



ORIGINAL ARTICLE

Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca*
Detection Using Molecular Methods

Byoung Seon Yang, Ji Ae Park

Department of Medical Laboratory Science, Jinju Health College, Jinju, Korea

분자학적 방법을 이용한 Carbapenemase-Producing
Klebsiella oxytoca 검출

양병선, 박지애

진주보건대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received October 1, 2019
Revised 1st October 25, 2019
Revised 2nd October 31, 2019
Revised 3rd November 1, 2019
Accepted November 1, 2019

Key words

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae carbapenemase

ABSTRACT

The rapid increase and dissemination of carbapenemases, such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), has become a major problem within the field of healthcare-related infection. There are few antibiotics to treat carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections, so the identification of resistant bacterial mechanisms is critical to initiate infection control and conduct epidemiological research. A rapid and effective method for detecting KPC-producing bacteria is needed to avoid therapeutic failures and introduce measures to prevent and control the dissemination of these multi-resistant bacteria. During the study period, 31 isolates (seven isolates of *Acinetobacter* spp., six isolates of *Morganella morganii*, five isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, five isolates of *Proteus mirabilis*, one isolate of *Proteus vulgaris*, two isolates of *Enterobacter cloacae*, one isolate of *Enterobacter aerogenes*, one isolate of *Klebsiella pneumoniae*, one isolate of *Klebsiella oxytoca*, one isolate of *Serratia marcescens* and one isolate of *Escherichia coli*) were identified by the VITEK. Gram negative rod bacteria were the most frequently isolated from urine (35.5%), blood (19.4%), sputum (16.1%), pus (9.7%), ascitic fluid (9.7%), tracheal aspirates (6.5%) and bile juice (3.2%). Analysis using the PCR method identified the *bla_{KPC}* gene in the *K. oxytoca*1 strain, but the *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* and *bla_{OXA-48}* genes are not amplified. In conclusion, diagnosis using the PCR method can accurately and quickly diagnose KPC, thus establishing quick preventive measures to prevent the spread of KPC in hospitals.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)는 일반적으로 약제 내성 병원균에 대해 최후의 보루로 일컬어지는

carbapenems를 포함한 모든 또는 거의 모든 가능한 항생제에 내성이 있는 박테리아 그룹이다[1-4]. 이러한 carbapenem 계열에는 imipenem, meropenem, ertapenem 등이 속하며, 이 중 하나 이상에 내성을 가지는 경우를 CRE로 정의한다[5].

Carbapenem은 현재 사용 중인 항생제 중 그람 음성 세균에 대해 가장 광범위 항균력을 가지고 있는 항생제로서, 세팔로스포린(cephalosporin)을 포함한 광범위 베타락탐 항생제(beta-lactam antibiotics)에 내성을 지닌 세균들을 치료할 수 있다. CRE은 베타락탐(beta-lactam) 항생제는 물론이고 아미노글리코사이드(aminoglycoside), 퀴놀론(quinolone), 테트

* Corresponding author: Ji Ae Park
Department of Medical Laboratory Science, Jinju Health College, 51 Uibyeong-ro,
Jinju 52655, Korea
E-mail: hafnia79@naver.com
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2957-1865>

라사이클린(tetracycline) 등의 다양한 항생제에도 내성을 보이기 때문에 다제내성균(multidrug-resistant organisms)으로 분류된다.

현재의 공중보건에 대한 심각하거나 긴급한 위협으로 분류되는 약제 내성 그람 음성 세균에는 CRE뿐만 아니라 제3세대 cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* (3GC-R), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), multidrug-resistant *Acinetobacter* species (MDRA)도 위험균 목록에 포함되어 있다[3, 6]. 그람 음성 세균의 항생제 내성은 공공의 건강을 계속 위협하고 있으며, 건강 관리의 사회적 비용을 증가시키고 있다. CRE는 제한된 치료 옵션, 복수의 장기 시스템을 감염시킬 수 있는 능력, 높은 귀책 사망률과 비용 때문에 심각한 문제로 부상하고 있다[7].

