



## ORIGINAL ARTICLE

# Detection of the Carbapenem Resistance Gene in Gram-negative Rod Bacteria Isolated from Clinical Specimens

Byoung Seon Yang

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

## 임상검체에서 분리된 그람음성막대균으로부터 카바페넴 내성 유전자 검출

양병선

진주보건대학교 임상병리과

## ARTICLE INFO

Received July 13, 2022  
Revised 1<sup>st</sup> August 5, 2022  
Revised 2<sup>nd</sup> August 29, 2022  
Accepted August 30, 2022

## Key words

*bla*<sub>KPC</sub>  
*bla*<sub>NDM</sub>  
*bla*<sub>IMP</sub>  
*bla*<sub>VIM</sub>  
*bla*<sub>OXA-48-like</sub>  
Real-time PCR

## ABSTRACT

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) poses an increasing public health threat and has limited treatment options with high associated mortality. Genotypes of carbapenemase that threaten public health (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub>) and *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genes were detected by phenotypic and molecular diagnosis, and related gene distribution patterns were investigated. Phenotypic testing using the modified Hodge test confirmed positivity in all 41 strains examined, and carbapenemase inhibitory testing using meropenem+phenyl boronic acid or meropenem+EDTA confirmed positivity in 18 and 8 strains, respectively. Polymerase chain reaction revealed the presence of amplification products in 28 strains of *bla*<sub>KPC</sub>, 25 strains of *bla*<sub>NDM</sub>, 5 strains of *bla*<sub>IMP</sub>, 1 strain of *bla*<sub>VIM</sub>, and 13 *bla*<sub>OXA-48-like</sub> strains. In addition, 7 strains of *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>, 1 strain of *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>IMP</sub>, 1 strain of *bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>OXA-48-like</sub>, 1 strain of *bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>VIM</sub>, 4 strains of *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>IMP</sub>, and 4 strains of *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>OXA-48-like</sub> were identified. Melting curve analysis using real-time PCR was wholly consistent with PCR results. The study shows genetic identification of highly specific CRE by real-time PCR could be used to provide early diagnoses and infection control, improve surveillance, and prevent the transmission of CRE.

Copyright © 2022 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

## 서론

장내세균과는 심각한 병원성 감염을 일으키는 기회주의적 병원균으로, 전 세계의 입원 환자들 사이에서 항생제 내성이 강한 그람 음성 균주에 의한 감염으로 유병률이 급격히 증가되고 있다[1, 2]. Carbapenem은 광범위하고 강력한 β-lactam계 항

생제로 다제내성 세균으로 인한 심각한 감염을 치료하기 위해 사용된다. 그리고 extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*에 의한 감염 치료에 전통적으로 사용되어 왔으며, 현재까지 항생제 중 최후의 수단으로 간주되고 있다[3].

그러나 광범위한 carbapenem의 사용으로 carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*(CRE)가 빠르게 증가하며, 또한 carbapenemase를 생산하는 장내세균과(carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, CPE)의 확산은 공중 보건에 대한 세계적인 위협이 되고 있다[4]. 이처럼 항생제 내성은 오

Corresponding author: Byoung Seon Yang  
Department of Medical Laboratory Science, Jinju Health College, 51 Uibyeong-ro,  
Jinju 52655, Korea  
E-mail: ybseon@hanmail.net  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3707-5383>

늘날 가장 큰 위협 중 하나이며, 만약 어떤 조치도 취하지 않는다면, 약물에 내성이 있는 질병은 2050년까지 매년 천만 명의 사망자를 낼 수 있다고 보고되고 있다[5]. 그리고 제한된 항생제 옵션과 높은 사망률 때문에 다중 약물 내성(multidrug resistant, MDR)과 광범위한 약물 내성(extensively drug-resistant, XDR), 그람 음성 세균(gram negative bacteria, GNB)에 의한 감염은 글로벌 보건 기관의 주요 과제가 되었다[6-10].

$\beta$ -lactam계 항생제에 대한 내성기전으로 투과성 감소, 유출 펌프의 과발현, 항생물질 표적구조의 돌연변이와 변형, 가수분해에 의한 항생제 변형이 있다. 그 중에서 고투과성 porin이라 불리는 단백질(outer membrane protein, Omp)의 발현 감소로 외부 세포벽으로의 진입을 감소시킴으로써 항생제에 본질적으로 내성에 관련이 있을 수 있다. 대표적으로 *Pseudomonas aeruginosa*는 고전적인 고투과성 porin의 발현이 감소했기 때문에 다양한 항생제에 본질적으로 내성이 있으며, 이는  $\beta$ -lactam계 항생제에 대한 세균 내성의 중요한 사례이다[11].

그리고 장내세균과의  $\beta$ -lactam 내성은 주로  $\beta$ -lactam 고리를 절단하는 효소의 발현에 의해 유도된다. ESBL을 생성하는 세균의 증가는 carbapenem의 임상적 사용을 증가시켰을 뿐만 아니라 carbapenemase 활성을 증가시켰다. Carbapenemase는 큰 변종으로 장내세균과에서 처음으로 확인되었으며, 표적에서 serine과 공통의 부분을 갖는 것이 특징이다[11]. 이러한  $\beta$ -lactamase는 아미노산 서열에 따라 4개의 주요 그룹(class A, B, C, D)으로 분류된다. Class A는 활성 부위의 serine  $\beta$ -lactamase, class B는 metallo- $\beta$ -lactamase, class C는 AmpC  $\beta$ -lactamase, class D는 oxacillinases를 포함하며, 각 class는 carbapenem 등급의 항생제에 대해 다양한 활성을 갖는  $\beta$ -lactamase를 보유하고 있다. CPE는 carbapenem  $\beta$ -lactam 고리를 특이적으로 가수분해하는 획득된 carbapenemase 유전자를 발현하며, 일반적으로 획득된 플라스미드에서 발견되는  $\beta$ -lactamase의 앰블러 class A, B, D 그룹에 속하지만 염색체에 삽입된 다른 전달 가능한 유전 요소에서도 존재할 수 있다[12].

Class A는 ESBL과 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)를 포함하며, 염색체 암호화(*Serratia marcescens* enzyme (SME), non metallo carbapenemase A (NmcA), *Serratia fonticola* carbapenemase-1 (SFC-1), penicillinase (PenA), *Francisella philomiragia* carbapenemase (FPH-1), sulfhydryl variable-38 (SHV-38)), 플라스미드 암호화(KPC, guiana extended spectrum (GES), French imipenemase (FRI-1)), 또는 둘 다를 암호화(imipenemase, IMI)하는 형태

로 나뉜다[13]. 이 중 가장 잘 알려진 KPC는 전 세계에 퍼져 있으며, serine carbapenemase KPC는 1996년 *Klebsiella pneumoniae*에서 처음 확인되었고, 이후 대부분의 임상 장내 세균과 *P. aeruginosa*와 *Acinetobacter baumannii*와 같은 여러 종에서 형성되었다[14, 15]. KPC 유전자는 플라스미드 매개체이며, 전 세계적으로 발견되는 *K. pneumoniae* ST258의 우성 클론과 관련이 있다[16]. 이 KPC 유전자는 종종 pKP-Qil 플라스미드 또는 밀접하게 관련된 변이체에 의해 운반되며, 단일 아미노산 치환에 의해 구별 될 수 있는 단백질을 암호화하는 KPC 유전자는 대부분 유사한 활성을 유지하는 몇 가지 변형 형태도 있다[17]. 일반적으로 class A carbapenemase는 imipenem에 민감한 세균에 대한 민감성을 감소시키고, carbapenem을 포함한 다양한  $\beta$ -lactam의 가수분해를 가능하게 한다[18].

