보론산을 포함하는 보론산 및 클록사실린(cloxacillin) 중에서 선택되는 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 ESBL 저해제가 클라불란산임을 특징으로 한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 세포탁심, 세프트리지딤, 아즈트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone), 세포독심(cefepodoxime), 세폭시틴(cefepoxitin) 및 세포테탄(cefepotetan) 중 선택된 1종과 PABL 저해제 및 ESBL 저해제가 함유된 베타-락타메이즈 생산균주 스크리닝용 액체배지를 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 액체배지에 세포탁심, 세프트리지딤, 아즈트레오남, 세페핌, 세프트리악손(ceftriaxone), 세포독심(cefepodoxime), 세폭시틴(cefepoxitin) 또는 세포테탄(cefepotetan)이 각각 0.25~1024 μ g/ml 함유되며, PABL 저해제는 100~500 μ g/ml, ESBL 저해제는 1~10 μ g/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 베타-락타메이즈 생산균주 스크리닝용 액체배지를 제공한다.

효 과

- [0032] 클라불란산을 이용한 시험법에서 보론산 함유 광범위 β -락탐(CTX-BA, CAZ-BA, ATM-BA, 및 FEP-BA)은 보론산을 넣지 않은 것에 비하여 ESBL 생산균을 탐지함에 있어서 높은 양성 확률을 나타내었다. 클라불란산 및 보론산을

넣은 CTX- 및 CAZ-기반 BMD 시험법의 조합은 ESBL 및 PABL 탐지에 있어서 100%의 민감성과 특이성을 나타내었다. 이러한 액체배지 미량희석 시험법(BMD)은 장내세균에서 ESBL 및 PABL을 탐지함에 있어서 상업적으로 판매 중인 반자동 시스템을 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재범위에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 예컨대, 아래 실시예에 기재된 항생제 외에도 다양한 항생제를 이용하여 본 발명의 기술사상을 구현할 수 있으며, ESBL 저해제, PABL 저해제 또한 실시예에 기재된 것 외에도 다양한 저해제들을 적용하여 본 발명의 기술사상을 구현하는 것이 가능하므로, 본 발명의 범위가 다양한 응용에도 미친다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0034] **재료와 방법**
- [0035] **세균 균주(Bacterial strains)**
- [0036] 이. 콜라이(*E. coli*) (n = 14), 클렙시엘라 옥시토카(*K. oxytoca*) (n = 3), 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumonia*) (n = 28), 프로테우스 미라빌리스(*P. mirabilis*) (n = 5), 살모넬라 속(*Salmonella* spp.) (n = 1), 엔테로박터 클로아세아(*Enterobacter cloacae*) (n = 20), 엔테로박터 아에로게네스(*E. aerogenes*) (n = 8), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) (n = 13) 및 시트로박터 프룬디(*Citrobacter freundii*) (n = 8)의 총 100개 임상 분리주가 본 발명의 본 실시예에 이용되었다. 53개는 ESBL 생산주였고, 11개는 PABL 및 ESBL 동시생산주(coproducers)이며, 15개는 PABL 생산주이며, 21개는 염색체 AmpC 과잉생산주(chromosomal AmpC hyperproducers)였다(표 1). 98개의 분리주는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 적절한 생화학적, 표현형적 및 분자적 공정으로 미리 특성을 규명하여 β-락타메이즈 생산 타입을 결정하였다 (Jeong, S. H., W. Song, M. J. Park, J. S. Kim, H. S. Kim, I. K. Bae, and K. M. Lee. 2008. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β-lactamases production in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC β-lactamases. Int. J. Antimicrob. Agents 31:467-471, Song, W., I. K. Bae, Y. N. Lee, C. H. Lee, S. H. Lee, and S. H. Jeong. 2007. 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. 45:1180-1184, Song, W., S. H. Jeong, J. S. Kim, H. S. Kim, D. H. Shin, K. H. Roh, and K. M. Lee. 2007. 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. 57:315-318). TEM-52 및 CTX-M-14 β-락타메이즈가 각각 잠복된 두 개의 프로테우스 미라빌리스(*P. mirabilis*)를 이경원 박사(연세대학교 의과대학, 한국)로부터 입수하였다.
- [0037] **액체배지 미량희석법(BMD testing)**
- [0038] CTX, CAZ, 아즈트레오남(aztreonam; ATM) 및 세페핌(cefepime; FEP)을 0.25 내지 512 μg/ml 범위 내에서 두 배씩 희석하고, 고정 농도 4 μg/ml의 클라불란산 및/또는 고정농도 200 μg/ml의 보론산을 넣은 또는 넣지 않은 물러-힌튼 액체배지(Mueller-Hinton broth media)를 제조하여 96웰 마이크로플레이트에 넣었다. 세균 현탁액을 CLSI 문서 M7-A8에 따라 각 웰에 접종시켰다 (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA). 플레이트는 37℃로 오버나잇 배양하였다.
- [0039] i) CA와 조합한 광범위 β-락탐 (CTX-CA, CAZ-CA, ATM-CA, 또는 FEP-CA) 대 CTX, CAZ, ATM 또는 FEP, 또는 ii) CA와 조합한 BA 함유 기질 확장성 β-락탐(CTX-CABA, CAZ-CA-BA, ATM-CA-BA, 또는 FEP-CA-BA) 대 BA를 함유한 기질 확장성 β-락탐(CTX-BA, CAZ-BA, ATM-BA 또는 FEP-BA)의 최소생육저해농도(MIC)가 8배 또는 그 이상 감소하면 ESBL 생산 양성으로 판단하였다.

