

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0030429 (43) 공개일자 2014년03월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/04 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(21) 출원번호	10-2012-0094634	(72) 발명자 송원근 서울 영등포구 신길로 1, 진단검사의학과 (대림동, 강남성심병원)
(22) 출원일자	2012년08월29일	정석훈 서울특별시 강남구 도곡동 211 연세대학교 강남세브란스병원 진단검사의학과
심사청구일자	2012년08월29일	(74) 대리인 강성혜

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **β -락타메이즈 저해제를 이용한 액체배지 미량희석법으로 KPC 및 MBL 생산을 탐지하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 다양한 β -락타메이즈 저해제를 이용하여 그람음성간균 임상 분리물에서 클렙시엘라 뉴모니아 카바페네메이즈 (KPCs) 및 메탈로- β -락타메이즈 (MBLs) 생산을 탐지하기 위한 액체배지 미량희석법에 관한 것이다. 카바페네메이즈 탐지 시험법은 이미페넴 (imipenem) 또는 메로페넴 (meropenem)의 순차적인 2배 희석액을 포함하고, 아미노페닐보론산 (APB), 페닐보론산 (PB), 클록사실린 (CLX), 디피콜린산 (DPA) 또는 EDTA를 포함하거나 포함하지 않는 Mueller-Hinton 액체배지로 이루어졌으며, KPC가 있는 31개의 클렙시엘라 뉴모니아 균주, 21개의 MBL 생산균주 및 포린이 손실되고 플라스미드 AmpC 생산 또는 염색체 AmpC 과다생산을 하는 16개의 엔테로박테리아세아 균주에 대해 평가하였다. 이미페넴 또는 메로페넴 단독처리한 경우와 비교하여 β -락타메이즈 저해제 존재 하에 이미페넴 또는 메로페넴의 최소생육저해농도는 3배 또는 그 이상 감소하였고, 이러한 결과를 양성 결과로 판단하였다. 페닐보론산을 넣거나 또는 넣지 않고 이미페넴으로 본 발명의 액체배지 미량희석법을 이용하여 얻어진 결과는 클렙시엘라 뉴모니아 탐지에서 음성 CLX 결과라는 부가적인 기준을 포함하면, KPC 효소에 가장 필적할 만한 민감도 (94%) 및 특이도 (95%)를 나타내었다. DPA와 EDTA는 모두 MBL 생산 그람음성간균 탐지에 탁월한 민감도 (DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 이미페넴 처리는 90% vs. 95%; DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 메로페넴 처리는 95% vs. 86%)와 특이도 (DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 이미페넴 처리는 98% vs. 100%; DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 메로페넴 처리는 98% vs. 98%)를 보였다. 본 발명은 페닐보론산, 클록사실린 및 EDTA를 가하거나 가하지 않고 실시한 이미페넴을 이용한 액체배지 미량희석 시험법이 KPC 및 MBL 효소 탐지에 가장 효과적인 결과를 제공함을 보여주었다.

특허청구의 범위

청구항 1

표현형 카바페네메이즈 탐지 방법에 있어서,

이미페넴 (imipenem)의 순차적인 2배 희석액, 메로페넴 (meropenem)의 순차적인 2배 희석액을 포함하고, 이미페넴-아미노페닐보론산 (APB), 이미페넴-페닐보론산 (PB), 이미페넴-클록사실린 (CLX), 이미페넴-디피콜린산 (DPA), 이미페넴-EDTA, 메로페넴-아미노페닐보론산 (APB), 메로페넴-페닐보론산 (PB), 메로페넴-클록사실린 (CLX), 메로페넴-디피콜린산 (DPA) 또는 메로페넴-EDTA의 순차적인 2배 희석액 액체배지를 이용하여 시험균주의 최소생육저해농도를 평가하되, 아미노페닐보론산 (APB), 페닐보론산 (PB), 클록사실린 (CLX), 디피콜린산 (DPA) 및 EDTA를 포함하는 β -락타메이즈 저해제를 가한 액체배지에서 최소생육저해농도와, 이미페넴 또는 메로페넴 단독 액체배지에서의 최소생육저해농도를 비교하여 최소생육저해농도의 감소비율을 결정하고, 감소비율이 3배 이상인 경우를 양성, 2배 이하인 경우를 음성으로 판정하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

이미페넴-페닐보론산 함유 액체배지 또는 메로페넴-페닐보론산 함유 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때 그 세균을 KPC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