Class B  $\beta$ -lactamase는  $\beta$ -lactam을 가수분해하기 위한 금속 보조 인자로서 2개의 양이온(일반적으로  $Zn^{2+}$ )을 필요로 하기 때문에 metallo  $\beta$ -lactamase (MLB)로도 알려져 있다[19, 20]. MBL는 광범위한 기질 범위를 가지며 monobactams을 제외한 모든  $\beta$ -lactam계 항생제를 억제할 수 있다[21]. Class B에 속하는 MBL는 임상적으로 가장 관련성이 높은 carbapenemase이며, 구조적 및 기능적 점을 기반으로 B1, B2, B3의 세 가지 하위분류로 나뉜다[11]. 가장 빈번한 Verona integron-encoded MBL (VIM), imipenemase (IMP), New Delhi MBL (NDM)을 포함하여 임상적으로 관련된 가장 많은 MBL이 B1 하위분류에 속한다. 이러한 MBL은 일반적으로 이동성 플라스미드 또는 세균 간의 내성 유전자 전달을 용이하게 하는 염색체 내의 한 위치에서 다른 위치로 움직일 수 있는 DNA 서열인 transposon과 연결된 서로 다른 박테리아가 새로운 유전자의 비축 및 발현을 통해 빠르게 적응하고 진화할 수 있게 하는 유전자 장치인 integron 구조 내에 위치한다[22].

장내세균과에 의해 생성된 class D carbapenemase는 oxacillinase-48-like  $\beta$ -lactamases를 포함한다[3]. Oxa-type  $\beta$ -lactamases는 *A. baumannii* 및 *K. pneumoniae* 균주에서 발견된 효소 그룹으로, OXA-48 및 관련 변형은 감염 치료를 어렵게 만들기 때문에 임상적으로 관련이 있다[11, 23]. OXA-48과 유사한 carbapenemase는 penicillins와 carbapenems의 비교적 약한 가수분해를 유도하지만 cephalosporins는 유도하지 않는다. 그 결과 검출이 더 어려울 수 있으며, 이는 “유형 위협”이라고 불렸다[24]. 높은 수준의 carbapenem 저항성은 이러한 효소들이 ESBL과 같은 다른  $\beta$ -lactamases와 함께 발견될 때, 또는 투과성 결함으로 이어지는 porin 변화와 함께 발생할 수 있다[3].

현재 KPC는 미국, 이스라엘, 남아메리카 및 유럽과 아시아

아의 일부 국가에서 고유하며, class B New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase는 아시아, class D OXA-48-like carbapenemases는 북아프리카 및 유럽에서 우세하다[25].

현재 항생제 내성균의 주요 위협은 특히 carbapenem에 대한 내성을 발달시킨 MDR 그람 음성 균주이며, CRE와 함께 carbapenem resistant *A. baumannii* (CRAB), carbapenem resistant *P. aeruginosa* (CRPA)는 세계보건기구(world health organization, WHO)의 항생제 내성 “우선순위 병원체” 목록 중 최상위 단계에 위치한다[26].

그리고 carbapenemase의 생산은 전 세계의 carbapenem 내성의 기초가 되는 주요 메커니즘이며, 모든 나라의 공중 보건에 대한 우려이므로 항균 저항이 점점 더 증가함에 따라 면밀한 관찰을 필요로 한다. CRE의 확산을 제어하는 주요 과제 중 하나는 일상적인 임상 배양에 의해 식별된 CRE 감염 환자가 CRE를 보유한 환자의 일부만을 대표한다는 사실이다. 위장관의 집락화는 무증상이며, 집락화가 된 환자는 전파를 위한 저장고 역할을 한다. 이러한 carbapenemase producing carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CP-CRE)는 집락화 된 환자에 의해 의료 시스템에 도입되면 기관 내부와 기관 간에 빠르게 전파될 수 있다 [27]. CP-CRE에 의해 집락화 된 환자를 신속하게 식별하면 전염을 방지하기 위한 감염 관리 예방 조치를 시행할 수 있으며, 이러한 검사는 지역, 지역 및 국가 수준에서 이러한 높은 저항성 유기체의 확산을 막을 수 있는 잠재력을 가지고 있다. CP-CRE의 식별, 효과적인 항균 치료 및 감염 통제 개입의 시기적절한 시작 및 환자 결과 사이의 중요한 관계를 고려할 때, CP-CRE 탐지를 위한 신속한 검사가 분명히 필요하다. 신속한 진단은 제한된 치료 옵션과 높은 사망률로 공중보건에 위협을 고조하는 CRE의 감시, 진단 및 치료를 개선할 수 있는 잠재력을 가지고 있다[25].

이에 본 연구는 공중보건에 위협이 되고 있는 CPE의 식별 및 신속하고 정확한 검출을 위하여 2019년 10월부터 2020년 6월 까지 수집된 carbapenem 계열 약제에 내성을 가지는 그람 음성 막대균주를 사용하여 carbapenemase의 유전자형 중 *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>MP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 유전자를 표현형적 검사 및 분자진단으로 검출하고 관련 유전자 분포 양상을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 분석 균주

분석에 사용한 균주는 경남지역 종합병원에서 2019년 10월부터 2020년 6월까지 수집된 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile,

France) AST cards (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) 이용하여 imipenem, meropenem 및 ertapenem에 약제 내성이 확인된 그람 음성 막대균 41 균주를 대상으로 분석에 이용하였다.

### 2. 균주의 동정

분석에 이용한 분리 배양된 41 균주는 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용하여 Gram negative (GN) kit (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)로 세균 동정을 하였다. Trypticase soy agar (TSA)에서 증식된 단일 집락을 취한 후 부유액의 탁도가 McFarland 0.5가 되도록 한다. 균액을 GN kit에 펠링한 후 VITEK 장치 오른쪽 아래에 있는 loader에 문이 열리면 카셋트를 넣는다. 그 후 VITEK 프로그램에서 동정 된 균주 및 정확도를 확인하였다.

### 3. 표현형적 carbapenemase 선별 시험법

분석에 이용한 41 균주는 carbapenemase 선별검사로 디스크 확산법을 시행하였다. 검사 균주 부유액은 McFarland 0.5로 맞춘 후 Mueller Hinton 배지에 면봉으로 고루 접종하였다. 그 후 배지의 중앙에 imipenem, meropenem 및 ertapenem (10  $\mu$ g, BBL, Cockeysville, MI, USA)를 접종 후 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하고, clinical and laboratory standards institute (CLSI)의 기준을 따라 항균제별 디스크 억제대 직경을 측정하여 판독하였다[28]. Carbapenemase 표현형 검출은 modified Hodge test (MHT)를 이용하였다. 표준 균주 *E. coli* ATCC 25922를 McFarland 0.5로 부유액을 만든 후 부유액을 식염수에 넣어 1:10으로 희석하였다. 이후 부유액을 MacConkey 배지(BD Difco, New Jersey, USA)에 고르게 도말하였다. 일반적으로 MHT 검사법은 Muller-Hinton 배지를 이용하나 MacConkey 배지의 담즙 화합물의 존재 하에서 세 포로부터  $\beta$ -lactamase의 방출이 향상되므로 CPE의 검출 민감도 상승을 위하여 MacConkey 배지로 변형하여 실시하기도 한다[29].