이러한 CRE는 항생제 내성 기전에 따라 carbapenem 분해 효소 생성 장내세균(carbapenemase producing CRE, CP-CRE)과 carbapenem 분해효소를 비생성 장내세균(non-CP-CRE)으로 나눌 수 있다. Non-CP-CRE의 항생제 내성 기전은 세균의 외막 단백질의 변화 및 AmpC 나 extended spectrum β -lactamases (ESBL) 같은 항생제 분해효소의 과다 생성, 그리고 유출 펌프의 생성 등이 있으며, CP-CRE의 항생제 내성 기전은 carbapenem 분해효소를 생성하는 것이다[8-10]. Carbapenem 분해효소가 중요한 이유는 세균들 사이에서 플라스미드를 통해 내성 유전자가 전파될 수 있음을 의미하며[8], 이는 의료기관 내 집단유행을 일으킬 수 있다[10]. 기존의 연구에 따르면, CP-CRE 감염균에 의한 균혈증이나 폐렴으로 인한 사망률이 non CP-CRE 감염보다 더 높으며, carbapenem 내성이 사망에 기여 하는 비율이 26~44%에 달한다고 보고되고 있다[4, 11-13].

이처럼 CRE는 국내뿐만 아니라, 전 세계적으로 증가하는 추세이다[14-16]. 표본감시에 의하면, 국내 CRE의 분리율은 1% 미만으로 보고되고 있으나, CP-CRE의 발생은 해마다 증가하고 있다. 그로 인해 CRE는 2010년 12월 법정 감염병(지정감염병)으로 지정되어 표본감시체제로 운영되어 오다가, 2017년 6월 3일부터 3군 감염병(전수감시체제)으로 전환되어 운영되고 있다[17]. 2015년 국내 5개 대학병원에서 채취한 CRE의 분석 결과에 따르면 ertapenem에 내성을 보이는 393균주의 장내세균 속 중 중 79균주(20.1%)가 CP-CRE였다. 검출된 79균주 CP-CRE 중 47균주(59.5%)는 *bla*_{OXA-232}, 27균주(34.1%)는 *bla*_{KPC-2}, 그 외 *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1} 유전자를 가지고 있었다[18].

2016년 연구에서는 분리된 CRE 중 CPE 비율은 11%였으며, CPE 중 가장 많은 균종은 *K. pneumoniae* (72%) 이었다. 거의

모든 CPE가 다제 내성을 나타내었으며, 주로 확인된 carbapenemase 유전자는 *bla*_{KPC} (68%)가 대다수를 차지하였다[19]. 이처럼 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)는 carbapenem 항생제를 가수분해하여 여러 가지 항생제에 내성을 보인다.

각종 항생제 내성 그람 음성 세균에 의한 감염 위험 인자는 대체로 중복되고 있으며, 환자들은 공통의 위험 인자, 즉 위험 인자의 조합이 존재할 때 동시에 여러 개의 저항성 그람 음성 세균의 위험에 처하게 된다. 그리고 이전 carbapenem의 사용은 저항력이 높은 여러 그람 음성 세균으로 인해 감염의 위험을 증가시키는 것으로 밝혀졌다[20]. 따라서 항생제 내성의 경향은 부상하는 병원균에 대한 중요한 통찰력을 제공할 뿐만 아니라 공중보건, 감염 중에 및 항균 관리접근법을 알려주므로[21], 약제 내성 균주의 정확하고 신속한 진단이 중요하다 할 수 있다. KPC 생성 균주는 빠르게 전파되기 때문에 clinical laboratory standards institute (CLSI) 가이드 라인[22]을 따른 검출법은 많은 시간이 필요하며, 균주에 따라서는 위양성을 나타내는 경우가 있다. 그리고 선별검사법으로 이용되는 Modified Hodge Test (MHT)의 경우 특정 효소의 검출에는 낮은 민감도를 보인다는 단점이 있고[23], 정확한 유전자형을 알기 위해서는 추가적인 분자 진단이 필요하다.

이에 본 연구는 대학병원에서 분리된 균주를 이용하여 KPC 생성 균주의 신속하고 정확한 검출을 위하여 PCR을 이용한 분자학적 진단방법의 유용성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

분석에 사용한 검체는 국내 대학병원에서 2018년 3월부터 2019년 3월까지 수집된 31 균주를 대상으로 imipenem, meropenem 및 ertapenem에 약제 내성이 확인된 그람 음성 막대균을 이용하였다.

