Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Detection of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} Genes from Gram-Negative Rod Bacteria Isolated from a General Hospital in Gyeongnam

Byoung Seon Yang, Ji Ae Park

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

경남지역 종합병원에서 분리된 그람음성막대균으로부터 *bla*_{KPC} 및 *bla*_{NDM} 유전자 검출

양병선, 박지애

진주보건대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received January 28, 2021
Revised 1st February 18, 2021
Revised 2nd February 23, 2021
Revised 3rd February 26, 2021
Accepted February 28, 2021

Key words

*bla*_{KPC}
*bla*_{NDM}
MHT
CIT
Real-time PCR

ABSTRACT

This study investigated the use of real-time PCR melting curves for the diagnosis of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes among the most frequently detected carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Korea. As a means of addressing the shortcomings of phenotype tests and conventional PCR. The modified Hodge test confirmed positivity in 25 of 35 strains, and carbapenemase inhibition testing confirmed positivity in 14 strains by meropenem+PBA or meropenem+EDTA. PCR analysis showed amplification products in 25 strains of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), 10 of *K. pneumoniae*, 5 of *E. coli*, 5 of *A. baumannii*, 4 of *P. aeruginosa*, and 1 of *P. putida*. New Delhi metallo β -lactamase (NDM) identified amplification products in 8 strains, that is, 2 *K. pneumoniae*, 3 *E. coli*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *E. cloacae*, and 1 *P. retgeri* strains. Real-time PCR melting curve analysis confirmed amplification in 25 strains of KPC and 8 strains of NDM, and these results were 100% consistent with PCR results. In conclusion, our findings suggest early diagnosis of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* by real-time PCR offers a potential means of antibacterial management that can prevent and control nosocomial infection spread.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

지난 10여년 동안 전 세계의 입원 환자들 사이에서 내성이 강한 그람 음성균주 감염에 의한 유병률이 급격히 증가했다[1]. 이러한 병원 환경에서 다제내성 세균으로 인한 심각한 감염을 치료하기 위해 사용되는 carbapenem은 강력하고 광범위한 β -lactamase 항생제이나, 광범위한 사용으로 carbapenem

resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)의 보급이 빠르게 증가하여 공중보건에 심각한 위협이 되고 있다.

그람 음성 세균에서 carbapenem 저항성은 β -lactamase 생산, 유출 펌프의 발현, porins 손실 및 penicillin binding proteins (PBPs)의 변경의 결과일 수 있다[2]. 현재 β -lactamase는 구조적 유사성(A, B, C, D 등급)을 기준으로 4개로 분류되거나 가수분해 및 억제제 양상(1~4)에 따라 4개의 그룹으로 분류된다[3]. 그리고 저항성은 carbapenemases의 유전자를 암호화하는 이동식 유전 요소인 plasmid, transposons의 유출로 다른 유전자 간에도 저항 유전자의 성공적인 수평 확산의 가능성을 제공하였고[4], 이러한 발견 이후 carbapenemase

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>

는 세계적인 문제가 되었다.

한국에서는 2010년 12월에 처음으로 CRE에 감염된 사람이 보고되었고[5], 2014년에는 전국적으로 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) 생성 균주에 감염된 환자가 급증하였다. 초기에는 병원 기반 발병이 발생하였고, 그 결과 병원 간 또는 지역 간 확산이 발생하여 2015년에는 KPC 생성 균주가 풍토화되었다[6, 7]. 2020년 Park 등[8]의 연구에 따르면 서울 소재 병원의 *Enterobacteriaceae* 1,468개 임상검체 중 carbapenemase 유전자의 분자 특성화를 통해 CRE를 1년간 관찰한 결과 가장 흔한 분리된 균주는 *Klebsiella pneumoniae* 56.5%와 *Escherichia coli* 17.0%이었다. 그리고 일반적으로 최소 1개의 carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*(CPE)에 대해 58.1%가 양성반응을 보였으며, KPC-2가 46%로 가장 일반적인 CPE형으로 나타났으며, New Delhi metallo β -lactamase (NDM)-1이 5.9%로 뒤를 이었다. KPC-2에서 *K. pneumoniae* 73.1%, *E. coli*는 15.8%로 나타났으며 NDM-1은 *Enterobacter cloacae* 복합체에서 23.3% 분리되었다.

이러한 CRE 외에도 공중보건에 대한 심각하거나 긴급한 위협으로 분류되는 항생제 내성 그람 음성 병원체에 해당하는 것으로 제3세대 cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* (3GC-R), CRE, multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), multidrug resistant *Acinetobacter* species (MDRA) 등이 있다[9, 10]. 뿐만 아니라 extended spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 *Enterobacteriaceae*와 multidrug resistance (MDR) *Enterobacteriaceae* 또한 치료가 어렵고, 따라서 더 많은 수의 유병균에 의한 감염 위험에 처하게 되었다[1].

이처럼 그람 음성 세균의 항균제 저항성은 공공의 건강을 계속 위협하고 있으며 의료의 사회적 비용을 증가시키고 있다. 각종 항생제에 내성을 가지는 그람 음성 세균에 의한 감염 위험 인자는 대체로 중복되며, 이전 carbapenem의 사용은 저항력이 높은 여러 그람 음성 세균으로 인해 감염의 위험성을 증가시키는 것으로 알려졌다[9].

그러나 현재 CRE 진단에 활용되고 있는 clinical laboratory standards institute (CLSI) 가이드 라인[11]을 따른 검출법 및 선별검사법으로 이용되는 modified Hodge test (MHT)의 경우 진단시간이 많이 소요되며, 특정 효소의 검출에는 낮은 민감도를 보인다는 단점을 가진다[12]. 그리고 특정 억제제를 이용하여 유전자형을 확인하는 carbapenemase inhibition test (CIT) 검사법 또한 정확한 유전자형을 알기 위해서는 추가적인 분자진단을 필요로 한다.