그리고 각각 10  $\mu$ g imipenem, meropenem 및 ertapenem 디스크를 배양접시 가운데에 올려준 후 피검균주는 백금이에 묻혀 디스크에서 배양접시 가장자리까지 그어주었다. 배양기에서 18~24시간 배양 다음날 희석 된 균주 주위로 클로버 잎과 같이 움푹 들어간 상태(clover leaf-like indentation)로 자라면 양성으로 판정하였다[28]. 그리고 선별검사에서 carbapenemase inhibition test (CIT)를 이용하여 class A carbapenemase (KPC) 및 class B carbapenemase (MBL) 생성 유무를 확인하

였다. 피검균주는 McFarland 0.5로 균주 부유액을 만든 후 Muller Hinton 배지에 도말하였다. Meropenem 디스크 3개를 적절한 간격으로 놓는 후 디스크 중 하나는 Class A carbapenemase (KPC)의 검출을 위해 phenylboronic acid (PBA)를, 다른 하나에는 class B carbapenemase (MBL)의 검출을 위해 ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) 시약을 각각 10 µL씩 떨어뜨린다. 37°C 배양기에서 16~20시간 배양한 후 각각의 디스크 억제대를 측정하였고, CIT의 검사방법 및 결과해석은 CPE 진단법 지침서를 따라 판독하였으며, MHT와 CIT의 검사결과를 바탕으로 통합 해석을 하였다[30].

#### 4. PCR을 통한 카바페넴 내성 유전자 검출

분석에 이용한 41 균주에서 핵산을 추출한 후 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 핵산의 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Wisconsin, USA)의 Gram negative (GN) 방법을 이용하였다. 그 후 carbapenem 분해효소 중 5종(KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48-like)에 대한 유전자 검사를 실시하였다(Table 1) [31-37]. AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) 에 각각 5 pmol의 primer 1 µL, DNA 2 µL, 증류수를 혼합하여 총 20 µL의 반응용액을 만들었다. Dual block PCR C-1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)를 사용하여 95°C에서 5분 반응 후, 95°C에

서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분씩 총 35회 증폭 반응을 시키고, 이후 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 증폭된 PCR 반응 산물은 ethidium bromide (EtBr)를 포함한 2% agarose gel에서 100 volt 전압에서 40분간 전기영동하여 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 염기서열의 분석은 BigDye Terminator V3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)와 ABI3730XL (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)을 이용하였고, 결정된 염기서열은 미국 국립생물공학 정보센터(national center for biotechnology information, NCBI)의 홈페이지에서 제공하는 blast 프로그램(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 비교분석하였다.

#### 5. Real-time PCR의 용해 곡선 분석을 이용한 carbapenemase 유전자 진단

실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)의 용해 곡선(melting curve) 분석을 이용한 유전자형 진단을 위해 iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)를 사용하여 real-time PCR을 실시하였다. 반응액의 조성은 iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix 10 µL, primer 혼합액 1 µL, DNA 1 µL 및 증류수 8 µL를 넣어 총 20 µL를 제조하였다. CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

**Table 1.** Primers for the detection of carbapenemase-producing bacteria

Gene	Amplicon size (bp)	Primer sequences	GeneBank accession number	Reference
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	785	5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3' 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'	EU784136	[31]
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	621	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTC-3' 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'	FN396876.1	[32]
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	587	5'-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3' 5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'	AF244145.1	[33]
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	389	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	AF191564.1	[33]
<i>bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	438	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCAACCG-3'	ON651448.1	[33]
<i>qbla<sub>KPC</sub></i>	106	5'-TTGTTGATTGGCTAAAGGG-3' 5'-CCATACACTCCGCAGGTT-3'	EU244644	[34]
<i>qbla<sub>NDM</sub></i>	128	5'-GATCCTCAACTGGATCAAGC-3' 5'-CATTGGCATAAGTCGCAATC-3'	JQ060896.1	[35]
<i>qbla<sub>IMP</sub></i>	172	5'-TTGACACTCCATTTACTGCTA-3' 5'-TCATTTGTTAATTCAGATGCATA-3'	KF723585	[36]
<i>qbla<sub>VIM</sub></i>	247	5'-GAGTTGCTTTTGATTGATACAG-3' 5'-TCGATGAGAGTCCTTCTAGA-3'	GQ288396	[36]
<i>qbla<sub>OXA-48-like</sub></i>	100	5'-GTAGCAAAGGAATGGCAA-3' 5'-CCTTGCTGCTTATTCTCA-3'	ON586156.1	[37]

(Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)을 이용하여 real-time PCR을 실시하였고, 균주는 두 번 반복하여 실험으로 분석을 진행하였다. KPC, NDM의 유전자는 95℃에서 5분 반응 후 95℃에서 10초, 60℃에서 30초, 72℃에서 10초의 반응을 총 40회 반복하였으며, IMP, VIM, OXA-48-like 유전자는 95℃에서 5분 반응 후 95℃에서 10초, 55℃에서 37초, 72℃에서 10초의 반응을 40회 반복하였다. 분석에 이용한 모든 유전자는 마지막 PCR 반응이 끝난 후 65℃에서 95℃까지 초당 0.5℃의 속도로 온도를 증가시키면서 용해 곡선을 분석하였다. 최소검출농도(limit of detection, LOD)의 확인은 표준곡선을 이용하여 분석하였다. SYBR green에서 비특이적 증폭 산물의 생성 여부 확인을 위해 no-template control (NTC)을 실시하였고, NTC의 반응조성은 주형을 제외한 나머지 반응액이며, 반응조건은 분석과정과 동일하게 진행하였다.

## 결 과

### 1. 검체의 특성

본 연구는 경남지역 종합병원에서 수집된 41 균주를 대상으로 분석을 하였고, 균주는 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 식별하였다. 분석결과 *Acinetobacter baumannii* 9균주, *Pseudomonas aeruginosa* 9균주, *Klebsiella pneumoniae* 8균주, *Escherichia coli* 5균주, *Enterobacter cloacae* 3균주, *Enterobacter aerogenes* 2균주,

*Acinetobacter pittii* 1균주, *Citrobacter freundii* 1균주, *Pseudomonas putida* 1균주, *Pseudomonas rhodesiae* 1균주, *Serratia marcescens* 1균주를 확인하였다. 분리된 검체의 빈도는 urine 12개(29.3%), blood 9개(22%), sputum 8개(19.5%), tracheal aspirates 4개(9.8%), broncheal aspirates 3개(7.3%), ascitic fluid 1개(2.4%), pus 1개(2.4%), other 3개(7.3%) 순으로 나타났다(Figure 1).