2. 세균의 동정

분석에 이용한 분리 배양된 31 균주의 식별은 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 세균 동정을 하였다.

3. Carbapenemase 선별 시험법

균주에 대해서는 먼저 carbapenemase 선별시험인 디스크 확산법을 시행하였다. 시험에 이용한 균주는 균주 부유액 탁도

를 McFarland No. 0.5로 맞춘 후 Mueller Hinton 배지에 먼 봉으로 고루 접종하였다. 접종한 균주가 마른 뒤 배지의 중앙에 imipenem, meropenem 및 ertapenem (10 µg, BBL, Cockeysville, MI, USA)를 놓은 후 37°C 배양기에서 18~24 시간 배양한다. 배양 후 Table 1의 기준으로 억제대 안으로 균이 자란 경우를 양성으로 판단하였다. 그 후 선별검사법인 Modified Hodge Test (MHT)를 실시하였다. MHT를 시행하기 위해 carbapenem 감수성 균주 *E. coli* ATCC 25922를 McFarland No. 0.5 탁도로 균주 부유액을 만들었다. 탁도를 맞춘 균주 부유액 0.5 mL을 식염수 4.5 mL에 넣어 1:10으로 희석하였다. 그 후 MacConkey 배지에 고르게 도말 하고, 3~5분 건조 후 각각 10 µg imipenem, meropenem 및 ertapenem 감수성 검사용 디스크를 배양접시 가운데에 올려준다. 그리고 검사하고자 하는 균주를 백금기에 묻혀 디스크에서 배양접시 가장자리까지 그어준다. 접종된 배양접시는 배양기에서 18~24 시간 배양한 후 다음날 관찰하였다. 회전 된 균주 주위로 *E. coli* ATCC 25922 균주가 클로버 잎과 같이 움푹 들어간 상태 (clover leaf-like indentation)로 자라면 양성으로 판정하였다[24].

4. Carbapenemase 유전자검사

Carbapenemase 선별시험인 디스크 확산법에서 KPC로 의심되는 균주에서 DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다. 먼저

의심 균주의 DNA 추출은 자비 방법으로 수행하였다. 분리된 균주의 1~2 집락을 증류수 300 µL 담은 tube에 고르게 풀어준다. 수조에서 균주를 5분간 끓인 후 4°C 12,000 rpm 5분간 원심분리하여 pellet은 가라앉힌 후 상층의 DNA를 사용하였다. 그 후 carbapenem 분해효소 중 4종(KPC, IMP, VIM, OXA-48)에 대한 유전자검사를 시행하였다(Table 2). AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) 안에 각각 primer 1 µL, DNA 2 µL, 증류수를 혼합하여 총 부피 20 µL의 반응용액을 만들었다. Dual block PCR C-1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA) 를 이용하여 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C에서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분씩 35회 증폭 반응을 시키고, 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 각각의 PCR 반응 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정제한 후 결정된 유전자는 BigDye Terminator V3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)와 ABI3730XL (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)을 이용하여 염기서열 분석을 하였다. 결정된 염기서열의 비교분석은 NCBI에서 제공하는 blast 프로그램을 이용하였다.

Table 1. The carbapenem resistance criteria of *Enterobacteriaceae* (CLSI. M100-S27. 2017)

Agent	DIC (mm)			MIC (µg/mL)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Doripenem	≥23	20~22	≤19	≤1	2	≥4
Imipenem	≥23	20~22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem	≥23	20~22	≤19	≤1	2	≥4
Ertapenem	≥22	19~21	≤18	≤0.5	1	≥2

Abbreviations: DIC, disc diffusion method; MIC, minimum inhibitory concentrations.