[0040] i) BA와 조합한 광범위 β -락탐 (CTX-BA, CAZ-BA 또는 ATM-BA) 대 CTX, CAZ 또는 ATM, 또는 ii) BA와 조합한 CA를 함유하는 광범위 β -락탐 (CTX-CA-BA, CAZ-CA-BA 또는 ATM-CA-BA) 대 CA를 함유하는 광범위 β -락탐 (CTX-CA, CAZ-CA or ATM-CA)의 최소생육저해농도(MIC)가 8배 또는 그 이상 감소하면 이. 콜라이(*E. coli*), 클렙시엘라 옥시토카(*K. oxytoca*), 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumonia*), 프로테우스 미라빌리스(*P. mirabilis*) 및 살모넬라 속(*Salmonella* spp.)에서 AmpC β -락타메이즈 생산 양성인 것으로 판단하였다. 이. 콜라이 ATCC 25922는 음성 대조군으로 사용하였다.

[0041] **결과**

[0042] **ESBL 탐지를 위한 액체배지 미량희석 시험법**

[0043] 보론산을 함유한 광범위 β -락탐으로 수행한 ESBL 탐지 시험은 보론산을 함유하지 않은 것에 비하여 높은 민감성을 나타내었다. CTX, CAZ, ATM, 및 FEP가 64개의 ESBL 생산 분리주에 대하여 각각 46 (72%), 44 (69%), 54 (83%), 및 60 (94%)의 양성 시험결과를 나타낸 것에 비하여 CTX-BA, CAZ-BA, ATM-BA, 및 FEP-BA는 64개의 ESBL 생산 분리주에 대하여 각각 63 (98%), 58 (91%), 63 (98%), 및 63(98%)의 양성 시험결과를 나타내었다. 보론산을 함유하거나 함유하지 않은 FEP-기반 BMD 시험법은 36개의 ESBL을 생산하지 않는 분리주에서 각각 4(11%; 세 개의 DHA-1-생산 클렙시엘라 뉴모니아 및 하나의 CMY-1-생산 이.콜라이 분리주) 및 1(3%; CMY-1-생산 이.콜라이 분리주)의 잘못된 양성반응 결과를 나타내었다. 이 시험법은 64개의 ESBL 생산 분리주에 대하여 각각 1개(CTX-M-3-생산 세라티아 마르세센스(*S. marcescens*) 분리주) 및 4개(하나의 SHV-12-생산 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumoniae*), 하나의 SHV-12-생산 엔테로박터 클로아새(*E. cloacae*), 하나의 CTX-M-9-생산 엔테로박터 클로아새(*E. cloacae*) 및 하나의 CTX-M-3-생산 세라티아 마르세센스(*S. marcescens*) 분리주)의 잘못된 양성반응 결과를 나타내었다. CTX-BA 및 CAZ-BA 또는 CTX-BA 및 ATM-BA 조합으로 수행한 ESBL 탐지 시험의 민감성과 특이성은 100%였다.

