

Molecular Epidemiology and Characterization of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated at a University Hospital in Korea during 4-Year Period

Sunyoung Ahn¹, Ji Yeon Sung¹, Hyunsoo Kim², Myung Sook Kim¹, Younjee Hwang³, Sori Jong¹, Younghee Seo¹, Eunjin Ha⁴, Eun Suk Park⁴, Jun Yong Choi^{4,5}, Dongeun Yong^{1,4}, Kyungwon Lee¹

¹Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, ²Department of Laboratory Medicine, National Police Hospital, ³Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University, ⁴Department of Infection Control, Severance Hospital, ⁵Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) has been increasingly reported worldwide in the past 10 years, which is an important infection control concern. Since the epidemiology and characteristics of these CPEs vary according to institutes, we aimed to characterize CPEs in a university hospital during the recent 4 years.

Methods: From October 2011 to September 2015, CPE isolates from clinical specimens and hospital surveillance cultures were collected. Carbapenem resistance was confirmed by disk diffusion method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by agar dilution method. Carbapenemase production was tested by double disk test using aminophenylboronic acid and dipicolic acid. PCR and sequence analysis were performed to detect *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}-like genes and *bla*_{OXA-48} gene. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus sequence typing (MLST) were conducted for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Results: Twenty-five isolates (11%) of CPE were identified among 222 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates during the study period.

The most prevalent CPE was KPC-producing *K. pneumoniae* and others were IMP-1, VIM-2, NDM-1 type and OXA-48 producing CPEs. Most of these CPEs showed resistance to carbapenems with variable MICs. The sequence types (STs) of KPC-producing *K. pneumoniae* were ST307 and ST11. The PFGE of ST11 and ST307 showed clonality in each group suggesting the possibility of in-hospital outbreak.

Conclusion: The prevalence of CPE has been increasing. In our institute, KPC-producing *K. pneumoniae* was the most frequently isolated CPE in the recent 4 years. CPE including KPC producers can easily transfer their resistance. Therefore continuous monitoring and more intensified infection control for CPE should be considered. (Ann Clin Microbiol 2016;19:39-47)

Key Words: Beta-lactamase KPC, Carbapenem resistance, Enterobacteriaceae, *Klebsiella pneumoniae*

INTRODUCTION

장내세균속(*Enterobacteriaceae*)은 장내 세균총의 정상 무리 중 하나이지만, 지역 사회 감염 혹은 병원 감염의 가장 흔한 병원균이기도 하다[1]. 2000년대 들어 carbapenem을 제외한 대부분의 β -lactam을 분해할 수 있는 TEM, SHV, CTX-M 등의 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 *Enterobacteriaceae*가 전세계적으로 확산되었고, ESBL 생성 세균의 감염을 치료하기 위한 carbapenem의 사용이 증가하였다[2]. Carbapenem은 광범위한 치료 효과를 가지며, ESBL을 생성하는 그람 음성균 감염증에도 치료 효과가 우수하다. 따라서 ESBL 생성 *Enterobacteriaceae* 감염 치료를 위한 주요 항균제로 사용되었으며, 항균제의 ‘최후의 보루’로 여겨졌다. 그러나 최근 carbapenem 사용량이 증가하면서 carbapenem 내성 장내세균속

*riaceae*가 전세계적으로 확산되었고, ESBL 생성 세균의 감염을 치료하기 위한 carbapenem의 사용이 증가하였다[2]. Carbapenem은 광범위한 치료 효과를 가지며, ESBL을 생성하는 그람 음성균 감염증에도 치료 효과가 우수하다. 따라서 ESBL 생성 *Enterobacteriaceae* 감염 치료를 위한 주요 항균제로 사용되었으며, 항균제의 ‘최후의 보루’로 여겨졌다. 그러나 최근 carbapenem 사용량이 증가하면서 carbapenem 내성 장내세균속

Received 15 February, 2016, Revised 25 March, 2016, Accepted 31 March, 2016

Correspondence: Ji Yeon Sung, Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea. (Tel) 82-2-2228-2453, (Fax) 82-2-364-1583, (E-mail) jysung80@yuhs.ac

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 감염증은 전세계적으로 발생이 증가하는 추세이며[1], 미국 질병관리본부 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)에서 분류한 내성 세균 중 긴급한 위협(urgent threat)으로 지정될 만큼 주요 사안이 되고 있다[3].

Carbapenem 내성의 중요한 기전은 carbapenem을 분해하는 효소인 carbapenemase에 의한 것인데, 이들의 유전자는 transposon을 통하여 plasmid 간에 쉽게 전파될 수 있어 carbapenem 내성 확산에 대한 우려가 커지고 있다[4]. 1993년 최초로 NmcA 형 carbapenemase 생성 장내세균속(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE)이 발견된[1] 이후 다양한 CPE들이 보고되고 있다. 이들에 의한 감염증은 치료 약제 선택에 제한을 가져오고, 재원 일수를 늘리며, 환자의 예후를 불량하게 하고 사망률을 증가시킨다[4]. 특히 carbapenem 내성 *Klebsiella pneumoniae*의 경우 의료 환경에서 빠르게 퍼지는 경향을 보여, 병원 내 집단 발병의 위험성도 존재한다[5].