Table 2. Primers for the detection of carbapenemase-producing bacteria

Gene	Amplicon size (bp)	Primer sequences	Reference
<i>bla_{KPC}</i>	785	5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3' 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'	25
<i>bla_{IMP}</i>	587	5'-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3' 5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'	26
<i>bla_{VIM}</i>	389	5'-GTTTGGTTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	26
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	438	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	26

결 과

1. 검체별 특성

본 연구의 분석에 사용한 검체는 국내 대학병원에서 수집된 31 균주를 대상으로 하였고, 균주의 식별은 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 의하여 확인하였다. 분석결과 *Acinetobacter* spp. 7균주, *M. morganii* 6균주, *P. aeruginosa* 5균주, *P. mirabilis* 5균주, *P. vulgaris* 1균주, *E. cloacae* 2균주, *E. aerogenes* 1균주, *K. pneumoniae* 1균주, *K. oxytoca* 1균주, *S. marcescens* 1균주, *E. coli* 1균주를 확인하였다. 분리된 검체의 빈도는 urine (35.5%), blood (19.4%), sputum (16.1%), pus (9.7%), ascitic fluid (9.7%), tracheal aspirates (6.5%), bile juice (3.2%) 순으로 나타났다(Figure 1).

2. Carbapenemase 선별 시험법

임상검체 중 식별된 모든 균주에 대해서는 디스크 확산법을 시행하였다. Imipenem, meropenem 및 ertapenem 약제를 이용 하였으며, 항생제 감수성 시험은 CLSI 가이드 라인에 따라 시행하였다. 각 항생제에 대한 내성판정은 Table 1을 따랐다.

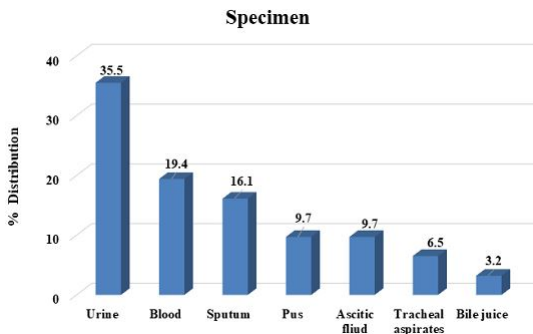


Figure 1. Frequency of detection in specimens.

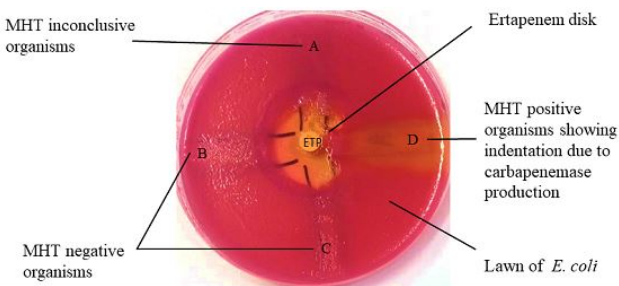


Figure 2. The MHT performed on a MacConkey plate. (A) *Serratia marcescens*, inconclusive result; (B, C) *Proteus mirabilis*, negative result; (D) *Morganella morganii*, positive result. Abbreviation: ETP, Ertapenem disk.

Carbapenem계 중 한 가지 이상에서 내성인 균주를 carbapenem 내성확인진단 시험 대상으로 정하였으나, *Proteus* spp., *Serratia* spp., *M. morganii*, *Providencia* spp.는 선천적으로 imipenem의 항균력이 약하므로 imipenem에 대해서는 carbapenem 내성 선별기준을 적용하지 않았다(Table 3). 그 후 선별시험인 MHT를 실시하여 결과를 판독하였다(Figure 2). Ertapenem을 이용한 MHT 결과 31균주 중 11균주에서 양성 결과를 확인하였고 결과는 Table 4와 같다.

3. Carbapenemase 유전자검사

분석에 이용된 모든 균주에 대해 carbapenem 분해효소 중 4종(KPC, IMP, VIM, OXA-48)에 대한 유전자검사를 시행하였다[25, 26]. 분석결과 IMP, VIM, OXA-48에서는 증폭이 확인된 균주가 없었다. KPC 유전자의 경우 1개의 양성 균주를 확인하였으며(Figure 3), 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인

Table 3. Carbapenem resistance gram negative rod bacteria analyzed in this study

No.	Strain	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R
4	<i>Acinetobacter</i> spp.	-	R	R
5	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R
7	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R
9	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
10	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
11	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
12	<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	R
13	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	R
14	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R
15	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R
16	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	R
17	<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S
18	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S
19	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S
20	<i>Morganella morganii</i>	R	S	R
21	<i>Morganella morganii</i>	R	S	I
22	<i>Escherichia coli</i>	R	S	I
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R
24	<i>Morganella morganii</i>	R	S	R
25	<i>Morganella morganii</i>	R	S	R
26	<i>Morganella morganii</i>	R	S	R
27	<i>Morganella morganii</i>	R	S	R
28	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	R
29	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	S	R
30	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	R
31	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	R

Abbreviations: S, Sensitivity; I, Intermedius; R, Resistant.