따라서 CRE의 적시에 신속하고 정확한 검출은 감염의 임상적 예방과 치료에 매우 중요하다 할 수 있다. 일반적으로 유전자형의 검사에는 polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 분자방법을 이용하고 있으나, 사후 분석에 있어 종종 시간과 비용이 많이 소요된다. 그래서 근래에는 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR) 분석방법을 통해 보다 신속한 유전자형의 진단을 실시하며, 이러한 real-time PCR의 분석방법으로는 유전자의 정량적 분석과 유전자의 변이 형태 등의 분석에 활용되는 용해 곡선 분석법 등이 많이 활용되고 있다.

Real-time PCR 분석방법 중 용해 곡선 분석은 1997년 처음 소개되었다. 용해는 두 가닥 DNA가 가온되면 한 가닥 DNA로 분리되는 현상을 말하며, 두 가닥 DNA에 비특이적으로 결합하는 형광 색소(fluorescent dye)인 SYBR Green을 사용하여 용해과정이 실시간으로 측정된다. 이는 반응 산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 용해 곡선을 보여 전기영동 없이도 용해 곡선 분석만으로 반응 산물을 확인할 수 있다. 그리고 SYBR green법은 generic non sequence specific double stranded DNA binding dye 기반으로 double strand DNA 모두 검출하기 때문에 유전자별로 별도의 probe를 준비할 필요가 없어 저렴한 비용으로 반응을 구축하는 장점을 가진다. 그러나 광범위하게 활용되는 SYBR Green은 고농도에서 중합효소 연쇄반응을 저하시키고, 용해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나므로 유전자형 결정(genotyping)까지 가능한 고해상도 용해 곡선(high-resolution melting curve)분석에는 적합하지 않다고 알려져 있다[13, 14].

그리고 2013년 Zheng 등[15]은 *Enterobacteriaceae*에서 NDM과 KPC 유전자의 동시 식별을 위한 이중 Taqman real-time PCR 분석을 도입하였고, multiplex real-time PCR의 결과는 기존 PCR의 결과와 100% 일치한다는 것을 보여주었다. 이러한 Taqman probe법의 경우 sequence specific probe를 기반으로 하여 비슷한 서열까지 구별해서 검출 특성이 높으나 비용적인 부분이 많이 소요되는 단점을 가지고 있다.

최근 수십 년 동안 CRE는 전 세계의 다양한 의료기관에 널리 퍼졌고, 시간이 많이 소요되는 진단 방법과 제한된 치료제 때문에 환자들 사이의 사망률이 높다. 항생제에 내성이 있는 그람 음성 세균은 전 세계적으로 심각한 위협을 제기하고 있으므로, 다른 환자에 대한 교차 전염을 방지하기 위해 적절한 항균 요법의 신속한 구현과 격리 절차 및 공중보건 측면에서의 감염관리를 위해 신속한 검출이 무엇보다 중요하다. 연구에 따르면 감염의 시작과 전달 사이의 48~72시간 이내에 항생제의 적절한 처리는 대단히 중요하다[16, 17]. 그러므로 신속한 진단 테스트 결과

가 중요한 시간 동안 항생제 선택에 도움이 되며, 적절한 항생제 치료의 가능성을 높일 수 있다. 따라서 CRE, 특히 CPE의 시기 적절하고 정확한 검출은 임상 치료와 감염 예방에 필수적이라 할 수 있다. 그러나 항생제 내성균의 진단에 이용되는 CLSI 가이드라인에 따른 약제 감수성 검사, MHT 검사 및 CIT 검사는 일종의 표현형 검사법으로 많은 시간이 소요되고, 정확한 유전자의 검출을 위해서는 추가적인 분자 진단이 필요하다. 그리고 기존의 PCR을 이용한 분자 방법은 사후 분석에 대한 필요성 때문에 종종 시간과 비용이 많이 소요된다.

이에 본 연구는 감염관리를 위한 CPE의 시기적절하고 정확한 검출을 위하여 경남지역 종합병원에서 2018년 10월부터 2019년 10월까지 수집된 carbapenem 약제에 내성이 확인된 그람 음성 막대균주를 이용하여 국내에서 가장 빈번히 검출되는 CPE의 유전자형 중 *bla_{KPC}* 및 *bla_{NDM}* 유전자의 진단으로 기존의 표현형적 검사 및 PCR 방법보다 시간 단축 및 사후 분석 등의 단점이 보완된 real-time PCR의 용해 곡선을 이용한 분석방법에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

분석에 사용한 검체는 경남지역 종합병원에서 2018년 10월부터 2019년 10월까지 수집된 imipenem, meropenem 및 ertapenem에 약제 내성이 확인된 그람 음성 막대균 35균주를 대상으로 분석에 이용하였다.

2. 세균의 동정

분석에 이용한 분리 배양된 35균주는 Gram negative (GN) kit를 사용하여 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)으로 세균 동정을 하였다. 먼저 각각의 test tube에 0.25% NaCl 3 mL를 넣고 탁도계에서 영점을 맞춘다. 그 후 탁도계를 이용하여 tryptic soy agar (TSA)에서 증식된 단일 집락을 취한 후 부유액의 탁도가 McFarland No. 0.5이 되도록 한다. 균액의 튜브와 GN kit를 카셋트에 꽂아주고, 표측한 선 부분이 균액에 들어가도록 한다. 다음으로 VITEK 프로그램을 실행한 후 장치 왼쪽 위의 filler 문을 열고 카셋트를 넣어 필링을 실시하고 완료되면 카셋트를 빼낸다. VITEK 장치 오른쪽 아래에 있는 loader에 문이 열리면 카셋트를 넣는다. 그 후 시간이 지나면 card만 잘려 들어가게 되고, 하루가 지나고 VITEK 프로그램의 'setup test post entry'에서 'accession #'에 샘플번호를 입력하고 저장 버튼을 누른

다. 그 후 동정된 균주 및 정확도를 확인한다.