국내에서도 CPE가 지난 몇 년간 지속적으로 증가하고 있으며[6], 2011년부터 질병관리본부는 의료관련감염병에 CRE 감염증을 포함시켜 발생 현황을 감시하고 있다. 국내에서 발생하는 CPE 감염에 대한 연구는 제한되어 있으며[7-9], 또한 CPE 감염의 특성과 역학은 지역 및 기관마다 다를 수 있다. 국내 CPE 군주와 감염에 대한 정보는 감염관리 및 환자 진료를 위한 중요한 기초 자료이기에 본 연구에서는 한 대학 병원에서도 최근 4년간 분리된 CPE의 분자 역학 및 특성에 대하여 고찰하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 군주

2011년 10월부터 2015년 9월까지 세브란스병원의 임상 및 감시 배양 검체에서 분리된 CPE를 대상으로 하였다. 군중 동정은 Vitek 2 (BioMerieux, Durham, NC, USA) 혹은 matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA)를 이용하였다. 한 환자에서 여러 군주가 분리된 경우 최초 분리된 동일 군종의 군주 1개씩을 포함하였다. 감시 배양은 대변을 채취하여 ertapenem disk가 들어있는 trypticase soy broth (TSB)에 접종한 뒤 35°C에서 24시간 배양 후, TSB 100 μ L를 MacConkey 배지에 ertapenem disk와 함께 24시간 계대 배양 하였다. Ertapenem disk 주변 21 mm 이내에 증식한 집락 중 *Enterobacteriaceae*로 의심되는 독립 집락을 선택하여 동정 및 감수성 시험을 진행하였다.

2. 임상역학적 자료 수집

CPE가 분리된 환자들의 의무기록을 후향적으로 조사하여

환자들의 연령, 성별, 입원 경로, 입원 시 진단, 예후 등에 대하여 알아보았다. 분리된 CPE가 감염의 원인 병원균으로 추정되어 치료한 경우 infection으로, 감염 증상을 일으키지 않은 집락화 균으로 생각된 경우 colonization으로 분류하였다.

3. 항균제 감수성 검사 및 carbapenemase 생성 여부 확인

Ampicillin-sulbactam (SAM), piperacillin-tazobactam (TZP), ampicillin (AMP), cefazolin (CFZ), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX), levofloxacin (LVX), tigecycline (TGC), ertapenem (ETP), meropenem (MEM)의 16종의 항균제에 대하여 Vitek 2 자동화 장비를 이용하여 감수성 검사를 실시하여 carbapenem에 내성인 경우 ertapenem과 meropenem에 대해 disk 확산법으로 zone diameter를 확인하고, imipenem으로 modified-Hodge test (MHT)와 ertapenem, imipenem으로 dipicolinic acid (DPA)/aminophenylboronic acid (APBA) double-disk synergy test (DDS)를 시행하였다. DDS는 2개 carbapenem disk 중 하나라도 양성이면 양성으로 판단하였다. Dipicolinic acid DDS에서 양성인 경우 metallo- β -lactamase (MBL) 존재 여부를 확인하기 위해 *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2}형 유전자에 대하여 PCR을 시행하였으며, aminophenylboronic acid DDS에서 양성인 경우 *bla*_{KPC}에 대하여 PCR을 시행하였다. MHT에서 양성을 보여 carbapenemase 생성이 의심되나, 두 가지의 DDS 모두에서 음성인 경우는 *bla*_{OXA-48}에 대한 PCR을 시행하였다. PCR에 사용된 primer 정보는 Table 1과 같다. Imipenem, meropenem 그리고 ertapenem의 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 2015년 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 기준에 따라 한천희석법으로 확인하였으며, 정도 관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27783 군주를 이용하였다[10]. *K. pneumoniae*에 대하여 colistin의 MIC를 확인하기 위해 한천희석법을 시행하

Table 1. Primers used for carbapenemase gene PCR

Gene		Primer sequence	Amplicon size
KPC	Forward	TGGACACACCCATCCGTTAC	500 bp
	Reverse	GACGGCCAACACAATAGGTG	
VIM	Forward	TTTGATTGATACAGCGTGG	459 bp
	Reverse	TGCTTCCGGGTAGTG	
IMP	Forward	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	448 bp
	Reverse	ATAATTTGGCGGACTTTGGC	
NDM	Forward	CAATATTATGCACCCGGTCTG	726 bp
	Reverse	ATCATGCTGGCCTTGGGGAA	
OXA	Forward	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744 bp
	Reverse	GAGCACTTCTTTTGTGATGG	

었고, CLSI에 기준이 명시되어 있지 않아 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)의 기준을 적용하였다[11]. CRE는 디스크 확산법으로 하나 이상의 carbapenem 항균제에 내성을 보이거나 carbapenemase 유전자를 PCR로 확인한 CPE 균주로 정의하였다.