### 2. 표현형적 carbapenemase 선별 시험법

임상검체 중 식별된 모든 균주에 대해 imipenem, meropenem 및 ertapenem 약제를 이용 하여 디스크 확산법을 시행하였고, 항생제 감수성 시험은 CLSI 가이드라인의 내성판정 기준으로 하였다[28]. 그 후 선별시험인 MHT를 실시하여 결과를 판독하였고, ertapenem을 이용한 MHT 결과 41균주 모두에서 양성 결과를 확인하였다(Table 2).

그리고 선별시험으로 CIT 검사를 실시하였고, 분석결과 meropenem+PBA에서 41균주 중 18균주에서 양성 결과를 확인하였고, 균주는 *K. pneumoniae* 7균주, *P. aeruginosa* 4균주, *E. coli* 4균주, *E. aerogenes* 2균주, *C. freundii* 1균주로 나타났다. Meropenem+EDTA의 분석결과 41균주 중 8균주에서 양성을 확인하였고, 균주는 *E. cloacae* 3균주, *A. baumannii* 2균주, *K. pneumoniae* 1균주, *E. coli* 1균주, *P. aeruginosa* 1균주로 나타났다(Table 3).

그리고 MHT와 CIT의 결과를 바탕으로 통합 해석을 하였고, 분석결과 KPC 18균주, class B cabapenemase 8균주, class D cabapenemase 15균주를 확인하였다(Table 2).

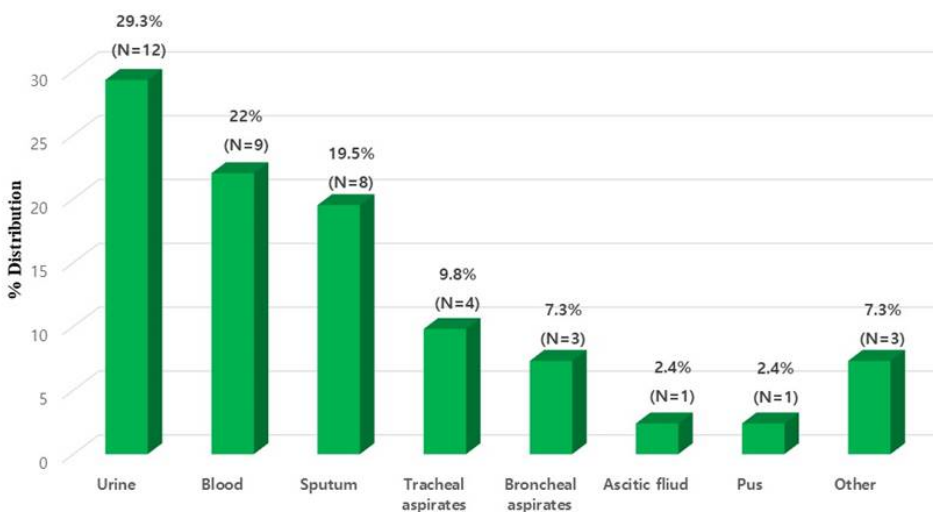


Figure 1. Frequency of detection in specimens.



**Table 2.** Carbapenem resistance gram negative rod bacteria analyzed in screening test

No.	ID	Strain	Disk diffusion			Modified Hodge test	Carbapenemase inhibition test		Interpretation
			IMP	MEM	ETP		MEM+EDTA	MEM+PBA	
1	KBN12P06891	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
2	KBN12P06956	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
3	KBN12P07156	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
4	KBN12P07157	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
5	KBN12P06899	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
6	KBN12P06900	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
7	KBN12P06901	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
8	KBN12P06957	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
9	KBN12P06958	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
10	KBN12P06847	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
11	KBN12P06890	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
12	KBN12P06954	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
13	KBN12P06953	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
14	KBN12P06896	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
15	KBN12P07135	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
16	KBN12P06893	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
17	KBN12P06894	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
18	KBN12P06895	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
19	KBN12P06952	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
20	KBN12P06951	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	I	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
21	KBN12P06844	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
22	KBN12P06845	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
23	KBN12P06846	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
24	KBN12P06863	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	I	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
25	KBN12P06864	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
26	KBN12P06865	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
27	KBN12P07178	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
28	KBN12P07179	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
29	KBN12P07180	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
30	KBN12P07083	<i>Acinetobacter pittii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
31	KBN12P06831	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
32	KBN12P07166	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
33	KBN12P06862	<i>Pseudomonas putida</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
34	KBN12P07183	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
35	KBN12P07181	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
36	KBN12P06866	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
37	KBN12P06867	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
38	KBN12P07182	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
39	KBN12P06868	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
40	KBN12P06848	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
41	KBN12P06849	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase

Abbreviations: R, resistant; I, intermedius; IMP, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; KPC, klebsiella pneumoniae carbapenemases; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; PBA, phenylboric acid.

**3. 분자생물학적 방법을 이용한 carbapenemase 유전자 검출**

분석에 이용된 모든 균주에 대해 carbapenemase 중 5종 (KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48-like)에 대한 유전자검사를 시행되었다(Figure 2). 분석결과 41균주 중 bla<sub>KPC</sub> 유전자는

28개, bla<sub>NDM</sub> 유전자는 25개, bla<sub>IMP</sub> 유전자는 5개, bla<sub>VIM</sub> 유전자는 1개, bla<sub>OXA-48-like</sub> 유전자는 13개의 양성 균주를 확인하였다(Table 4).

증폭된 bla<sub>KPC</sub> 28균주의 분석결과, *P. aeruginosa* 8균주, *A. baumannii* 6균주, *K. pneumoniae* 5균주, *E. coli* 4균주, *E. aerogenes* 2균주, *A. pittii* 1균주, *C. freundii* 1균주, *S.*



*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>IMP</sub> 4균주 분석결과, *P. aeruginosa* 3균주, *A. pittii* 1균주로 나타났으며, *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>OXA-48-like</sub> 4균주 분석결과, *E. coli* 2균주, *A. baumannii* 1균주, *C. freundii* 1균주로 나타났다.

이후 분석에 이용한 유전자는 모두 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인하였고, NCBI의 blast 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교분석하였다. *bla*<sub>KPC</sub> 유전자의 경우 Genebank No. CP094994.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 3개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다. *bla*<sub>NDM</sub> 유전자의 경우 Genebank No. CP095662.1에서 상동성(homology)은 평균 100%이며, 염기의 누락은 없음(Gap 0%)을 확인하였다. *bla*<sub>IMP</sub> 유전자의 경우 Genebank No. AP022367.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 2개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다. *bla*<sub>VIM</sub> 유전자의 경우 Genebank No. MN256633.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 3개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다. *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 유전자의 경우 Genebank No. MN654419.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 1개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다.