3. Carbapenemase 선별 시험법

분석에 이용한 35균주는 carbapenemase 선별시험인 디스크 확산법을 시행하였다. 시험에 이용한 균주는 균주 부유액 탁도를 McFarland No. 0.5로 맞춘 후 Mueller Hinton 배지에 면봉으로 고루 접종하였다. 접종한 균주가 마른 뒤 배지의 중앙에 imipenem, meropenem 및 ertapenem (10 µg, BBL, Cockeysville, MI, USA)를 놓은 후 37°C 배양기에서 18~24시간 배양한다. 항균제별 최소발육억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 해석은 CLSI의 기준을 따라 양성으로 판단하였다[11]. 그 후 carbapenemase 표현형 검출은 CLSI에서 설명한 modified Hodge test (MHT)를 이용하였다. MHT를 시행하기 위해 carbapenem 감수성 균주인 *E. coli* ATCC 25922를 McFarland No. 0.5 탁도로 균주 부유액을 만들었다. 탁도를 맞춘 균주 부유액 0.5 mL를 식염수 4.5 mL에 넣어 1:10으로 희석하였고, 그 후 MacConkey 배지에 고르게 도말하였다. 3~5분 건조 후 각각 10 µg imipenem, meropenem 및 ertapenem 감수성 검사용 디스크를 배양접시 가운데에 올려준 후, 검사하고자 하는 균주를 백금이에 묻혀 디스크에서 배양접시 가장자리까지 그어준다. 접종된 배양접시는 배양기에서 18~24시간 배양한 후 다음날 희석된 균주 주위로 *E. coli* ATCC 25922 균주가 클로버 잎과 같이 움푹 들어간 상태(clover leaf-like indentation)로 자라면 양성으로 판정하였다[11, 12]. 선별검사에서 유전자형 검출에 이용되는 carbapenemase inhibition test (CIT)는 특정 억제제를 추가하여 carbapenemase의 활성을 억제하는 원리를 이용한 검사이다. Class A carbapenemase (KPC)의 검출을 위해서는 phenylboronic acid (PBA)를, class B carbapenemase (metallo-β-lactamase, MBL)의 검출을 위해서는 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 억제제로 이용한다. 이러한 CIT의 검사방법 및 결과해석은 2015년 질병관리본부과 대한임상미생물학회에서 제시한 CPE 진단법 지침서를 따랐다[18]. 검사대상 균주는 McFarland No. 0.5 탁도로 균주 부유액을 만들고, Muller Hinton 배지에 도말한 후 meropenem 디스크 3개를 적절한 간격으로 놓는다. 3개의 meropenem 디스크 중 한 개에는 PBA 시약을, 다른 한 개에는 EDTA 시약을 각각 10 µL씩 떨어뜨린다. 37°C 배양기에서 16~20시간 배양한 후 각 디스크의 억제대를 측정한다. 시약을 떨어뜨리지 않은 meropenem의 억제대를 기준으로 시약을 떨어뜨린 억제대의 직경과의 차이가 ≤3 mm는 negative, 4 mm는 weak

positive, ≥ 5 mm은 positive로 판독하였다. 그리고 CRE의 선별검사로 이용되는 MHT와 CIT의 결과를 바탕으로 통합 해석을 하였다[18].

4. PCR을 통한 *bla_{KPC}* 및 *bla_{NDM}* 유전자 검출

Carbapenemase 선별시험인 디스크 확산법에서 KPC 및 NDM 생성균주로 의심되는 균주에서 DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다. 먼저 의심 균주는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Wisconsin, USA)의 Gram negative (GN)방법을 이용하여 DNA 추출을 수행하였다. 그 후 carbapenem 분해효소 중 2종(KPC, NDM)에 대한 유전자 검사를 시행하였다(Table 1). AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) 안에 각각 5 pmol의 primer 1 μ L, DNA 2 μ L, 증류수를 혼합하여 총 부피 20 μ L의 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. 증폭된 PCR 반응 산물은 ethidium bromide (EtBr)를 포함한 2% agarose gel에서 100 volt 전압으로 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였고, 그 후 BigDye Terminator V3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)와 ABI3730XL (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)을 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 결정된 염기서열의 비교분석은 NCBI에서 제공하는 blast 프로그램을 이용하였다.

5. Real time PCR의 용해 곡선 분석을 이용한 *bla_{KPC}* 및 *bla_{NDM}* 유전자 진단

Real-time PCR의 용해 곡선(melting curve) 분석을 통한

유전자형 진단을 위하여 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)를 사용하여 실시간 증합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응용액은 10 μ L의 iQ SYBR Green Supermix, 1 μ L의 primer 혼합액, 1 μ L DNA 및 8 μ L의 증류수를 넣어 반응액 20 μ L를 제조하였다. 실시간 증합효소 연쇄반응은 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)를 이용하였다. 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 10초, 60°C에서 30초, 72°C에서 10초의 반응을 40회 반복하였다. 마지막 PCR 반응이 끝난 후 65°C에서 95°C까지 초당 0.5°C의 속도로 온도를 증가시키면서 용해 곡선을 모니터링 하였다.