4. *K. pneumoniae* 균주에 대한 MLST 및 PFGE

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) 생성 *K. pneumoniae* 균주들에 대하여 multilocus sequence typing (MLST) 및 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 시행하였다. MLST는 7개의 housekeeping 유전자인 *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB*를 PCR 후 염기서열을 분석하였다(Table 2) [12]. Sequence type (ST)은 각 유전자의 염기서열 분석 결과를 MLST database (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopol/PF8/mlst/Kpnuemoniae.html>)에 입력 후 판정하였다.

PFGE는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 시험법에 따라 *Xba*I (Roche, Mannheim, Germany)로 DNA 절단 후 CHEF-ER[®]II system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 절편들을 분리하였고, InforQuestFP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Version 4.5) 프로그램으로 분석하여 dendrogram을 얻었다.

RESULTS

연구 기간 동안 총 222개의 CRE 균주가 분리되었고, 그 중 25균주(11%)가 CPE로 확인되었다. 연도별 CPE 발생 건수는 점차 증가하였고 특히 2015년에 9개월간 16건으로 크게 증가하였다(Fig. 1).

CPE가 분리된 환자군의 평균 나이는 58.2세(0-84세)이었고

남녀 비는 1.1 : 1로 비슷하였다(Table 3). 검체의 종류는 소변(5건), 혈액(4건), 객담(4건), 담즙(2건), 기타(5건)로 다양하였고, 병원균은 25균주 중 11균주(44%)였다. 감염 관리 감시의 목적으로 시행한 대변 배양에서도 5건(20%) 분리되었다. 대변 감시 배양은 2013년 8월부터 시행된 검사로, 2015년 9월까지 CRE 양성률은 5.06% (36/711)였고, CPE 양성률은 2.25% (16/711)였다. 25명의 환자군 중 CPE 분리 후 30일 이내 사망한 환자는 5명(20%, Isolates 1, 2, 3, 10, 12)이었고, 이 중 2명 (Isolates 1, 3)에서는 CPE가 병원균이었다.

분리된 CPE는 *K. pneumoniae* (18주)가 가장 많았고, 그 다음 *Klebsiella oxytoca* (2주), *E. coli* (2주), *Enterobacter aerogenes* (1주), *Enterobacter cloacae* (1주), *Serratia marcescens* (1주) 순이었다(Table 4). 2013년 이전에는 IMP-1와 VIM-2형 CPE가 분리되었으나, 2014년과 2015년에는 KPC 생성 CPE가 각각 3

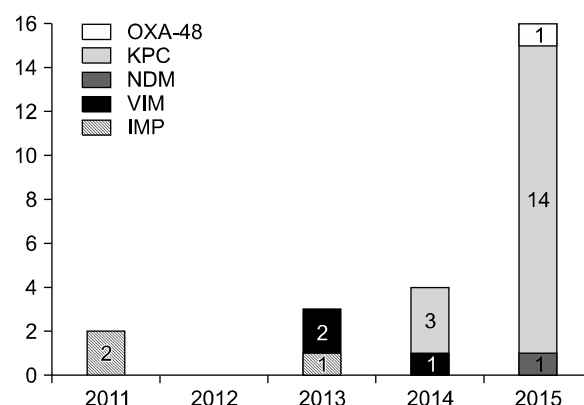


Fig. 1. The number of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates and carbapenemase types reported annually.

Table 2. Gene loci included in the *Klebsiella pneumoniae* Multilocus sequence typing scheme and PCR primers

Locus	Putative function of gene	Primer sequence	Size (bp)	Number of alleles
<i>rpoB</i>	Beta-subunit of RNA polymerase B	(F) VIC3: GGCGAAATGGCWGAGAACCA (R) VIC2: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	501	8
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(F) 173: TGAAATATGACTCCACTCACGG (R) 181: CTTCAAGCGGCTTTGATGGCTT	450	6
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	(F) 130: CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG (R) 867: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	477	10
<i>pgi</i>	Phosphoglucose isomerase	(F) 1R: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC (R) 1F: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	432	6
<i>phoE</i>	Phosphoprotein E	(F) 604.1: ACCTACGCAACACCGACTTCTTCGG (R) 604.2: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	420	14
<i>infB</i>	Translation initiation factor 2	(F) 1F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG (R) 1R: CGCTTTCCAGCTCAAGAACTTC	318	10
<i>tonB</i>	Periplasmic energy transducer	(F) 1F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT (R) 2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414	21

Abbreviations: (F), forward; (R), reverse.