Table 4. Gram negative rod bacteria showing positive results in modified Hodge test (N=11)

No.	Name of organism	Number of isolates
1	<i>Acinetobacter</i> spp.	3 (27.3%)
2	<i>Morganella morganii</i>	3 (27.3%)
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (9.1%)
4	<i>Proteus mirabilis</i>	1 (9.1%)
5	<i>Serratia marcescens</i>	1 (9.1%)
6	<i>Escherichia coli</i>	1 (9.1%)
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (9.1%)
Total		11 (100%)

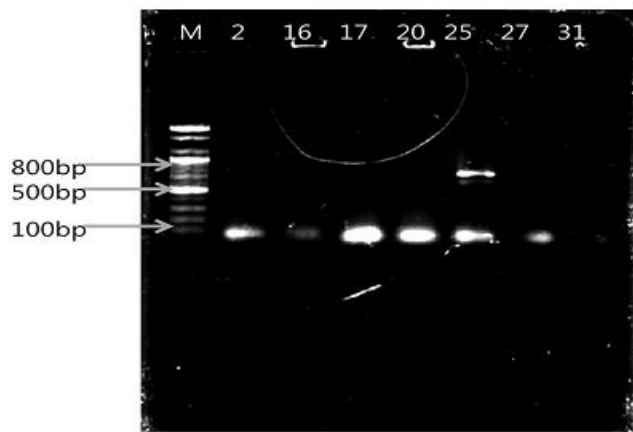


Figure 3. PCR amplification profile of the *bla_{KPC}* gene from the gram negative rod bacteria isolates. M, 100 pb DNA ladder marker; lane 2, *M. morganii*; lane 16, *K. pneumoniae*; lane 17, *E. coli*; lane 20, *P. aeruginosa*; lane 25, *K. oxytoca*; lane 27, *E. cloacae*; lane 31, *Acinetobacter* spp.

하였다. 염기서열의 비교분석은 NCBI에서 제공하는 blast 프로그램을 이용하였고, 결과 *K. oxytoca* 1 균주에서 *bla_{KPC}* 유전자를 확인하였다(Figure 4). Genebank에서의 상동성(homology)은 98%이며, 원래 서열보다 5개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다.

고 찰

국내에서는 2010년 최초로 KPC 생성 *K. pneumoniae*가 보고 되었으며[27], 그 이후 지속적으로 CRE의 발병이 보고되고 있다[28-30]. KPC 생성 균주는 빠르게 전파되기 때문에 CLSI 가이드 라인으로 검출하면 많은 시간이 소요 되며, 균주에 따라서 위양성을 나타내는 경우가 있다. 이에 본 연구는 대학병원에서 분리된 31 균주를 이용하여 KPC 균주의 신속하고 정확한 검출을 위한 분자학적 진단방법의 유용성을 알아보고자 하였다. 분리된 31 균주를 동정한 후 식별된 모든 균주에 대해서는

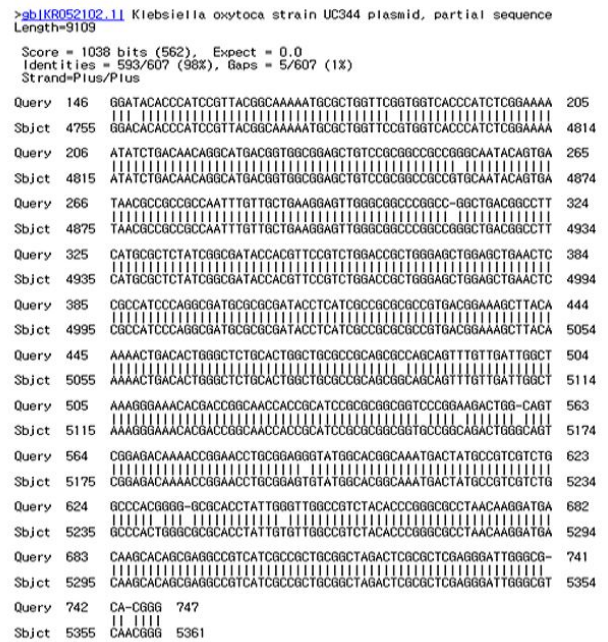


Figure 4. Alignment of *bla_{KPC}* gene sequences of *K. oxytoca*.