실시간 증합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용한 균주의 분석은 모두 2 반복 실험으로 진행하였다. 그리고 표준곡선을 이용하여 최소검출농도(limit of detection, LOD)를 확인하였고 SYBR green에서의 비특이적 증폭 산물의 생성 여부를 확인을 위하여 no-template control (NTC)을 함께 실시하였다. NTC는 주형을 제외한 나머지 반응액으로 분석에 이용한 반응조건과 동일하게 진행하였다.

결 과

1. 검체별 특성

본 연구의 분석에 사용한 검체는 경남 지역 종합병원에서 수집된 35균주를 대상으로 하였고, 균주의 식별은 VITEK 2 automated instrument ID system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 의하여 확인하였다. 분석결과 *Klebsiella pneumoniae* 12균주, *Escherichia coli* 7균주, *Acinetobacter baumannii* 6균주, *Pseudomonas aeruginosa* 6균주, *Enterobacter cloacae* 2균주, *Providencia rettgerii* 1균주, *Pseudomonas putida* 1균주를 확인하였다. 분리된 검체의 빈도는 sputum 15개 (42.8%), urine 9개(25.7%), blood 6개(17.1%), pus 2개 (5.7%), ascitic fluid 1개(2.9%), tracheal aspirates 1개

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

Gene	Amplicon size (bp)	Primer sequences	GeneBank accession number	Reference
<i>bla_{KPC}</i>	785	5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3' 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'	EU784136	[19]
<i>bla_{NDM}</i>	621	5'-GGTTTGCGCATCTGGTTTTC-3' 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'	FN396876.1	[20]
q <i>bla_{KPC}</i>	106	5'-TTGTTGATTGGCTAAAGGG-3' 5'-CCATACACTCCGACGGTT-3'	EU244644	[21]
q <i>bla_{NDM}</i>	128	5'-GATCCTCAACTGGATCAAGC-3' 5'-CATTGGCATAAGTCGCAATC-3'	JQ060896.1	[22]

Figure 1. Frequency of detection in specimens.

(2.9%), other 1개(2.9%) 순으로 나타났다(Figure 1).

2. 표현형적 carbapenemase 선별 시험법

임상검체 중 식별된 모든 균주에 대해서는 디스크 확산법을 시행하였다. Imipenem, meropenem 및 ertapenem 약제를 이용하였으며, 항생제 감수성 시험은 CLSI 가이드라인의 항생제에 대한 내성판정 기준으로 하였고[11, 12] 결과는 Table 2와 같다. 그 후 선별시험인 MHT를 실시하여 결과를 판독하였다(Figure 2-1). Ertapenem을 이용한 MHT 결과 35균주 중 25 균주에서 양성 결과를 확인하였다. 분석결과 *K. pneumoniae*

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		Mero+ EDTA	Mero+ PBA	
1	KBN12P06500	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
2	KBN12P06611	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
3	KBN12P06612	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
4	KBN12P06665	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Negative	Negative	Positive	Probably AmpC
5	KBN12P06608	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
6	KBN12P06666	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
7	KBN12P06607	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
8	KBN12P06499	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
9	KBN12P06496	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
10	KBN12P06456	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
11	KBN12P06454	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
12	KBN12P06453	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
13	KBN12P06486	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Negative	Negative	Positive	Probably AmpC
14	KBN12P06662	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
15	KBN12P06661	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Negative	Positive	Negative	Probably Class B
16	KBN12P06487	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Negative	Negative	Positive	Probably AmpC
17	KBN12P06660	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Negative	Negative	Negative	Non carbapenemase
18	KBN12P06600	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Negative	Positive	Negative	Probably Class B
19	KBN12P06489	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	Positive	Negative	Positive	KPC
20	KBN12P06513	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	I	Negative	Negative	Negative	Non carbapenemase
21	KBN12P06373	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
22	KBN12P06561	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Negative	Positive	Negative	Probably class B
23	KBN12P06744	<i>Pseudomonas putida</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
24	KBN12P06532	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	I	Negative	Negative	Negative	Non carbapenemase
25	KBN12P06677	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
26	KBN12P06679	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	Negative	Positive	Negative	Probably class B
27	KBN12P06558	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
28	KBN12P06370	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Negative	Negative	Class D carbapenemase
29	KBN12P06635	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
30	KBN12P06634	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
31	KBN12P06636	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
32	KBN12P06637	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
33	KBN12P06645	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
34	KBN12P06646	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase
35	KBN12P06468	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	Positive	Positive	Negative	Class B carbapenemase

Abbreviations: R, resistant; I, intermedium; IMP, imipenem; MERO, meropenem; ETP, ertapenem; KPC; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.

11균주, *A. baumannii* 6균주, *E. coli* 2균주, *P. aeruginosa* 2균주, *E. cloacae* 2균주, *P. putida* 1균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났다(Table 3).

유전자형 검출을 위하여 carbapenemase inhibition test

Figure 2. Result of modified Hodge test (MHT) and carbapenemase inhibition test (CIT). 1) The MHT performed on a MacConkey plate. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, positive result; *Pseudomonas aeruginosa* negative result. 2) CIT reading result. (A) negative, (B) Mero+EDTA positive, (C) Mero+PBA positive.