Table 3. Clinical features of 25 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates

Isolate	Year	Age	Sex	Admitted from	Reason for Admission	Interval from admission to positive culture (days)	Source	Infection or colonization	Outcome
1	2011	74	F	Home	Congestive heart failure	16	Blood	Infection	Expired
2	2011	55	F	Home	Pulmonary thromboembolism	23	Urine	Colonization	Expired
3	2013	57	M	Home	Hematochezia	3	Blood	Infection	Expired
4	2013	72	M	Home	Dyspnea	6	Sputum	Infection	Expired
5	2013	56	M	Home	Hepatocellular carcinoma	4	Blood	Infection	Discharged
6	2014	61	F	Home	Vesicovaginal fistula	133	Urine	Infection	Discharged
7	2014	84	F	Hospital A	Perforation of small bowel	2	Blood	Infection	Expired
8	2014	73	M	Home	Intracranial hemorrhage	0	Sputum	Colonization	Discharged
9	2014	72	M	Hospital B	Quadriplegia	72	Sputum	Infection	Transferred
10	2015	81	M	Home	Aspiration pneumonia	129	Endotracheal aspirate	Colonization	Expired
11	2015	60	F	Home	Lateral medullary infarction	12	Sputum	Colonization	Discharged
12	2015	47	M	Hospital C	Brain death donor	0	Endotracheal tube tip	Colonization	Expired
13	2015	69	F	Hospital C	Hematochezia	5	Drainage Buttock	Infection	Transferred
14	2015	70	M	Hospital D	Middle cerebral artery infarction	28	Peritoneal fluid	Infection	Discharged
15	2015	78	M	Home	Traumatic subdural hemorrhage	77	Stool CRE culture	Colonization	Transferred
16	2015	0	F	Hospital E	Neonatal jaundice	0	Stool CRE culture	Colonization	Discharged
17	2015	70	M	Hospital D	Middle cerebral artery infarction	79	Stool CRE culture	Colonization	Discharged
18	2015	52	F	Home	Choroid plexus carcinoma	53	Urine	Colonization	Discharged
19	2015	23	F	Hospital F	Tuberculous meningoencephalitis	21	Urine	Colonization	Transferred
20	2015	71	M	Home	Acute pulmonary edema	3	Drainage Foot	Colonization	Discharged
21	2015	1	F	Home	Sepsis	22	Stool CRE culture	Colonization	Discharged
22	2015	55	M	Home	Klatskin's tumor	48	Bile	Infection	Discharged
23	2015	57	F	Hospital G	Pancreatic cancer, head	30	Bile	Infection	Discharged
24	2015	48	F	Hospital H	Cellulitis	13	Urine	Colonization	On admission
25	2015	68	M	Home	Hepatocellular carcinoma	31	Stool CRE culture	Colonization	Discharged

주, 14주 검출되었다. KPC형 CPE 중에서 16주가 *K. pneumoniae*였다. OXA-48 및 NDM-1형 CPE 균주는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*로 2015년 5월 및 2015년 7월에 각각 한 주씩 분리되었다. CPE 균주는 IMP-1, VIM-2, NDM-1 형인 경우 DPA DDS 양성을 보였고, 2균주(IMP-1형과 VIM-2형)를 제외하고는 모두 MHT 양성을 보였다. KPC 생성 CPE 균주는 모두 MHT와 APBA DDS에서 양성을 보였다. OXA-48 생성 *E. coli*는 MHT는 양성이었으나 DDS는 음성이었다.

항균제 감수성 결과는 다양하였다(Table 4). 검출된 모든 균주가 penicillin과 대부분의 cephalosporin, carbapenem 및 fluoroquinolone에 내성을 보였다. Aztreonam, amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) 내성률은 각각 84%, 20%, 48%, 및 48%였다. Tigecycline에 대한 내성 및 중간 내성도 10주(40%)에서 확인되었다. 특징적으로 2015년에 분리된 OXA-48 생성 *E. coli* 한 주의 경우 자동화 장비에서 ertapenem MIC가 4 µg/mL로 내성이어서 시행한 디스크 확산법에서

는 ertapenem과 meropenem에 모두 중간 내성을 보였고, 한천 희석법으로 확인한 MIC는 모든 carbapenem 계열 항균제에 감수성이었다. 이 균주는 MHT에서 양성이었고 PCR 및 염기서열 분석 결과 *bla_{OXA-48}*이 확인되었다. 총 18주의 *K. pneumoniae*에서 시행한 colistin MIC는 16주에서 감수성이었고(MIC 0.5-1 µg/mL), 2주(Isolates 15와 21)에서 MIC가 각각 4 µg/mL와 8 µg/mL로 내성이었다.