메로페넴-디피콜린산 액체배지 및 이미페넴-EDTA 액체배지에 모두 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈로- β -락타메이즈 (MBL) 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

이미페넴-페닐보론산 액체배지 및 이미페넴-클록사실린 액체배지에 모두 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC- β -락타메이즈 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

이미페넴-페닐보론산 액체배지에 양성 결과를 나타내고, 이미페넴-클록사실린 액체배지에 음성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 KPC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

(이미페넴 또는 메로페넴)-디피콜린산 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈로- β -락타메이즈

(MBL) 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

(이미페넴 또는 메로페넴)-EDTA 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈로- β -락타메이즈 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

(이미페넴 또는 메로페넴)-아미노페닐보론산 액체배지에 양성 또는 음성이고, (이미페넴 또는 메로페넴)-클록사실린 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

(이미페넴 또는 메로페넴)-페닐보론산 액체배지에 양성 또는 음성이고, (이미페넴 또는 메로페넴)-클록사실린 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다양한 β -락타메이즈 저해제를 이용하여 그람음성간균 임상 분리물에서 클렙시엘라 뉴모니에 카바페네메이즈 (KPCs) 및 메탈로- β -락타메이즈 (MBLs)의 생산을 탐지하기 위한 액체배지 미량희석법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 엔테로박테리아세아 (*Enterobacteriaceae*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 속 (*Acinetobacter* spp.)과 같은 카바페네메이즈 생산 그람음성간균이 전세계적으로 출현하고 있다. 카바페네메이즈에는 클래스 A 카바페네메이즈인 클렙시엘라 뉴모니에 (*Klebsiella pneumoniae*) 카바페네메이즈 (KPCs), 클래스 B (메탈로- β -락타메이즈; MBLs) 카바페네메이즈인 VIM, IMP 및 NDM, 그리고 클래스 D 카바페네메이즈인 OXA 등이 있다 (Cao et al., J Antimicrob Chemother 2000;46:895-900; Mammeri et al., Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4556-60; Nordmann et al., Emerg Infect Dis 2011;17:1791-8). 임상 실험실에서 카바페네메이즈 생산자의 빠른 탐지는 적절한 치료 계획을 결정하고 감염 제어 조치를 이행하기 위해서 매우 중요하다. PCR과 서열결정에 의한 카바페네메이즈 유전자형 결정은 표준방법이지만, 몇몇 표준 실험실에서만 이용 가능하다. 카바페네메이즈 표현형을 탐지하기 위해 몇 가지 방법이 개발되었다. 변형 호지 시험법 (modified Hodge test)는 일상적인 임상 미생물학 세팅에서 이용할 수 있고, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)에서 추천하였기 때문에 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012) 카바페네메이즈를 탐지하기 위한 기술로서 광범위하게 이용되어 왔다. 그렇지만, 이 시험법은 KPCs와 다른 카바페네메이즈 등을 구별할 수 없고, 특이도가 낮다 (Seah et al., J Clin Microbiol 2011;49:1965-9). KPC와 MBLs를 탐지하기 위해 β -락타메이즈 저해제인 아미노페닐보론산 (APB), 페닐보론산 (PB), 디피콜린산 (DPA), EDTA 또는 클록사실린 (CLX)을 첨가한 카바페넴 디스크를 이용한 디스크 시험법이 개

발되어 있다 (Giske et al., Clin Microbiol Infect 2011;17: 552-6; Pluquet et al., J Clin Microbiol 2011;49:2667-70; Seah et al., J Clin Microbiol 2011;49:1965-9).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명의 목적은 다양한 β -락타메이즈 저해제를 사용하여 액체배지 미량희석법으로 임상검체에서 분리된 그람 음성간균에서 KPCs 및 MBLs를 탐지하는 방법을 개발하여 이를 상업적으로 이용 가능한 감수성시험 장비에 적용할 수 있도록 하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 위와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명자는 이미페넴의 순차적인 2배 희석액 액체배지, 메로페넴의 순차적인 2배 희석액 액체배지와, 이미페넴과 아미노페닐보론산을 포함하는 액체배지, 이미페넴과 페닐보론산을 포함하는 액체배지, 이미페넴과 클록사실린을 포함하는 액체배지, 이미페넴과 디피콜린산을 포함하는 액체배지, 이미페넴과 EDTA를 포함하는 액체배지, 메로페넴과 페닐보론산을 포함하는 액체배지, 메로페넴과 클록사실린을 포함하는 액체배지, 메로페넴과 디피콜린산을 포함하는 액체배지 및 메로페넴과 EDTA를 포함하는 액체배지를 이용하여 시험균주의 최소생육저해농도 (MIC)를 평가하되, 다양한 β -락타메이즈 저해제를 가한 액체배지에서 최소생육저해농도와 이미페넴 또는 메로페넴 단독 액체배지에서의 최소생육저해농도를 비교하여 최소생육저해농도의 감소비율을 결정하고 이것이 3배 이상인 경우를 양성 (positive)으로, 2배 이하인 경우를 음성 (negative)으로 판정하였다.