[0044] **PABL 탐지를 위한 액체배지 미량희석 시험법**

[0045] 클라불란산을 함유한 광범위 β -락탐으로 수행한 PABL 탐지 시험은 클라불란산을 함유하지 않은 것에 비하여 높은 민감성을 나타내었다. CTX, CAZ, 및 ATM이 26개의 PABL 생산 분리주에 대하여 각각 16 (62%), 14 (54%), 및 10 (38%)의 양성 시험결과를 나타낸 것에 비하여 CTX-CA, CAZ-CA, 및 ATM-CA는 26개의 PABL 생산 분리주에 대하여 각각 25 (96%), 25 (96%), 및 22 (85%)의 양성을 나타내었다. CTX 또는 CAZ 시험이 25개의 PABL을 생산하지 않는 분리주에 대하여 각각 4(16%) 및 3(12%)의 잘못된 양성반응 결과를 나타낸 반면, CTX-CA, CAZ-CA, 및 ATM-CA으로 한 시험에서는 잘못된 양성반응이 나타나지 않았다. CTX-CA 및 CAZ-CA 조합으로 수행한 PABL 탐지 시험의 민감성과 특이성은 100%였다.

표 1

Strain	No. of isolates	β -Lactamase
<i>E. coli</i>	2	CTX-M-3
	5	CTX-M-14
	2	CTX-M-15
	1	DHA-1
	2	CMY-1
	2	CMY-2
<i>K. oxytoca</i>	1	SHV-12 + DHA-1
	2	DHA-1
<i>K. pneumoniae</i>	3	SHV-2a
	1	SHV-5
	5	SHV-12
	1	TEM-52
	1	CTX-M-9
	3	CTX-M-14
	3	SHV-2a + DHA-1
	5	SHV-12 + DHA-1
	1	SHV-12 + ACT-1
	1	SHV-12 + CTX-M-14 + DHA-1
	3	DHA-1
	1	CMY-1
<i>P. mirabilis</i>	1	TEM-52
	1	CTX-M-14
	3	CMY-2
<i>Salmonella</i>	1	DHA-1
<i>E. cloacae</i>	4	SHV-12
	1	CTX-M-3
	2	CTX-M-9
	5	SHV-12 + CTX-M-9
	8	Derepressed AmpC
<i>E. aerogenes</i>	1	SHV-12
	2	TEM-52
	1	CTX-M-14
	4	Derepressed AmpC
<i>S. marcescens</i>	2	SHV-12
	5	TEM-52
	1	CTX-M-3
	5	Derepressed AmpC
<i>C. freundii</i>	3	SHV-12
	1	TEM-52
	4	Derepressed AmpC

[0046]