MLST를 시행한 KPC 생성 *K. pneumoniae* 16주는 모두 ST307 (9주) 또는 ST11 (7주)이었다. ST307은 2014년과 2015년에 걸쳐서, ST11은 2015년에 분리되었다. ST307 8주 및 ST11 7주에 대하여 시행한 PFGE 결과 각 ST별로 연관성이 나타났다, 특히 시기별로 PFGE 상 동일한 클론을 보여 병원 내 유행을 시사하였다. 하지만 2014년말에서 2015년초에 걸쳐 분리된 ST307 균주들과 2015년 9월에 분리된 ST307 균주들은 PFGE에서 80% similarity를 기준으로 하였을 때, 서로 다른 클론으로 판정되었다(Fig. 2).

Table 4. Antimicrobial susceptibility, sequence type and plasmid characteristics of 25 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates

Isolate	Year	Source	Species	MHT	DDS	Carbapenemase type	Minimal inhibitory concentrations (μg/mL)*																
							ETP	IPM	MEM	SAM	TZP	AMP	CFZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	AMK	GEN	TMP/ SMX	LVX	TGC
1	2011	Blood	KOX	—	+	IMP-1	≥64	8	8	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	16	2	≤2	≥16	≤20	1	≤0.5	
2	2011	Urine	EAE	+	+	IMP-1	64	16	4	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	2	≥64	≤2	≤1	≤20	≤0.12	≤0.5	
3	2013	Blood	KOX	—	+	VIM-2	8	4	8	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	8	16	≤1	16	≤2	8	≤20	1	≤0.5
4	2013	Sputum	ECL	+	+	VIM-2	2	8	2	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	8	4	≤1	≤1	≥64	≥16	≥320	≥8	1
5	2013	Blood	KPN	+	+	IMP-1	64	64	32	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	≤20	1	2	
6	2014	Urine	SMA	+	+	VIM-2	4	2	4	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	16	2	2	16	≥16	80	≥8	2	
7	2014	Blood	KPN	+	+	KPC	32	8	8	≥32	≥128	≥32	≥64	16	≥64	16	≥64	≤2	≥16	≥320	≥8	2	
8	2014	Sputum	KPN	+	+	KPC	8	4	4	≥32	≥128	≥32	≥64	16	≥64	32	≥64	4	≥16	≥320	≥8	2	
9	2014	Sputum	KPN	+	+	KPC	32	16	8	≥32	≥128	≥32	≥64	16	4	16	2	≥64	≤2	≤1	≥320	≥8	2
10	2015	Endotracheal aspirate	KPN	+	+	KPC	32	8	8	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	4	2	≥320	≥8	≥8	
11	2015	Sputum	KPN	+	+	KPC	≥128	32	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≤20	≥8	2	
12	2015	Endotracheal tube tip	KPN	+	+	KPC	≥128	32	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≤20	≥8	1	
13	2015	Drainage	KPN	+	+	KPC	≥128	32	≥128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≤20	≥8	≥8	
14	2015	Buttock	KPN	+	+	KPC	≥128	64	≥128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	≤20	≥8	≥8	
15	2015	Peritoneal fluid	KPN	+	+	KPC	≥128	32	≥128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	8	16	2	≥64	≤2	≤1	≥320	4	
16	2015	Stool CRE culture	KPN	+	+	KPC	≥128	32	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	32	≥16	≥320	≥8	2	
17	2015	Stool CRE culture	KPN	+	+	KPC	≥128	8	64	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥320	≥8	2	
18	2015	Urine	KPN	+	+	KPC	≥128	64	≥128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	≤20	≥8	≥8	
19	2015	Urine	ECO	+	—	OXA-48	0.5	1	0.5	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥320	≥8	≤0.5	
20	2015	Drainage	KPN	+	+	KPC	≥128	32	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	≤20	≥8	≥8
21	2015	Foot	KPN	+	+	NDM-1	128	128	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	16	≤1	≤2	≤1	≤20	≤0.12	1	

Table 4. Continued

Isolate	Year	Source	Species	MHT	DDS	Carbapenemase type	Minimal inhibitory concentrations (μg/mL)*																	
							ETP	IPM	MEM	SAM	TZP	AMP	CFZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	AMK	GEN	TMP/ SMX	LVX	TGC	
22	2015	Bile	KPN	+	+	KPC	≥128	64	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	40	≥8	≥8
23	2015	Bile	KPN	+	+	KPC	128	32	64	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≥16	≥320	≥8	≥8
24	2015	Urine	KPN	+	+	KPC	≥128	64	128	≥32	≥128	≥32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	40	≥8	≥8
25	2015	Stool CRE culture	KPN	+	+	KPC	128	64	32	≥32	≥128	≥32	≥64	32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤2	≤1	≥320	≥8	≥8

*MIC was measured by VITEK 2 except for ETP, IPM, MEM which were measured by agar dilution test.

Abbreviations: MHT, Modified-Hodge test; DDS, double disk synergy test; ETP, ertapenem; IPM, imipenem; MEM, meropenem; SAM, ampicillin-sulbactam; TZP, piperacillin-tazobactam; AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; FOX, cefoxitin; CTX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TMP/SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole; LVX, levofloxacin; TGC, tigecycline; KOX, *Klebsiella oxytoca*; EAE, *Enterobacter aerogenes*; ECL, *Enterobacter cloacae*; KPN, *Klebsiella pneumoniae*; SMA, *Serratia marcescens*; ECO, *Escherichia coli*.