4. 용해 곡선 분석을 이용한 carbapenemase 유전자 검출

분석에 이용한 균주는 모두 2 반복 실험으로 진행하였으며, NTC 분석결과 검체 이외에 증폭되는 산물이 없음을 확인하였다. 분석에서 표본이 30 사이클의 교차점(crossing point, Cp)

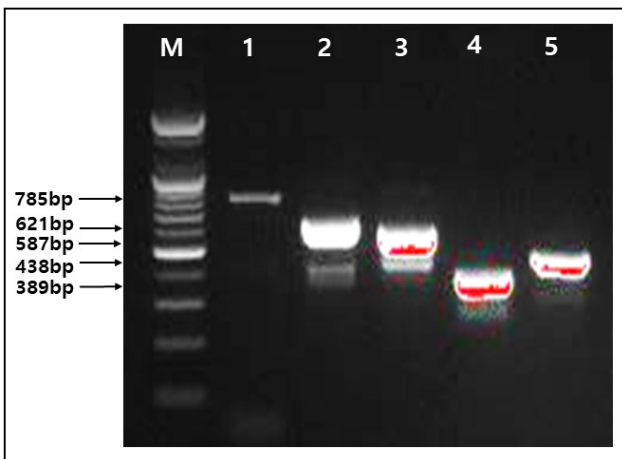


Figure 2. PCR amplification profile of the carbapenemase gene from the gram negative rod bacteria isolates. M, 100 bp DNA ladder marker; 1: *bla*<sub>KPC</sub> gene, size of 785 bp; 2: *bla*<sub>NDM</sub> gene, size of 621 bp; 3: *bla*<sub>IMP</sub> gene, size of 587 bp; 4: *bla*<sub>VIM</sub> gene, size of 389 bp; 5: *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gene, size of 438 bp; M, 100 bp DNA ladder marker.

이전에 임계값을 초과할 경우 양성으로, Cp가 30보다 클 경우 음성으로 간주하였다. Real-time PCR 분석결과 41균주 중 *bla*<sub>KPC</sub> 유전자는 28개, *bla*<sub>NDM</sub> 유전자는 25개, *bla*<sub>IMP</sub> 유전자는 5개, *bla*<sub>VIM</sub> 유전자는 1개, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 유전자는 13개의 양성 균주를 확인하였으며, 이는 PCR 결과와 100% 일치하였다. 증폭된 유전자의 평균 cycle threshold (Ct) 값은 *bla*<sub>KPC</sub> 17.23±1.65, *bla*<sub>NDM</sub> 21.44±3.85, *bla*<sub>IMP</sub> 17.42±4.02, *bla*<sub>VIM</sub>은 19.22±0.21, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>은 24.01±4.79로 나타났으며, 음성으로 나타난 균주에서는 증폭 산물이 없었다. 증폭 산물의 용해 곡선 분석 결과 *bla*<sub>KPC</sub>는 melting temperature (Tm) 87.5°C, *bla*<sub>NDM</sub>은 Tm 88°C, *bla*<sub>IMP</sub>은 Tm 81°C, *bla*<sub>VIM</sub>은 Tm 88.5°C, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>은 Tm 79°C을 확인하였다(Figure 3). 증폭이 확인 된 검체를 이용하여 표준곡선분석을 실시하였고, 최소검출농도(limit of detection, LOD)를 확인한 결과 *bla*<sub>KPC</sub> 유전자는 21.48 ng/mL, *bla*<sub>NDM</sub> 유전자는 31.38 ng/mL, *bla*<sub>IMP</sub> 유전자는 31.38 ng/mL, *bla*<sub>VIM</sub> 유전자는 19.77 ng/mL, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 유전자는 36.39 ng/mL,으로 확인되었다.

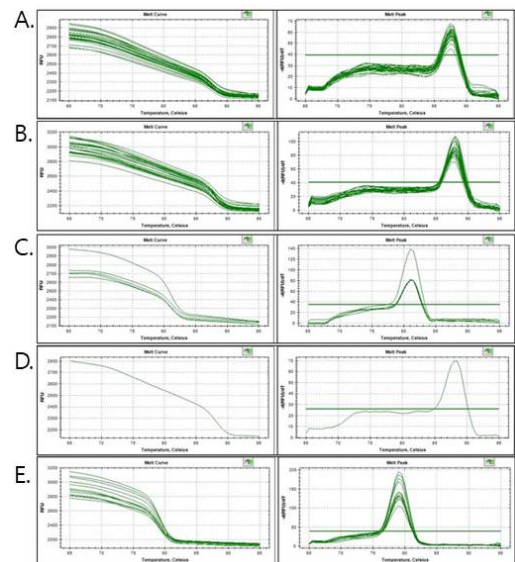


Figure 3. Melting curve analysis of carbapenemase gene. (A) melting curve analysis of *bla*<sub>KPC</sub> amplicon was generated that showed the fragment melting temperature (Tm) 87.5°C. (B) melting curve analysis of *bla*<sub>NDM</sub> amplicon was generated that showed the fragment Tm 88°C. (C) melting curve analysis of *bla*<sub>IMP</sub> amplicon was generated that showed the fragment Tm 81°C. (D) melting curve analysis of *bla*<sub>VIM</sub> amplicon was generated that showed the fragment Tm 88.5°C. (E) melting curve analysis of *bla*<sub>OXA-48-like</sub> amplicon was generated that showed the fragment Tm 79°C.



## 고 찰

다제내성균주는 여러 종류의 항생제에 내성을 가진 미생물로, 이들 중 일부는 의료 관련 감염의 대부분을 담당하며 항균제의 작용을 회피할 수 있다. 다제내성균주에 의한 심각한 감염의 유행률은 수년간 지속적으로 증가해왔으며 국제 여행, 이주 및 한 국가에서 다른 국가로 환자의 이동은 이러한 감염의 확산 위험을 증가시켰으며, 이러한 의료 관련 감염은 전 세계적으로 증가하는 이환율과 사망률의 주요 원인이다[38]. ESBL encoding 유전자 및 carbapenemase encoding 유전자와 같은 이동성 요소에서 발견되는 일부 내성 결정인자의 전파를 예방하기는 어렵다. 그리고 플라스미드로 암호화 된 내성 유전자를 가지고 있는 CPE는 내성 유전자를 다양한 그람 음성 막대균들 사이에서 수평으로 전달하며, 특히 장내세균이 생산하는 carbapenemase가 공중보건 관점에서 가장 큰 관심을 갖는다. *K. pneumoniae*이나 *E. coli* 이외의 CPE의 비율이 지속적으로 증가하는 것은 장내 세균의 저장고인 장관에서 발견된 다른 세균에 의한 유전자 재조합과 새로운 저항성 유전자 결정인자 획득 때문일 수 있어 우려스럽다[39]. 그리고 CPE의 병원 내 전파 및 병원 간 확산은 국가 간 보다는 국가 내에서 더 빈번하게 일어나므로 CPE와 같은 의료 관련 감염의 확산을 줄이기 위해 환자에 대한 감시 프로그램을 구현하는 것이 필요하다[39, 40].

이에 본 연구는 CPE의 식별 및 신속하고 정확한 검출을 위하여 carbapenem 약제에 내성이 확인된 그람 음성 막대균 41균주를 이용하여 표현형적 검사 및 carbapenemase 유전자를 분자진단으로 검출하고 관련 유전자 분포 양상을 확인하였다.