표 2

Antimicrobial agent used in broth microdilution test ^d	No. of confirmed ESBL producers identified as: ^b		No. of confirmed ESBL non-producers identified as: ^c		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	ESBL- positive	ESBL- negative	ESBL- positive	ESBL- negative		
CTX vs. CTX-CA	46(25/18/3)	18(0/10/8)	0	36(20/16)	72	100
CAZ vs. CAZ-CA	44(25/19/0)	20(0/9/11)	0	36(20/16)	69	100
ATM vs. ATM-CA	53(24/19/10)	11(1/9/1)	0	36(20/16)	84	100
FEP vs. FEP-CA	60(24/25/11)	4(1/3/0)	1(0/1)	35(20/15)	94	97
CTX-BA vs. CTX-CA-BA	63(25/27/11)	1(0/1/0)	0	36(20/16)	98	100
CAZ-BA vs. CAZ-CA-BA	58(21/26/11)	6(4/2/0)	0	36(20/16)	91	100
ATM-BA vs. ATM-CA-BA	63(24/28/11)	1(1/0/0)	0	36(20/16)	98	100
FEP-BA vs. FEP-CA-BA	63(25/27/11)	1(0/1/0)	4(0/4)	32(20/12)	98	89
CTX vs. CTX-CA and/or CAZ vs. CAZ-CA	48	16	0	36	75	100
CTX vs. CTX-CA and/or ATM vs. ATM-CA	55	9	0	36	86	100
CTX vs. CTX-CA and/or FEP vs. FEP-CA	61	3	1	35	95	97
CAZ vs. CAZ-CA and/or ATM vs. ATM-CA	55	9	0	36	86	100
CAZ vs. CAZ-CA and/or FEP vs. FEP-CA	61	3	1	35	95	97
ATM vs. ATM-CA and/or FEP vs. FEP-CA	61	3	1	35	95	97
CTX-BA vs. CTX-CA-BA and/or CAZ-BA vs. CAZ-CA-BA	64	0	0	36	100	100
CTX-BA vs. CTX-CA-BA and/or ATM-BA vs. ATM-CA-BA	64	0	0	36	100	100
CTX-BA vs. CTX-CA-BA and/or FEP-BA vs. FEP-CA-BA	64	0	4	32	100	89
CAZ-BA vs. CAZ-CA-BA and/or ATM-BA vs. ATM-CA-BA	63	1	0	36	98	100
CAZ-BA vs. CAZ-CA-BA and/or FEP-BA vs. FEP-CA-BA	63	1	4	32	100	89
ATM-BA vs. ATM-CA-BA and/or FEP-BA vs. FEP-CA-BA	64	0	4	32	100	89

^a Abbreviations: CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; CA, clavulanic acid; BA, boronic acid.
^b Parenthesis showed no. of isolates producing ESBL only / ESBL with chromosomal AmpC / ESBL with plasmid-mediated AmpC.
^c Parenthesis showed no. of isolates producing chromosomal AmpC only / plasmid-mediated AmpC only.

3

Antimicrobial agent used in broth microdilution test ^a	No. of confirmed PABL producers identified as: ^b				No. of confirmed PABL non-producers identified as: ^b				Sensitivity (%)	Specificity (%)
	PABL-		PABL+		PABL-		PABL+			
	positive	negative	positive	negative	positive	negative	positive	negative		
CTX vs. CTX-BA	16(15/1)	10(0/10)	4	21	61	84				
CAZ vs. CAZ-BA	14(14/0)	12(1/11)	3	22	54	88				
ATM vs. ATM-BA	10(10/0)	16(5/11)	0	25	38	100				
CTX-CA vs. CTX-CA-BA	25(15/10)	1(0/1)	0	25	96	100				
CAZ-CA vs. CAZ-CA-BA	25(14/11)	1(1/0)	0	25	96	100				
ATM-CA vs. ATM-CA-BA	22(12/10)	4(3/1)	0	25	85	100				
CTX vs. CTX-BA and/or CAZ vs. CAZ-BA	16	10	5	20	62	80				
CTX vs. CTX-BA and/or ATM vs. ATM-BA	16	10	4	21	62	84				
CAZ vs. CAZ-BA and/or ATM vs. ATM-BA	15	11	3	22	58	88				
CTX-CA vs. CTX-CA-BA and/or CAZ-CA vs. CAZ-CA-BA	26	0	0	25	100	100				
CTX-CA vs. CTX-CA-BA and/or ATM-CA vs. ATM-CA-BA	25	1	0	25	96	100				
CAZ-CA vs. CAZ-CA-BA and/or ATM-CA vs. ATM-CA-BA	25	1	0	25	96	100				

^a Abbreviations: CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; CA, clavulanic acid; BA, boronic acid.

^b Parenthesis showed no. of isolates producing plasmid-mediated Amp^r only / ESBL with plasmid-mediated Amp^r.

^a Abbreviations: CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; CA, clavulanic acid; BA, boronic acid.

^b Parenthesis showed no. of isolates producing plasmid-mediated AmpC only / ESBL with plasmid-mediated AmpC.