Table 3. Gram negative rod bacteria showing positive results in modified Hodge test and carbapenemase inhibition test (MHT; N=25, Mero+EDTA; N=14, Mero+PBA; N=14)

Treatment	No.	Name of organism	Number of isolates
MHT	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 (44%)
	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6 (24%)
	3	<i>Escherichia coli</i>	2 (8%)
	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (8%)
	5	<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (8%)
	6	<i>Pseudomonas putida</i>	1 (4%)
	7	<i>Providencia rettgeri</i>	1 (4%)
	Total		25 (100%)
Mero+EDTA	1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5 (35.7%)
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (14.3%)
	3	<i>Escherichia coli</i>	2 (14.3%)
	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (14.3%)
	5	<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (14.3%)
	6	<i>Providencia rettgeri</i>	1 (7.1%)
	Total		14 (100%)
Mero+PBA	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 (71.4%)
	2	<i>Escherichia coli</i>	4 (28.6%)
	Total		14 (100%)

Abbreviations: MHT, modified Hodge test; Mero, Meropenem; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PBA, phenylboric acid.

(CIT) 검사를 실시하였다. 3개의 meropenem 디스크 중 한 개에는 class A carbapenemase (KPC)의 검출을 위해 PBA 시약을, 다른 한 개에는 class B carbapenemase (MBL)의 검출을 위해 EDTA 시약을 각각 10 μ L씩 떨어트렸다. 37°C 배양기에서 16~20시간 배양한 후 각 디스크의 억제대를 측정 후 판독하였다(Figure 2-2).

분석결과 meropenem+PBA에서 35균주 중 14균주에서 양성 결과를 확인하였고, *K. pneumoniae* 10균주, *E. coli* 4균주로 나타났다. Meropenem+EDTA의 분석결과 35균주 중 14균주에서 양성을 확인하였고, 균주는 *A. baumannii* 5균주, *K. pneumoniae* 2균주, *E. coli* 2균주, *P. aeruginosa* 2균주, *E. cloacae* 2균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났다(Table 3).

그리고 MHT와 CIT의 결과를 바탕으로 통합 해석을 하였고 [18], 분석결과 KPC 11균주, class B 및 추정 class B cabapenemase 10균주, class D cabapenemase 4균주, AmpC 추정 3균주, non cabapenemase 3균주를 확인하였다 (Table 2).

3. 분자학적 방법을 이용한 *bla*_{KPC} 및 *bla*_{NDM} 검출

분석에 이용된 모든 균주에 대해 carbapenem 분해효소 중 2종(*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM})에 대한 유전자검사를 시행하였다. 분석결과 35균주 중 *bla*_{KPC} 유전자는 25개의 양성 균주를 *bla*_{NDM} 유전자는 8개의 양성 균주를 확인하였다(Figure 3). PCR 검사 결과 음성으로 확인된 *bla*_{KPC} 유전자는 35균주 중 10개의 균주에서 음성을 확인하였고, *K. pneumoniae* 2균주, *E. coli* 2균주, *P. aeruginosa* 2균주, *E. cloacae* 2균주, *A. baumannii* 1균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났다. *bla*_{NDM} 유전자는 35균주 중 27개의 음성균주가 확인되었으며, *K. pneumoniae* 10균주, *E.*

Figure 3. PCR amplification profile of the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} gene from the gram negative rod bacteria isolates. 1) *bla*_{KPC} PCR product size of 785 bp and 2) *bla*_{NDM} PCR product size of 621 bp. M, 100 bp DNA ladder marker.

Figure 4. Melting curve analysis of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}. 1) melting curve analysis of *bla*_{KPC} amplicon was generated that showed the fragment T_m 87.5°C and 2) melting curve analysis of *bla*_{NDM} amplicon was generated that showed the fragment T_m 88°C.

coli 4균주, *A. baumannii* 6균주, *P. aeruginosa* 5균주, *P. putida* 1균주, *E. cloacae* 1균주로 나타났다.

증폭된 *bla*_{KPC} 25균주의 분석결과, *K. pneumoniae* 10균주, *E. coli* 5균주, *A. baumannii* 5균주, *P. aeruginosa* 4균주, *P. putida* 1균주로 나타났다. 증폭된 *bla*_{NDM} 8균주의 분석결과, *K. pneumoniae* 2균주, *E. coli* 3균주, *P. aeruginosa* 1균주, *E. cloacae* 1균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났다. 그 후 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인하였으며, NCBI에서 제공하는 blast 프로그램을 이용하여 염기서열의 비교분석을 하였다. *bla*_{KPC} 유전자의 경우 Genebank No. CP054782.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 3개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다. *bla*_{NDM} 유전자의 경우 Genebank No. LC536682.1에서 상동성(homology)은 평균 99%이며, 원래 서열보다 평균 1.5개 염기의 누락(Gap 1%)을 확인하였다.

4. 용해 곡선 분석을 이용한 *bla*_{KPC} 및 *bla*_{NDM} 검출

용해 곡선의 분석에 앞서 NTC 분석결과 검체 이외에는 증폭된 산물이 없음을 확인하였고, 이후 분석에 이용한 균주는 모두 2 반복 실험으로 진행하였다. 표본이 30 사이클의 교차점(crossing point, Cp) 이전의 임계값을 초과할 경우 양성으로, Cp가 30보다 클 경우 음성으로 간주하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 이용한 분석결과 *bla*_{KPC} 유전자는 25개, *bla*_{NDM} 유전자는 8개의 균주에서 증폭곡선을 확인하였다. *bla*_{KPC} 25균주에는 *K. pneumoniae* 10균주, *E. coli* 5균주, *A. baumannii* 5균주, *P. aeruginosa* 4균주, *P. putida* 1균주로 나타났다. *bla*_{NDM} 8균주는 *K. pneumoniae* 2균주, *E. coli* 3균주, *P. aeruginosa* 1균주, *E. cloacae* 1균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났으며, 이는 PCR 결과와 100% 일치하였다. 증폭된 유전자의 평균 cycle threshold (Ct) 값은 *bla*_{KPC}

의 경우 17.01 ± 1.03 , *bla*_{NDM}은 23.04 ± 1.73 으로 나타났으며, 음성으로 나타난 균주에서는 증폭 산물이 없었다. 그리고 증폭 산물의 용해 곡선 분석 결과 *bla*_{KPC}는 melting temperature (T_m) 87.5°C, *bla*_{NDM}은 T_m 88°C를 확인하였다(Figure 4). 양성으로 확인된 검체를 이용하여 표준곡선분석을 실시였고 10⁰ 희석한 검체에서 최소검출농도(limit of detection, LOD)를 확인한 결과 *bla*_{KPC} 유전자는 22 ng/mL, *bla*_{NDM} 유전자는 27.96 ng/mL으로 확인되었다.