carbapenem 분해효소 선별시험인 디스크 확산법을 시행하였다. 약제는 imipenem, meropenem 및 ertapenem 를 이용하였으며, 항생제 감수성 시험은 CLSI 가이드 라인에 따라 시행하였다. 그 후 선별시험인 MHT를 실시하여 결과를 판독하였다. 이처럼 CRE를 검출하는 일반적인 방법은 디스크 확산 시험법, 액체배지 미세 희석법, 혹은 자동화 기계를 이용하여 carbapenem 계 항생제인 imipenem, meropenem 및 ertapenem 중 한 가지 이상에 내성일 때 CRE로 진단한다. 그러나 진단 이후 CP-CRE와 non-CP-CRE를 구분하기 위한 검사를 필요로 한다[8]. 그리고 carbapenem 분해효소 생성 여부 검사에 이용되는 표현형 분석 방법인 MHT는 KPC 검출에는 뛰어나지만, new delhi metallo-β-lactmase (NDM) 관련 효소 검출에는 낮은 민감도를 보인다는 단점이 있다[23].

Carbapenemase 선별시험인 디스크 확산법에서 KPC 생성이 의심되는 균주에서 DNA을 추출한 후 carbapenem 분해 효소 중 4종(KPC, IMP, VIM, OXA-48)에 대한 유전자검사를 시행하였다. 분석에서 양성인 확인된 *bla_{KPC}* 유전자의 경우 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인하였으며, 그 결과 *K. oxytoca* 1균주에서 상동성 98%의 *bla_{KPC}* 유전자를 확인하였다.

2019년 인도 Garg 등[31]의 연구에서는 carbapenem 내성 균주의 검출빈도는 *P. aeruginosa* 24%, *Acinetobacter* spp. 22%, *E. coli* 16%였으며, 유전형은 NDM63%, Verona integron-

encoded metallo- β -lactamase (VIM) 18.4% 순으로 나타났으며, NDM과 oxacillinase-48 (OXA-48)의 20%는 공통으로 분리되었다.

2017년 미국 CDC 분석자료에 따르면, CPE 신고건 중에 NDM 생성 carbapenem 내성 장내세균 속 균종이 374건, OXA-48 146건, VIM 57건, imipenemase (IMP) 36건으로 보고되었다[32]. 또한, 이탈리아, 그리스, 미국, 스페인 등의 국가에서 KPC 유형이 대부분 확인되었고, 터키에서는 *K. pneumoniae*의 OXA-48이 대부분을 차지하였다[33].

우리나라에서 발생하는 carbapenem 분해효소의 종류로는 2016년 기준으로 KPC (70.7%)가 가장 많았다. 그 외 NDM (13.5%), OXA-48 (9.6%), Guiana extended spectrum β -lactamase (GES, 3.1%), VIM (2.0%), IMP (1.1%) 순으로 나타났으며, 균종 별로는 *K. pneumoniae*에서 83.2%로 가장 많이 보고 되었다[34].

또한, 2017년도 질병관리본부의 자료에 따르면[35], 두 개 이상의 carbapenem 분해효소 유형을 보유한 균주가 4.9%로 NDM-5와 OXA-181을 보유한 균주가 3.4% 확인되었다. KPC-4와 NDM-1을 보유한 균주가 0.4%, KPC-2와 NDM-1을 보유한 균주가 0.2%, NDM-1과 GES-5를 보유한 균주가 0.2%, KPC-2와 VIM-2을 보유한 균주가 0.2%, NDM-1과 OXA-232을 보유한 균주가 0.1%인 분포를 확인하였다.