유전자 진단을 위해 분석에 이용된 모든 균주에 대해 *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 유전자에 대한 검사를 실시하였으며, 양성으로 나온 균주는 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인하였고, 그 결과 분석에 이용한 모든 유전자에서 평균 99%의 상동성(homology)을 확인하였다.

표현형적 검사의 통합해석 결과와 PCR 결과를 비교 분석한 결과 통합해석에서 KPC 생성균주는 18균주, PCR 검사는 28균주가 양성으로, 표현형적 검사법에서 10균주(35.7%)의 위양성을 확인하였다. 그리고 통합해석 결과에서 NDM 생성 추정균주는 8균주, PCR 검사는 25균주가 양성으로, 표현형적 검사법에서 17균주(68%)의 위양성을 확인하였다. 그리고 통합해석 결과에서 class D carbapenemase (OXA-48-like) 생성균주는 15균주, PCR 검사는 13균주가 양성으로, 표현형적 검사법에서 2균주(13.3%)의 위양성을 확인하였다.

일반적으로 사용되는 표현형 검사인 MHT는 CRE의 잠재적

KPC 생성 균주를 감지하기 위해 가장 일찍 적용되었으나 NDM 및 OXA-48-like CPE 검출에서 낮은 민감도를 보였으며, ESBL 및 또는 AmpC  $\beta$ -lactamases 과생산과 결합된 porin 변화로 인해 CRE에서 위양성 결과를 나타냈다[41]. 그리고 억제제를 이용한 CIT검사에서 boronate를 기반으로 하는 검사는 KPC 생산 균주의 검출에 높은 민감도를 보이나, AmpC형  $\beta$ -lactamase의 높은 발현 및 porin 결핍때문에 carbapenem에 대한 감수성이 감소된 분리균주에서 특이성 문제가 발생할 수 있다[42].

최근에는 MHT와 CIT의 단점을 보완한 Carba NP 검사와 그 변형 방법은 CRE 및 CR-*P. aeruginosa*의 다양한 carbapenemases 검출에 적합하며 15~30분 이내에 결과를 제공하는 편리한 생화학 검사이므로 임상 미생물분야에서 적용되고 있다. 그리고 변형된 카바페넴 불활성화 방법(modified carbapenem inactivation method, mCIM)과 EDTA-변형 CIM (eCIM) 테스트를 활용하면 MBL 생성 CRE 균주를 serine-class carbapenemase 생성균주와 신뢰성 있게 구별할 수 있다. 그럼에도 불구하고, mCIM/eCIM 검사는 결과를 얻는데 약 6~12시간이 걸리고 주관적으로도 해석이 되며, 또한 CPE보다 VIM 생성 *P. aeruginosa* 및 OXA 생성 *A. baumannii* 분리 검출에서 조금 더 잘 수행되었다[41].

이처럼 초기 표현형 검사방법으로 활용된 MHT 및 CIT 검사는 여러 판독적 오류 및 효소 종류에 따른 낮은 검출 효율로 인해 정확한 항생제 내성 유전자형을 확인하기가 어렵다. 이를 보완한 검사법인 Carba NP와 mCIM 및 eCIM는 검사 해석에 있어 주관적인 견해가 반영될 수 있으며, 비핵산기반 검출법으로 하나의 유전자가 아닌 여러 유전자를 동시에 가지는 경우 동시검출과 같은 확인이 힘들다는 문제점을 확인할 수 있었다.

PCR 및 real-time PCR 검사 분석결과 41균주 중 *bla<sub>KPC</sub>* 28균주(68.3%), *bla<sub>NDM</sub>* 25균주(61%), *bla<sub>IMP</sub>* 5균주(12.2%), *bla<sub>VIM</sub>* 1균주(2.4%), *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 13균주(31.7%)를 확인하였다.

국내 연구에서 2022년 Choi와 Lee의 연구[40]에 따르면 *bla<sub>KPC</sub>* 68.9%, *bla<sub>NDM</sub>* 25.2% 및 *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 1.5%의 검출률을 확인하였고, 2021년 Yang과 Park의 연구[42]에서는 *bla<sub>KPC</sub>* 71.4%, *bla<sub>NDM</sub>* 22.9% 검출률을 확인하였다. 그리고 2018~2019년 한국 국가 데이터에서는 *bla<sub>KPC</sub>* 70.0%, *bla<sub>NDM</sub>* 24.0%로 나타났으나 전 세계적 조사에 따르면 *bla<sub>KPC</sub>* 가 53.18%로 가장 흔한 유전자이고, 그 다음으로는 *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 유전자가 20.09%, *bla<sub>NDM</sub>*이 19.42%로 나타났다[40]. 또한 Han 등의 연구[4]에서 CRE 중에서 *bla<sub>KPC-2</sub>* (51.6%)와 *bla<sub>NDM</sub>* (35.7%)이 가장 흔한 carbapenemase 유전자임을 발견하였고, 최근 및

년 동안 *bla*<sub>OXA-232</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> 및 기타 다양한 carbapenemase 유전자의 출현이 증가하고 있음을 확인하였다. 본 연구의 결과에서도 기존의 유전자 뿐만 아니라 다양한 carbapenemase 유전자의 출현을 확인 할 수 있었으며, 특히 class B carbapenemase 유전자의 검출이 증가했음을 확인 할 수 있었다.

그리고 41균주 중 두가지 이상의 유전자를 가지는 18 균주 (43.9%)를 확인하였고, 분석결과 *Pseudomonas* spp.가 18균주 중 10균주(55.6%)로 대다수를 차지하였고, 다음으로 *Acinetobacter* spp.이 4균주(22.2%)로 나타났다.

이전의 연구에 따르면 NDM과 OXA-48-like carbapenemase가 널리 전파된 이집트에서 2016년 10월부터 2017년 9월 사이에 수집된 CRE의 약 90%는 하나 이상의 carbapenemase encoding 유전자를 가지고 있었다[43]. 또한 KPC-2, NDM 및 OXA-48-like carbapenemase가 CRE에서 우세하게 검출된 중국에서는 carbapenemase를 생산하는 935개 균주 중 9개의 균주가 다중 carbapenemase를 생산하는 것을 확인 할 수 있었다[4]. 2022년 Täläpan과 Rafila의 연구에서는 [39] MDR/XDR *P. aeruginosa* 및 *A. baumannii*와 다중 carbapenemase 증가를 확인 할 수 있었으며, 다중유전자의 형태로는 MBL+KPC 0.65%, OXA-48+MBL 4.56%, OXA-48+KPC+MBL 0.97%로 나타났고, 균주로는 *K. pneumoniae*가 가장 많은 비중을 차지하였다.

1940년 penicillinase의 발견 이래 가수분해에 의한 항생제의 변형은 항생제 내성의 주요 메커니즘으로 이러한 효소의 특징은 carbapenem과 확장 스펙트럼 cephalosporin을 포함한 광범위한  $\beta$ -lactam을 비활성화하는 능력을 가지며, 가장 최근에  $\beta$ -lactamase는 mannose-binding lectine MBL 및 기타 carbapenemase로 활동 영역을 넓혔다[11].