고 찰

2010년 국내에서 최초로 CRE 보고 이후, 국내의 표본감시에 따르면 CPE의 발생은 해마다 증가하고 있다[5, 23]. 2016년 기준으로 우리나라에서 발생하는 carbapenem 분해효소의 종류로는 KPC (70.7%), NDM (13.5%), oxacillinase-48 (OXA-48, 9.6%), Guiana extended spectrum β -lactamase (GES, 3.1%), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM, 2.0%), imipenemase (IMP, 1.1%) 순으로 보고되었다[24]. 이러한 CRE는 지역사회 수준과 의료 시설 모두에서 중요한 관심사이며, 세계적으로 CRE 감염의 증가는 높은 이환률과 사망률을 가진 고 독성 세균과의 감염의 연관성으로 인해 매우 우려되는 상황이다.

이에 본 연구는 경남지역 종합병원에서 분리된 35균주를 이용하여 국내에서 가장 빈번히 검출되는 CPE의 유전자형 중 *bla*_{KPC} 및 *bla*_{NDM} 유전자의 real-time PCR의 용해곡선을 이용한 분석 방법으로 보다 신속한 유전자 진단법에 대해 알아보고자 하였다.

먼저 분리된 35균주를 동정한 후 식별된 모든 균주에 대해서는 carbapenem 분해효소 선별시험인 디스크 확산법을 시행하였고, 항생제 감수성 시험은 imipenem, meropenem 및

ertapenem를 이용하여 CLSI 가이드라인에 따라 시행 및 판독하였다. 그 후 선별시험인 MHT를 실시하여 결과를 판독하였고 35균주 중 25균주에서 양성을 확인하였다.

기존의 연구[21]에서 MHT의 민감도와 특이성은 90%를 초과하는 것으로 나타났지만, 일부 연구에서는 특히 세포벽에 porin 결핍을 가진 ESBL 또는 AmpC β -lactamase를 생성하는 CRE에서 높은 수의 위양성 결과가 관찰되었다[25-27]. 또한 *A. baumannii*, *P. aeruginosa*와 같은 일부 균주에 대해서는 해석이 어려울 수 있기 때문에 KPC에 대한 이상적인 형태적 확인 시험이 아닐 수 있다[21]. 이처럼 MHT는 CLSI가 carbapenemase 생산 균주의 표현형 검출을 위해 권장하는 테스트이지만 MHT의 해석에 문제가 있고 일부 분리된 균주에서 비교적 높은 위양성 및 위음성 결과 비율이 있으므로 carbapenemase 생산의 최종 확인에는 부적합하다. 또다른 표현형을 이용한 분석 방법으로 여러 억제제 기반 테스트가 있으며[2, 28], 본 연구에서는 유전자형 검출을 위하여 억제제 기반 테스트인 CIT 검사를 실시하였다.

CIT에서 KPC 생성 균주의 표현형 시험은 KPC가 boronate 유도체에 의해 억제되는 것을 바탕으로 검사하며, 유도체 중에서 PBA가 더 유용한 것으로 알려져 있다. MBL 생성 균주의 표현형 시험은 MBL이 chelating agent에 의해 억제되는 것을 바탕으로 검사하며 EDTA가 전통적으로 사용되고 있다. EDTA와 같은 화합물은 Zn 이온을 제거함으로써 MBL이 항균제를 가수분해할 수 없게 불활성화시킨다. 표현형적 검사인 MHT와 CIT 검사결과를 바탕으로 한 통합 해석을 실시하였고[18], 분석결과 KPC 생성균주는 11균주, NDM 생성 추정균주는 14균주를 확인하였다.

그 후 정확한 유전자 진단을 위해 분석에 이용된 모든 균주에 대해 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*에 대한 유전자 검사를 시행하였으며, 분석결과 *bla_{KPC}* 유전자는 25균주, *bla_{NDM}* 유전자는 8균주에서 양성을 확인하였다(Figure 3). 양성으로 나온 균주는 염기서열 분석을 통해 유전자형을 확인하였으며, 그 결과 *bla_{KPC}* 유전자는 평균 99%, *bla_{NDM}* 유전자는 평균 99%의 상동성(homology)을 확인하였다.

그리고 유전자형을 확인할 수 있다고 알려진 CIT 검사와 MHT 결과를 바탕으로 한 통합 해석 결과와 PCR 결과를 비교 분석하였다. 분석결과 통합해석에서 KPC 생성균주는 11균주, PCR 검사는 25균주가 양성으로, 표현형적 검사법에서 14균주(44%)의 위양성을 확인하였다. 그리고 통합해석 결과에서 NDM 생성 추정 균주는 14균주, PCR 검사는 8균주가 양성으로, 표현형적 검사법에서 6균주(43%)의 위양성을 확인하였다.