국내의 carbapenem 분해효소의 유형은 KPC가 대부분을 차지하고 있으나, 2개 이상의 유전자를 보유한 균주도 대다수 확인되고 있어 이로 인한 전파가 우려되고 있다.

이처럼 CRE는 의심할 여지 없이 중요한 임상적 문제지만, ESBL과 MDR *Enterobacteriaceae* 역시 환자 건강에 상당한 위협이 되며, 그 수가 더 많이 보고되고 있다[36]. 각종 항생제 내성 그람 음성 세균에 의한 감염 위험 인자는 대체로 중복되고 있으며, 이전 carbapenem의 사용은 저항력이 높은 여러 그람 음성 세균으로 인해 감염의 위험을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 [21]. 전 세계적으로 항생제 내성균이 유행하는 상황에 대비하여 국내 의료기관에서도 CRE 유행을 막기 위해서는 다른 다제 내성균과 마찬가지로 접촉 주의가 시행되어야 하며, 적극적인 감시와 빠른 진단, 예방이 필요하다.

항생제 내성균의 진단에 이용되는 약제 감수성 검사와 MHT 검사는 일종의 표현형 검사법으로 많은 시간이 소요 되고, 정확한 유전자형의 검출을 위해서는 추가적인 분자 진단이 필요하다.

이에 본 연구는 KPC 생성 균주검출에 있어 CLSI 가이드 라인에 따른 MHT 검사법의 단점을 보완하고자 PCR 방법을 이용하

였다. 결과에서 선별검사인 MHT 방법은 11균주의 양성을 보였으나, PCR법을 이용한 분자 진단 결과 1균주에서 상동성 98%의 유전자형을 확인할 수 있었다. 결론적으로, PCR 방법을 이용한 진단법은 KPC를 정확하고 신속하게 진단할 수 있으며, 그로 인해 병원 내 KPC의 전파방지를 위한 신속한 예방대책 수립이 가능하다 할 수 있다.

요 약

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)와 같은 carbapenem 분해효소의 급속한 증가와 보급은 의료 관련 감염 분야 내에서 주요한 문제가 되었다. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) 감염을 치료하기 위한 항생제는 거의 없으므로 내성의 박테리아 메커니즘의 확인은 감염 통제와 역학 연구에 매우 중요하다. 그러므로 KPC 균주를 검출하는 신속하고 효과적인 방법은 치료상의 실패를 피하고, 이러한 다제 내성세균의 유통을 방지 및 통제하는 대책으로 도입할 필요가 있다. 분석에 이용한 31균주에서 *Acinetobacter* spp. 7균주, *Morganella morganii* 6균주, *Pseudomonas aeruginosa* 5균주, *Proteus mirabilis* 5균주, *Proteus vulgaris* 1균주, *Enterobacter cloacae* 2균주, *Enterobacter aerogenes* 1균주, *Klebsiella pneumoniae* 1균주, *Klebsiella oxytoca* 1균주, *Serratia marcescens* 1균주, *Escherichia coli* 1균주를 확인하였다. 그람음성 간균이 분리된 검체의 빈도는 urine (35.5%), blood (19.4%), sputum (16.1%), pus (9.7%), ascitic fluid (9.7%), tracheal aspirates (6.5%), bile juice (3.2%) 순으로 나타났다. PCR 방법을 이용한 유전자분석 결과 *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}에서는 증폭이 확인된 균주가 없었으나, *Klebsiella oxytoca* 1 균주에서 *bla*_{KPC} 유전자를 확인하였다. 결론적으로, PCR 방법을 이용한 진단법은 KPC를 정확하고 신속하게 진단할 수 있으며, 그로 인해 병원 내 KPC의 전파방지를 위한 신속한 예방대책 수립이 가능하다 할 수 있다.

Acknowledgements: This paper was supported by the Jinju Health College in 2019.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Yang BS, Professor; Park JA, Adjunct professor.