Black, resistant; Gray, intermediate; White, susceptible.

DISCUSSION

2015년 질병관리본부의 통계에 따르면 국내에서 CPE는 2011년 16주, 2012년 39주, 2013년 91주, 2014년 174주가 확인되었다[6]. 이처럼 국내에서도 CPE의 발생이 지속적 증가 추이를 보이고 있어 CPE에 대한 적극적인 감시 및 감염 관리의 중요성이 커지고 있다. 본 연구는 국내 CPE 발생 경향에 대하여 전반적으로 평가하였다고 보기는 어렵지만, 한 기관에서 4년간 발생한 CPE에 대해 역학 및 임상적, 분자 생물학적 특성을 종합적으로 고찰하였음에 의의를 지닌다.

연구 기간 동안 확인된 전체 CRE 중 CPE는 11%였다. CPE 중 가장 많은 균종은 *K. pneumoniae* (72%)로, 질병관리본부의 보고와 일치하였다. 본원에서 주로 확인된 carbapenemase 유전자는 *bla_{KPC}* (68%)였다. 질병관리본부 국내 보고에서 가장 빈도가 높았던 *bla_{OXA-232}* 양성 CPE는 본 연구에서 분리되지 않았다. *bla_{OXA-48}* 양성 *E. coli*가 외국인 환자에서 한 주 분리되었는데, 염기서열 분석으로 *bla_{OXA-48}* 유전자를 확인하였고, 이것은 국내에서 처음 발견된 것으로 해외에서 유입되었을 가능성이 있다. 동일한 환자에서 시간 간격을 두고 다른 CPE 균종이 분리된 경우도 있었다. 이 환자에서 시차를 두고 분리된 *K. pneumoniae*와 *E. coli*에서 PCR을 통해 *bla_{KPC}*를 확인할 수 있었다. 먼저 분리되었던 *K. pneumoniae*는 amikacin, gentamicin 및 TMP-SMX에 감수성이었으나 나중 분리된 *E. coli*는 내성이었다. *K. pneumoniae*에서 *E. coli*로 *bla_{KPC}* 유전자를 포함한 Tn4401이 plasmid와 함께 수평 전파되는 것은 여러 연구에서 보고된 바가 있다[13-17]. 이 환자의 경우도 같은 기전이었을 것으로 추측되나, 자세한 전파 과정의 확인을 위해서는 후속 연구가 필요하다.

KPC 생성 CPE는 1990년대 후반부터 분리되기 시작하였고, 2000년대 중반부터 유럽에서 KPC 생성 *K. pneumoniae*가 전파되고 있으며 일부 지역에서는 endemic하게 나타나고 있다[18]. KPC 생성 *K. pneumoniae*의 감염은 환자의 사망률을 유의하게 증가시키는 것으로 보고되었다[19,20]. 따라서 본 연구에서 분리된 CPE 중 상당 부분인 16주(64%)가 KPC 생성 *K. pneumoniae*라는 사실은 CPE 감염 관리에 있어 주목할 만한 결과로 생각된다. 같은 *Enterobacteriaceae* 내에서도 획득한 β -lactamase의 종류에 따라 항균제 감수성은 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다[21]. 그러나 이번 연구에서는 다양한 종류의 carbapenemase 유전자가 발견되었음에도 불구하고 전체적인 항균제 감수성이 비슷하였으며, 대부분 penicillin, cephalosporin 및 carbapenem 계열 항균제에 내성이었다. Amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin, tigecycline에 대하여는 비교적 다양한 감수성을 보였다. 본 연구에서 분리된 OXA-48 생성 *E. coli*는 자동화 장비에서 ertapenem 내성, meropenem 중간 내성이었으나, disk 확산법에서는 ertapenem과



Fig. 2. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* dendrogram based on Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern and their sequence type. Abbreviation: ST, sequence type.

meropenem 모두 중간 내성이었고, 한천희석법에서 모든 carbapenem 계열 항균제에 감수성이었다. 반면 모든 cephalosporin 계열 항균제와 aztreonam, gentamicin 그리고 levofloxacin에 내성이었다. OXA-48 효소 자체는 penicillin 계열 항균제를 강하게 가수분해하지만 carbapenem 계열 항균제는 약하게 가수분해하며 광범위 cephalosporin에 대한 분해력은 매우 낮다고 보고된 바 있다[22]. 그러나 대부분의 OXA-48 생성 균주는 ESBL 등의 다른 β -lactamase를 같이 가지고 있기 때문에 상대적으로 다양한 β -lactamase 활성을 나타낸다[23,24]. 분리된 *bla*_{OXA-48} 양성 *E. coli*가 cephalosporin 계열 항균제에 강한 내성을 보이는 것도 ESBL 등의 다른 β -lactamase 때문일 가능성이 있다. 2014년까지 분리된 *K. pneumoniae* 균주들은 colistin에 감수성이었으나, 2015년 colistin에 내성인 *K. pneumoniae* 두 균주가 검출되었다. 이 균주들은 각각 KPC와 NDM-1을 생성하였다. 최근 유럽에서 KPC 생성 *K. pneumoniae*의 colistin 내성률이 증가한다는 보고들이 있어 추후 지속적인 감시가 필요하겠다[19,20].