일반적으로 boronate 기반 검사는 KPC 생산 균주의 검출에 높은 민감도를 보이나, 높은 수준의 AmpC형 β -lactamase 발현 및 porin 결핍때문에 carbapenem에 대한 감수성이 감소된 분리균주에서 특이성 문제가 발생할 수 있다[29]. 그리고 β -lactam-chelator 조합에 기초한 MBL 검출 방법은 *K. pneumoniae*와 *E. coli*에 대해 우수한 성능을 발휘하지만, 다른 장내세균 종에 대해서는 체계적으로 검사되지 않았다. 또한, MBL 검출 방법의 특이성은 킬레이트 작용제의 영향으로 손상되어 비특이적으로 작용하고 다른 프로세스에 영향을 미칠 수 있다는 점을 반드시 감안하여야 한다[30-32]. 그리고 억제제를 이용하여 유전자형을 알아볼 수 있는 CIT 검사에서 MBL 억제제로 흔히 사용되는 EDTA는 세균 외부 세포막의 투과성을 증가시켜, 특히 *Acinetobacter*에 대해 비특정 위양성 결과를 발생시킬 수 있다[33, 34]. CIT 검사와 PCR 검사의 비교 분석한 결과, *A. baumannii* 1균주에서 CIT 검사는 양성이나 PCR 검사 결과에서는 음성으로 위양성 결과를 확인하였고, 이는 EDTA는 세균 외부 세포막의 투과성을 증가시켜, 특히 *Acinetobacter*에 대해 비특정 위양성 결과를 발생한 것으로 보인다.

이처럼 MHT 및 CIT 검사의 경우 일종의 표현형 검사방법으로 많은 검사시간의 소요뿐만 아니라 여러 판독적 오류 및 효소 종류에 따른 낮은 검출 효율로 인해 정확한 항생제 내성 유전자형을 확인하기 위해서는 분자학적 방법이 필수적이라 할 수 있다. 그러나 기존의 PCR을 이용한 분자 방법은 사후 PCR 분석에 대한 필요성 때문에 종종 시간과 비용이 많이 소요되므로, carbapenemase 등과 같은 저항성 유전자를 대상으로 한 real-time PCR 방식이 최근 빈번하게 적용됐다[35]. 본 연구에서는 저렴하고 사용이 간편한 등 많은 장점을 가져 광범위하게 활용되는 SYBR Green을 이용한 용해 곡선 분석을 실시하였으며, 비특이적 반응 등의 SYBR Green의 단점을 보완하고자 검증된 primer를 활용하여 분석을 실시하였다.

분석에 이용된 *qbla_{KPC}* primer는 이전의 연구[21]에서 항균제 감수성 검사를 통해 β -lactam 항생제의 여러 등급에 내성을 갖는 159 그람음성균주로부터 SYBR Green I를 기반으로 한 real-time PCR 분석에서 *bla_{KPC}* 유전자의 106 base pair (bp) 산물을 증폭시키도록 설계되었다. SYBR Green I를 이용한 증폭산물의 용해곡선 분석을 통해 *bla_{KPC}* 유전자를 확인하였으며, Tm 값은 약 89°C에서 검출되었다. 그리고 연구결과 표현형적 검사인 MHT 및 염기서열 분석과 비교하여 실시간 PCR 분석의 특이성과 민감도는 100%로 평가되었으며, 실시간 PCR 검사는 높은 분석 민감도와 특수성을 가진 KPC-harboring 균주를 빠르고 정확하게 검출할 수 있었다[21]. 또한 용해곡선 분석

에 이용된 q bla_{NDM} primer는 알려진 모든 bla_{NDM} (bla_{NDM-1} ~7) 대립유전자와 동일함을 확인하였다[22].

본 연구에서는 SYBR green을 이용한 용해곡선 분석으로 bla_{KPC} 와 bla_{NDM} 유전자의 검출 유무를 확인하였으며, 분석 결과 기존의 연구와 마찬가지로 real-time PCR의 결과가 100% 일치한다는 것을 확인하였다.

CRE, 3GC-R 또는 MDRP로 인한 감염 환자는 제한적인 치료 옵션을 가지고 있으며, 배양 및 감염성 보고 전에 이러한 감염을 인식하지 못하는 경우가 많기 때문에 적절한 치료를 받기에는 매우 취약한 실정이다[36]. 현재의 CLSI 가이드라인에 따른 표현형적 검사법은 carbapenemase 생성 의심균주의 분리 후 첫 결과까지 보통 24~48시간이 소요되고, carbapenemase 유형을 구분할 수 없어 검사가 시간이 많이 걸린다는 단점을 가진다.

그러나 검사 표본에서 분석 특이성과 민감도가 높은 균주를 검출하기 위해 개발된 실시간 PCR 검사는 turn around time 단축의 이점을 제공하였으며[37], 임상에서 분리된 저항성 유전자를 가지는 세균의 검출을 위해 용해 곡선 분석을 이용한 real-time PCR 검사는 다른 진단검사 방법보다 신속하고 정확하게 저항성 유전자를 가지는 균주를 검출하는 것을 확인하였다. 그 중 SYBR green법은 유전자별로 별도의 probe를 준비할 필요가 없어 Taqman probe법보다 저렴한 비용으로 반응을 구축하는 장점을 가지며, 일반적인 PCR 방법보다는 시간과 오염에 대한 문제점이 감소된다.

Carbapenem 항생제의 광범위한 사용과 함께, CPE는 공중보건에 대한 주요 관심사로 나타났다. CPE는 병원 환경에서 높은 사망률을 가진 병원내 감염을 일으키는 원인으로 빠르게 퍼질 수 있는 잠재력을 가지고 있으며, 다른 균주로의 carbapenemase 유전자의 수평적 전달은 이용 가능한 모든 항생제에 내성을 갖는 다제 내성을 초래하므로 정확하고 신속한 진단이 요구된다.