일반적으로 그람 음성 세균에서  $\beta$ -lactamase는 비교적 적은 양으로 발견되지만, 내 외측 세포막 사이의 원형질막 공간에 위치하며, 세포벽 합성에서  $\beta$ -lactamase는 내막의 외부 표면에 있기 때문에 미생물에서의 극대화를 위해 전략적으로 위치한다. 그리고 그람 음성 세균의  $\beta$ -lactamase는 염색체 또는 플라스미드에 암호화되며, 다양한  $\beta$ -lactam 항생제를 가수분해할 수 있다. 대부분의 세균은 한 가지 형태의 효소를 생성하지만, 서로 다른 미생물들은 많은 별개의  $\beta$ -lactamase를 정교하게 만든다[11].

Carbapenemase의 class A, C, D는 모두 표적에서 serine과 공통의 부분을 갖는 것이 특징이며[11], class B는 이러한 중간체를 형성하지 않는 MBL를 포함한다. carbapenem  $\beta$ -lactam 고리를 특이적으로 가수분해하는 획득된 carbape-

nemase 유전자를 발현하며, 일반적으로 획득된 플라스미드에서 발견되는  $\beta$ -lactamase의 앰블러 class A, B, D 그룹에 속하지만 염색체에 삽입된 다른 전달 가능한 유전 요소에서도 존재할 수 있다[12].

그리고 최근 몇 년 동안 *P. aeruginosa*의 carbapenem 내성 비율은 전 세계적으로 증가했으며, 이는 환자에 대한 치료 옵션을 상당히 제한하기 때문에 큰 관심사가 되었다[44].

그람 음성 세균 저항성의 기초인 유출 유전자의 과잉 발현은 돌연변이 메커니즘에 의해 조절되며, *P. aeruginosa*의 carbapenem 저항성은 염색체 치환으로 인해 porin 손실 및 유출 펌프 과잉 발현을 통한 막 투과성 변화, 내재적인  $\beta$ -lactamase 억제, carbapenemase 유전자 획득에 의해 유발된다. 이러한 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*는 유전 요소의 이동과 고위험 복제의 기여를 통해 빠르게 퍼져 나갔으며, 지금까지 *P. aeruginosa*에서 확인된 carbapenemase는 class A, B, D이며, 이 중 class B MBL은 임상에서 분리된 *P. aeruginosa*에 의해 생산되는 carbapenemase의 가장 일반적인 유형이다[20].

*A. baumannii*는 *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa*에 비해 덜 치명적인 병원체로 간주되지만 다른 그람 음성 균주에 광범위한 저항 유전자를 확산시키는 데 중요한 역할을 한다는 것이 인정되었다[13, 25]. *A. baumannii*는 MBLs와 같은 carbapenem 내성 유전자를 빠르게 획득할 수 있으며, MBLs를 생성하는 *A. baumannii* 변종은 이란에서 자주 보고되고 있다. *A. baumannii*는  $\beta$ -lactam 항생제에 대항하는 몇 가지 메커니즘을 사용하는 것으로 보이며, 표현형과 유전자형 분석을 모두 적용하여 약제 내성 패턴에 대한 더 많은 연구를 필요로 한다[36].

2010년 처음으로 국내에 CRE가 보고된 이래로 꾸준히 carbapenemase 유전자의 출현을 확인 할 수 있었으며[40, 42], 본 연구에서는 특히 class B carbapenemase 유전자의 검출이 증가했음을 확인 할 수 있었다. 또한 이전의 국내연구에서는 보고되지 않는 여러 carbapenemase 유전자를 가지는 균주의 검출을 확인하였다. 이는 *K. pneumoniae*이나 *E. coli* 이외의 CPE의 비율이 지속적으로 증가하는 것은 유전자 재조합과 장내 세균에 의한 새로운 저항 유전자 결정인자 획득 때문일 수 있어 우려스럽다[39].

CRE, 제3세대 cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*(3GC-R), multidrug resistant *P. aeruginosa*(MRPA), multidrug resistant *Acinetobacter* species (MRAS) 등과 같은 항생제 내성균주로 인한 감염은 환자에 있어 치료 옵션이 대단히 제한적이며, 감염의 시작과 전달 사이의 48~72시간 이내에 적절한 항생제 처리는 매우 중요하나 감염성 보고 및 배양

전에 감염을 인식하지 못하는 경우가 많기 때문에 적절한 치료를 받기 매우 힘든 상황이다[43]. KPC, NDM 및 OXA-48-like를 포함하는 carbapenemase의 생산은 임상에서 분리된 CRE 중 가장 일반적인 저항 메커니즘이며[45], 저항성 유전자와 저항성 유기체, 그리고 그들의 전파를 통제하기 위해서는 더 많은 지식이 필요하다[36]. 이러한 CRE의 신속한 검출을 위해 수 많은 핵산 및 비핵산 기반 방법이 현재 사용 중이거나 개발 중에 있으며, 미래의 검사는 일반적인 carbapenemase의 분자 검출과 비핵산 둘 다에 대한 빠른 방법을 채택하여 분리된 균주의 전반적인 항균 감수성을 결정할 수 있을 것으로 예상할 수 있다[25].

현재 CLSI 가이드라인에 따른 표현형적 검사법은 비핵산 기반 검출방법으로 carbapenemase 생성 의심균주의 검사에서 분리 후 첫 결과까지 많게는 24~48시간이 소요되며, 주관적인 해석과 다중 carbapenemase를 생성하는 경우 유형을 구분하기 힘든 단점을 가진다. 그러나 유전자별로 별도의 probe를 준비할 필요가 없어 광범위하게 활용되는 SYBR Green을 이용한 real-time PCR 분석법은 일반적인 PCR 방법보다 시간과 오염에 대한 문제점이 감소하고, 이전의 연구에서[46] turn around time 단축의 이점을 제공한다고 알려져 있다. 또한 다른 진단 검사 방법보다 높은 특이성과 민감도를 가지며 신속하고 정확하게 저항성 유전자를 가지는 균주를 검출하는 것을 확인하였다[43].

CPE를 확산시키는 메커니즘은 transposon과 플라스미드를 매개하기 때문에 전파속도가 non-CPE에 비해 우수하며 CPE에 의한 저항이 실질적으로 CRE의 대다수를 차지한다. 그러므로 유전자의 빠른 수평 및 수직 전달 가능성을 고려하여, 이러한 저항성 유전자의 정확하고 시기적절한 식별은 감염 통제 조치를 돕고 적절한 항균 치료의 선택을 안내하는 중요한 도구가 될 것이므로, 약물 내성 병원체에 대한 감시 연구는 필수적이다[20].

결론적으로 real-time PCR과 같은 신속하고 특이성이 높은 검사를 통한 적극적인 감시와 CRE 조기진단을 통한 유전자 확인은 제한된 치료 옵션과 높은 사망률로 공중보건 위협을 고조하는 CRE의 감시, 진단 및 치료를 개선할 수 있으며 전염을 방지하기 위한 효과적인 항균 치료 및 시기적절한 감염 통제가 가능할 것으로 사료된다.