KPC 생성 *K. pneumoniae*에 대한 MLST 결과는 ST307 (8주), ST11 (7주)의 2가지로 분류되었다. 현재 KPC 생성 *K. pneumoniae* 중 전세계적으로 가장 널리 전파된 sequence type은 ST258이다[25]. ST11은 ST258의 single locus variant로, ST258이 *tonB-79* allele을 획득한 결과 ST11이 생겨난 것으로 추측된다[26]. ST11 *K. pneumoniae*는 유럽 전역에서 널리 보고되었으며(www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/), epidemic clone III (EC III)로 기술되기도 하였다[27]. 또한 ST11은 아시아와 라틴 아메리카에서도 주요 클론에 속하며[4], 특히 중국에서 가장 흔한 클론으로 알려져 있고[28], 한국에서는 오히려 감염과 균혈증을 일으키는 대표적인 클론으로 보고되었다[7]. 반면 본 연구에서 가장 많이 발견된 *K. pneumoniae*의 sequence type인 ST307에 대한 보고는 드물다. 이탈리아에서 KPC 생성 *K. pneumoniae*의 ST258과 ST307의 동시 outbreak가 보고된 적 있으며[29], 한국에서는 ciprofloxacin 내성 *K. pneumoniae* 분석에서 ST307이 한 번 보고되었다[30]. ST307이 분자 유전학적으로 ST258이나 ST11과 많은 차이를 보이며[30], ST307이 처음 분리된 환자가 외부 요양병원에서 전원 되었다는 사실은 ST307이 외부에서 유입된 뒤 본원에서 outbreak가 일어났을 가능성

을 시사한다. PFGE 결과는 ST가 동일한 균주에서 같은 클론을 나타내었지만 같은 ST 안에서도 변화가 있었다. 2014년말에서 2015년초에 걸쳐 분리된 ST307 균주들과 2015년 9월에 분리된 ST307 균주들은 PFGE dendrogram에서 전혀 다른 패턴의 band를 보였는데, 이는 PFGE가 변별력이 우월하여 같은 ST 안에서도 균주별 차이를 구분할 수 있기 때문인 것으로 생각된다[31]. 같은 환자에서 분리 시기가 다른 균주이거나 오랜 기간 동안 지속적으로 배양된 균주의 경우 단일 유전적 변화 사건으로 인해 PFGE의 두세 개 band에 차이가 날 수 있다[32].

이번 연구에서 확인된 CPE 균주들은 산발적인 감염에 더해 2014년과 2015년에 소규모 outbreak이 나타난 것으로 생각된다. 같은 시기에 CPE가 분리된 Isolates 8, 9, 10과 Isolates 11, 12, 13 그리고 Isolates 22, 23, 24, 25는 동일한 PFGE 결과와 sequence type을 나타내었다. 병원 감염 관리실의 역학 조사 결과, 이들 세 그룹 내 환자들은 각각 중환자실이나 병동에서 접촉한 과거력이 있었다. Isolates 12, 13은 같은 병원에서 전원되어 CPE의 외부 유입으로 인한 전파 가능성도 우려되었으나, 적극적인 역학 조사 및 감시 배양과 환자 격리를 통해 전파는 비교적 빠른 시일 안에 종결되었다.