결론적으로 CPE의 조기진단에 있어 real time PCR을 이용한 검사법은 기존의 표현형적 검사법이나 일반적인 PCR 검사법과 비교하여 보다 신속하고 특이성이 높게 검출이 가능하며, 신속한 진단으로 항생제 내성의 경향은 부상하는 병원균에 대한 중요한 통찰력을 제공할 뿐만 아니라 공중보건 및 감염 중에 항균 관리접근법을 통한 병원 내 감염확산 방지 및 통제가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 국내에서 가장 빈번히 검출되는 CPE의 유전자형

중 bla_{KPC} 및 bla_{NDM} 유전자의 진단으로 기존의 표현형 검사 및 일반 PCR 검사보다 시간 단축 및 사후 분석의 단점이 보완된 real-time PCR의 용해 곡선을 이용한 분석법에 대해 알아보았다. 표현형적 검사결과 MHT는 35균주 중 25균주에서 양성을 확인하고, CIT는 meropenem+PBA 및 meropenem+EDTA에서 각각 14균주의 양성을 확인하였다. PCR 검사결과 KPC 25균주에서 증폭 산물을 확인하였고, *K. pneumoniae* 10균주, *E. coli* 5균주, *A. baumannii* 5균주, *P. aeruginosa* 4균주, *P. putida* 1균주로 나타났다. NDM은 8균주에서 증폭 산물을 확인하였고, *K. pneumoniae* 2균주, *E. coli* 3균주, *P. aeruginosa* 1균주, *E. cloacae* 1균주, *P. rettgeri* 1균주로 나타났다. 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR)을 이용한 용해 곡선 분석결과 KPC 25균주, NDM은 8균주에서 증폭을 확인하였고, PCR 결과와 100% 일치함을 확인하였다. 결론적으로 real-time PCR을 이용한 신속하고 특이성이 높은 CRE의 조기진단은 공중보건 및 감염 중에 항균 관리접근법을 통한 병원 내 감염확산 방지 및 통제가 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgements: This paper was supported by the Jinju Health College in 2020. 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; Park JA, Adjunct professor.

REFERENCES

- 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>
- Bedenić B, Plečko V, Sardelić S, Uzunović S, Godić Torkar K. Carbapenemases in gram-negative bacteria: laboratory detection and clinical significance. *BioMed Research International*. 2014;841951. <https://doi.org/10.1155/2014/841951>
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55:4943-4960. <https://doi.org/AAC.00296-11>
- Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*.

- 2014;20:831-838. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
5. 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>
6. Kim JO, Song SA, Yoon EJ, Shin JH, Lee H, Jeong SH, et al. Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a truncated Tn4401a. *Diagn. ZMicrobiol. Infect. Dis*. 2017;87:343-348. <https://doi.org/j.diagmicrobio.2016.12.012>
7. 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>
8. Park SH, Kim JS, Kim HS, Yu YK, Han SH, Kang MJ, et al. Prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Seoul. *J Bacteriol Virol*. 2020;50:107-116. <https://doi.org/10.4167/jbv.2020.50.2.107>
9. 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)
10. Lodise TP, Zhao Q, Fahrback K, Gillard PJ, Martin A. A systematic review of the association between delayed appropriate therapy and mortality among patients hospitalized with infections due to *Klebsiella pneumoniae* or *Escherichia coli*: how long is too long? *BMC Infect Dis*. 2018;18:625. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3524-8>
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-S27. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2017.
12. 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>
13. Cha CH, Hae Kyong An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant Enterococci using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis. *Korean J Lab Med*. 2010;30:138-146. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.2.138>
14. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245:154-60. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
15. Zheng F, Sun J, Cheng C, Rui Y. The establishment of a duplex real-time PCR assay for rapid and simultaneous detection of *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} genes in bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12:30. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-30>
16. 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>
17. Bonine NG, Berger A, Altincatal A, Wang R, Bhagnani T, Gillard P, et al. Impact of delayed appropriate antibiotic therapy on patient outcomes by antibiotic resistance status from serious gram-negative bacterial infections. *Am J Med Sci*. 2019;357:103-110. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.11.009>
18. The Korean Society of Clinical Microbiology. Diagnostic instruction carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) [Internet]. Seoul: The Korean Society of Clinical Microbiology; 2015 [cited 2021 February 9]. Available from: <http://kscm.or.kr/xe/kscmnotice/71241>.
19. 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>
20. 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>
21. Wang L, Gu H, Lu X. A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11:9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-9>
22. 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>
23. 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>
24. 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.
25. Wang P, Chen S, Guo Y, Xiong Z, Hu F, Zhu D, et al. Occurrence of false positive results for the detection of carbapenemases in carbapenemase-negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *PLoS One*. 2011;6:e26356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026356>
26. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:249-251. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp431>
27. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1965-1969. <https://doi.org/10.1128/JCM.00203-11>
28. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:432-438. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x>
29. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase

- production in species of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2009;47:1631-1639. <https://doi.org/10.1128/JCM.00130-09>
30. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother. 2008;61:827-830. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn016>
 31. Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:340-341. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.004>
 32. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, Monteiro N, Nagy E, Peixe L. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2009;64:657-658. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp229>
 33. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-β-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2012;50:1419-1421. <https://doi.org/10.1128/JCM.06276-11>
 34. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79:486-488. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.001>
 35. Goudarzi H, Mirsamadi ES, Ghalavand Z, Hakemi Vala M, Mirjalali H, Hashemi A. Rapid detection and molecular survey of *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis. BMC Microbiology. 2019;19:122. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1510-y>
 36. 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>
 37. 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>