REFERENCES

- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT*. 2015;40:277-283.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 2013;4:47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>
- Centers for Disease Control and Prevention. Office of infectious disease antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2015 [cited 2019 August 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Kim JE. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Korea. *Hanyang Med Rev*. 2018;38:99-102. <https://doi.org/10.7599/hmr.2018.38.2.99>
- Centers for Disease Control and Prevention. FAQs about choosing and implementing a CRE definition [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2015 [cited 2019 August 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/definition.html>.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- McCann E, Srinivasan A, DeRyke CA, DePestel DD, Murray J, Gupta V. Carbapenem-nonsusceptible gram-negative pathogens in ICU and non-ICU settings in US hospitals in 2017: a multi-center study. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5:ofy241. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy241>
- Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resist Updat*. 2016;29:30-46. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.002>
- Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med*. 2017;37:303-315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
- Lee HJ, Lee DG. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: recent updates and treatment strategies. *J Korean Med Assoc*. 2018;61:281-289. <https://doi.org/10.5124/jkma.2018.61.4.281>
- Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2017;64:257-264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw741>
- Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1170-1175. <https://doi.org/10.3201/eid2007.121004>
- Hauck C, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, Kalayjian RC, et al. Spectrum of excess mortality due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:513-519. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.023>
- Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, Milstone AM. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14:95-108. <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1106940>
- Aires-de-Sousa M, Ortiz de la Rosa JM, Gonçalves ML, Pereira AL, Nordmann P, Poirel L. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:1632-1638. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190656>
- van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017;8:460-469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2017 Guidelines for management of medical-related infectious diseases (VRSa/CRE) [Internet]. Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2017 [cited 2019 August 28]. Available from: http://www.cdc.go.kr/board.es?mid=a20507020000&bid=0019&act=view&list_no=138074.
- Jeong SH, Kim HS, Kim JS, Shin DH, Kim HS, Park MJ, et al. Prevalence and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from five hospitals in Korea. *Ann Lab Med*. 2016;36:529-535. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.6.529>
- Ahn SY, Sung JY, Kim HS, Kim MS, Hwang YJ, Jong SR, et al. Molecular epidemiology and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolated at a university hospital in Korea during 4-year period. *Ann Clin Microbiol*. 2016;19:39-47. <https://doi.org/10.5145/ACM.2016.19.2.39>
- Lodise TP, Bonine NG, Ye JM, Folse HJ, Gillard P. Development of a bedside tool to predict the probability of drug-resistant pathogens among hospitalized adult patients with gram-negative infections. *BMC Infectious Diseases*. 2019;19:718. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4363-y>
- Gupta V, Ye G, Olesky M, Lawrence K, Murray J, Yu K. Trends in resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* species in hospitalized patients in the United States: 2013-2017. *BMC Infect Dis*. 2019;19:742. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4387-3>
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-S27. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2017.
- Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. *Clin Infect Dis*. 2018;66:1290-1297. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>
- Bora A, Sanjana R, Jha BK, Mahaseth SN, Pokharel K. Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC Res Notes*. 2014;7:557. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-557>
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:906-909. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
- Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3877-3880. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-12>
- 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;54:2278-2279. <https://doi.org/10.1128/AAC.00011-10>
28. Bae IK, Kang HK, Jang IH, Lee W, Kim K, Kim JO, et al. Detection of carbapenemases in clinical *Enterobacteriaceae* isolates using the VITEK AST-N202 card. *Infect Chemother.* 2015;47:167-174. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.3.167>
 29. 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. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.298>
 30. Jeong SH, Lee KM, Lee J, Bae IK, Kim JS, Kim HS, et al. Clonal and horizontal spread of the bla OXA-232 gene among *Enterobacteriaceae* in a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 82:70-72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.001>
 31. Garg A, Garg J, Kumar S, Bhattacharya A, Agarwal S, Upadhyay GC. Molecular epidemiology & therapeutic options of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Indian J Med Res.* 2019;149:285-289. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_36_18
 32. Centers for Disease Control and Prevention. Patients with NDM-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) reported to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) as of December 2017, by state [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2017 [cited 2019 August 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/trackingcre.html>.
 33. Rodriguez-Bano J, Gutierrez-Gutierrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31:1-42. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
 34. Park JW, Lee EJ, et al. Status of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* incidences in Korea, 2015-2016. Research report. Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2017;10:1243-1247.
 35. Go EB, Ju SJ, et al. Distribution of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in Korea, 2017. Research report. Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2018;11:1518-1522.
 36. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with health-care-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37:1288-1301. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.174>