본 연구에서는 국내 대학병원에서 동정된 CPE의 분자 역학 및 특성에 대해 살펴보았다. 연구 결과 분리된 CRE 중 CPE 비율은 11%였고, KPC 생성 *K. pneumoniae*가 대다수를 차지하였다. 거의 모든 CPE가 다제 내성을 나타내었는데, 특히 2015년부터 분리된 균주들은 tigecycline에 내성을 보이기도 하였고, colistin 내성인 균주도 두 주 발견되었다. 이처럼 CPE의 빠른 전파 속도와 증가하는 항균제 내성을 고려할 때, CPE에 대한 강화된 감염 관리가 필요하다고 여겨진다. 본 기관에서 최근 4년간의 CPE 발생을 분석하여 얻은 정보는 향후 국내 CPE 감염 관리 및 내성 연구를 위한 중요한 기초 자료가 될 것이다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2015년 대한임상미생물학회의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791-8.
- Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* 2010;70:313-33.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> [Online] (last visited on 1 November 2015).
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228-36.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682-707.
- Park JW, Lee EJ, Lee DH. Status of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in Korea, 2014. *Public Health Weekly Report* 2016;9:9-13.
- Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol* 2010;59:822-8.
- Kim SY, Shin J, Shin SY, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:486-90.
- Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, et al. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2012;50:1433-6.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). <http://www.eucast.org/> [Online] (last visited on 1 November 2015).
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:4178-82.
- Gona F, Barbera F, Pasquariello AC, Grossi P, Gridelli B, Mezzatesta ML, et al. In vivo multiclonal transfer of *bla*_{KPC-3} from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in surgery patients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O633-5.
- Goren MG, Carmeli Y, Schwaber MJ, Chmelnitsky I, Schechner V, Navon-Venezia S. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1014-7.
- Tijet N, Muller MP, Matukas LM, Khan A, Patel SN, Melano RG. Lateral dissemination and inter-patient transmission of *bla*_{KPC-3}: role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:344-7.
- Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AK, Carroll J, et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio* 2011;2:e00204-11.
- Richter SN, Frasson I, Bergo C, Parisi S, Cavallaro A, Palù G. Transfer of KPC-2 carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe. *J Clin Microbiol* 2011;49:2040-2.
- Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014;22:686-96.
- Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill* 2014;19.
- Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2133-43.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:112-22.
- Docquier JD, Calderone V, De Luca F, Benvenuti M, Giuliani F, Bellucci L, et al. Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. *Chem Biol* 2009;16:540-7.
- Doi Y and Paterson DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36:74-84.
- Song W, Jeong SH, Lee J, Lee SS, Lee K. Emergence and spread of OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Korean J Nosocomial Infect Control* 2015;20:7-18.
- Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Zhao Y, Fraimow HS, Jenkins SG, et al. Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3444-7.
- Wang Q, Li B, Tsang AK, Yi Y, Woo PC, Liu CH. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. *PLoS One* 2013;8:e57091.
- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother* 2008;62:978-85.
- 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;66:307-12.
- Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microb Drug Resist* 2013;19:295-7.
- Park DJ, Yu JK, Park KG, Park YJ. Genotypes of ciprofloxacin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Korea and their characteristics according to the genetic lineages. *Microb Drug Resist* 2015;21:622-30.
- Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2007;45:3707-12.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.

=국문초록=

최근 4년간 한 대학병원에서 분리된 Carbapenemase 생성 *Enterobacteriaceae*의 분자 역학과 특성 분석

¹연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소, ²국립경향병원 진단검사의학과, ³연세대학교 의과대학 Brain Korea 21 PLUS Project, ⁴세브란스병원 감염관리실, ⁵연세대학교 의과대학 내과학교실 감염내과

안선영¹, 성지연¹, 김현수², 김명숙¹, 황연지³, 종소리¹, 서영희¹, 하은진⁴, 박은숙⁴, 최준용^{4,5}, 용동은^{1,4}, 이경원¹

배경: Carbapenemase 생성 장내세균속(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE)에 의한 감염증은 최근 10년간 전 세계적으로 증가하였으며, 이러한 내성균에 의한 감염은 예후가 좋지 않고 전파 위험이 있어 감염 관리의 중요한 사안이 되었다. CPE의 역학과 특성은 기관마다 다를 수 있기에 본 연구에서는 한 대학병원에서 최근 4년간 분리 동정된 CPE의 분자역학 특성을 분석하였다.

방법: 2011년 10월부터 2015년 9월까지 세브란스병원의 임상 및 감시 배양 검체에서 분리된 CPE의 임상적 특성 및 항균제 감수성 결과를 분석하였다. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) 생성 *Klebsiella pneumoniae*는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)와 multilocus sequence typing (MLST)를 추가로 시행하였다.

결과: 연구기간 동안 carbapenem 내성 장내세균속은 총 222주가 분리되었고, 그 중 CPE는 25주(11%)였다. 가장 많은 수를 차지한 것은 KPC 생성 *K. pneumoniae*였는데 2015년에 14주가 집중하여 분리되었고, 그 외 IMP-1형, VIM-2형, NDM-1형, OXA-48형 CPE가 확인되었다. CPE의 carbapenem 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 다양하였다. KPC 생성 *K. pneumoniae*는 ST307과 ST11이었고, PFGE에서는 시기별로 특정 clone의 outbreak를 시사하였다.

결론: 최근 4년간 본 기관에서 CPE 발생은 증가하였고, 가장 많은 균주는 KPC 생성 *K. pneumoniae*이었다. Carbapenem 내성 확산을 방지하기 위하여 CPE에 대한 지속적인 감시와 강화된 감염 관리가 필요하다. [Ann Clin Microbiol 2016;19:39-47]

교신저자 : 성지연, 03722, 서울시 서대문구 연세로 50-1
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소
Tel: 02-2228-2453, Fax: 02-364-1583
E-mail: jysung80@yuhs.ac