## 요약

본 연구는 공중보건에 위협이 되고 있는 carbapenemase 유전자형 중 *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 유전자의 표현형적 검사 및 분자진단으로 검출하고 관련 유전자 분

포 양상에 대해 알아보았다. 표현형적 검사결과 MHT는 41균주 모두에서 양성을 확인하고, CIT는 meropenem+PBA는 18균주 및 meropenem+EDTA에서 8균주의 양성을 확인하였다.

PCR 결과 *bla*<sub>KPC</sub> 28균주, *bla*<sub>NDM</sub> 25균주, *bla*<sub>IMP</sub> 5균주, *bla*<sub>VIM</sub> 1균주, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 13균주에서 증폭 산물을 확인하였다. 또한 *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub> 7균주, *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>IMP</sub> 1균주, *bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>OXA-48-like</sub> 1균주, *bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>VIM</sub> 1균주, *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>IMP</sub> 4균주, *bla*<sub>KPC</sub>+*bla*<sub>NDM</sub>+*bla*<sub>OXA-48-like</sub> 4균주를 확인하였다. 실시간 증합효소 연쇄반응을 이용한 용해 곡선 분석결과는 PCR 결과와 100% 일치함을 확인하였다.

결론적으로 real-time PCR을 이용한 신속하고 특이성이 높은 CRE 조기진단을 통한 유전자 확인은 제한된 치료 옵션과 높은 사망률로 공중 보건 위협을 고조하는 CRE의 감시, 진단 및 치료를 개선할 수 있으며 전염을 방지하기 위한 효과적인 항균 치료 및 시기적절한 감염 통제가 가능할 것으로 사료된다.

**Acknowledgements:** This paper was supported by the Jinju Health College in 2021. The pathogen resources for this study were provided by Gyeongsang National University Hospital Branch of the National Culture Collection for Pathogens (GNUH-NCCP).

**Conflict of interest:** None

**Author's information (Position):** Yang BS, Professor.

## REFERENCES

1. Feil EJ. *Enterobacteriaceae*: joining the dots with pan-European epidemiology. *Lancet Infect Dis*. 2016;17:118-119. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30333-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30333-4)
2. 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>
3. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2016;8:460-469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
4. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, et al. Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from adult and children patients in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:314. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00314>
5. World Health Organization. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. [Internet]. New York: World Health Organization; 2019[cited 2022 March 22]. Available from: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls>

- for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis.
6. Li J, Bi W, Dong G, Zhang Y, Wu Q, Dong T, et al. The new perspective of old antibiotic: in vitro antibacterial activity of TMP-SMZ against *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53:757-765. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.12.013>
  7. Chen HY, Jean SS, Lee YL, Lu MC, Ko WC, Liu PY, et al. Carbapenem-resistant Enterobacterales in long-term care facilities: a global and narrative review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:601968. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.601968>
  8. Wang CH, Ma L, Huang LY, Yeh KM, Lin JC, Siu LK, et al. Molecular epidemiology and resistance patterns of bla OXA-48 *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: a nationwide multi-center study in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021;54:665-672. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.04.006>
  9. Zhang H, Jia P, Zhu Y, Zhang G, Zhang J, Kang W, et al. Susceptibility to imipenem/relebactam of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from Chinese intra-abdominal, respiratory and urinary tract infections: SMART 2015 to 2018. *Infect. Drug Resist.* 2021;14:3509-3518. <https://doi.org/10.2147/IDR.S325520>
  10. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global threat of carbapenem resistant gram-negative bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:823684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
  11. Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, Pota V, Giaccari IG, Coppolino F, et al. Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotics.* 2022;11:421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
  12. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:831-838. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
  13. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:568-585. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
  14. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
  15. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 2006;12:223-230. <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.223>
  16. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:307-312. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq431>
  17. Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4493-4496. <https://doi.org/10.1128/AAC.00175-10>
  18. Walther-Rasmussen, J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:470-482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
  19. Frere JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:1051-1053. <https://doi.org/10.1093/jac/dki155>
  20. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2021;12:614058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>
  21. Thyrum PT, Yeh C, Birmingham B, Lasseter K. Pharmacokinetics of meropenem in patients with liver disease. *Clin. Infect. Dis.* 1997;24:184-190. [https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement\\_2.s184](https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_2.s184)
  22. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
  23. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:143-144. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100244>
  24. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1597-606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>
  25. Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8:427-439. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1185577>
  26. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an update on therapeutic options. *Front Microbiol.* 2019;10:80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
  27. Lin MY, Lyles-Banks RD, Lolans K, Hines DW, Spear JB, Petrak R, et al. The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis.* 2013;57:1246-52. <https://doi.org/10.1093/cid/cit500>
  28. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-S27. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2017.
  29. Lee KW, Kim CK, Yong DE, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods.* 2010;83:149-152. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.010>
  30. The Korean Society of Clinical Microbiology. Diagnostic instruction carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE) [Internet]. Seoul: The Korean Society of Clinical Microbiology; 2015 [cited 2022 May 19]. Available from: <http://kscm.or.kr/xe/kscmnotice/71241>.
  31. 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>
  32. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:934-936. <https://doi.org/10.1128/AAC.01247-10>
  33. 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>
  34. Wang L, Gu H, Lu X. A rapid low-cost real-time PCR for the de-



- tection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-9>
35. Kosykowska E, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. Rapid detection of NDM, VIM, KPC and IMP carbapenemases by real-time PCR. *J Bacteriol Parasitol.* 2016;7:6. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000299>
  36. Goudarzi H, Mirsamadi ES, Ghalavand Z, Vala MH, Mirjalali H, Hashemi A. Rapid detection and molecular survey of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Microbiol.* 2019;19:122. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1510-y>
  37. Bordin A, Trembizki E, Windsor M, Wee R, Tan LY, Buckley C, et al. Evaluation of the SpeeDx Carba (beta) multiplex real-time PCR assay for detection of NDM, KPC, OXA-48-like, IMP-4-like and VIM carbapenemase genes. *BMC Infect Dis.* 2019;19:571. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4176-z>
  38. Mutters NT, Tacconelli E. Infection prevention and control in Europe—the picture in the mosaic. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:1045–1046. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.012>
  39. Tălăpan D, Rafila A. Five-year survey of asymptomatic colonization with multidrug-resistant organisms in a Romanian tertiary care hospital. *Infect Drug Resist.* 2022;15:2959–2967. <https://doi.org/10.2147/IDR.S360048>
  40. Choi IH, Lee YS. Active surveillance for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a single center for four years. *Ann Lab Med.* 2022;42:367–369. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.3.367>
  41. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e01140–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>
  42. Yang BS, Park JA. Detection of bla KPC and bla NDM genes from gram-negative rod bacteria isolated from a general hospital in Gyeongnam. *Korean J Clin Lab Sci.* 2021;53:49–59. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2021.53.1.49>
  43. Tawfick MM, Alshareef WA, Bendary HA, Elmahalawy H, Abdulall AK. The emergence of carbapenemase blaNDM genotype among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from Egyptian cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39:1251–1259. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03839-2>
  44. El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:229–238. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp201>
  45. 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/10.1007/10.1586/14787210.2016.1106940>
  46. Mangold KA, Santiano K, Broekman R, Krafft CA, Voss B, Wang V, et al. Real-time detection of blaKPC in clinical samples and surveillance specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3338–3339. <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-11>