[0005] 본 발명은 표현형 카바페네메이즈 탐지 방법에 있어서, 이미페넴 (imipenem)의 순차적인 2배 희석액, 메로페넴 (meropenem)의 순차적인 2배 희석액을 포함하고, 이미페넴-아미노페닐보론산 (APB), 이미페넴-페닐보론산 (PB), 이미페넴-클록사실린 (CLX), 이미페넴-디피콜린산 (DPA), 이미페넴-EDTA, 메로페넴-아미노페닐보론산 (APB), 메로페넴-페닐보론산 (PB), 메로페넴-클록사실린 (CLX), 메로페넴-디피콜린산 (DPA) 또는 메로페넴-EDTA의 순차적인 2배 희석액 액체배지를 이용하여 시험균주의 최소생육저해농도를 평가하되, 아미노페닐보론산 (APB), 페닐보론산 (PB), 클록사실린 (CLX), 디피콜린산 (DPA) 및 EDTA를 포함하는 β -락타메이즈 저해제를 가한 액체배지에서 최소생육저해농도와, 이미페넴 또는 메로페넴 단독 액체배지에서의 최소생육저해농도를 비교하여 최소생육저해농도의 감소비율을 결정하고, 감소비율이 3배 이상인 경우를 양성, 2배 이하인 경우를 음성으로 판정하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0006] 본 발명은 상기 방법에서, 이미페넴-페닐보론산 함유 액체배지 또는 메로페넴-페닐보론산 함유 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때 그 세균을 KPC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명은 상기 방법에서, 메로페넴-디피콜린산 액체배지 또는 이미페넴-EDTA 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈로- β -락타메이즈 (MBL) 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 상기 방법에서, 이미페넴-페닐보론산 액체배지 및 이미페넴-클록사실린 액체배지에 모두 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC- β -락타메이즈 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 상기 방법에서, 이미페넴-페닐보론산 액체배지에 양성 결과를 나타내고, 이미페넴-클록사실린 액체배지에 음성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 KPC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 상기 방법에서, (이미페넴 또는 메로페넴)-디피콜린산 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈로- β -락타메이즈 (MBL) 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 상기 방법에서, (이미페넴 또는 메로페넴)-EDTA 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 메탈

로- β -락타메이즈 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 상기 방법에서, (이미페넴 또는 메로페넴)-아미노페닐보론산 액체배지에 양성 또는 음성이고, (이미페넴 또는 메로페넴)-클록사실린 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 상기 방법에서, (이미페넴 또는 메로페넴)-페닐보론산 액체배지에 양성 또는 음성이고, (이미페넴 또는 메로페넴)-클록사실린 액체배지에 양성 결과를 나타낼 때, 그 세균을 AmpC 생산균주로 판정하는 것을 특징으로 하는, 액체배지 미량희석법으로 표현형 카바페네메이즈를 탐지하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 방법에 의하면, 카바페네메이즈 탐지 시험법에 있어서 임상 검체에서 분리된 그람음성간균에서 KPCs 및 MBLs를 탐지하기 위해 상업적으로 이용 가능한 반자동 시스템에 적용하여 손쉽게 높은 민감도와 특이도로 카바페네메이즈를 탐지할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재 범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0016]

1. 세균 균주

[0018] 다음과 같은 종으로부터 68개의 카바페넴-비감수성 임상분리주를 시험하였다: 클렙시엘라 뉴모니에 (*Klebsiella pneumoniae*) (n = 39), 엔테로박터 클로아세아 (*Enterobacter cloacae*) (n = 2), 세라시아 마르세센스 (*Serratia marcescens*) (n = 8), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) (n = 17) 및 아시네토박터 동유전자종 3 (*Acinetobacter genomospecies 3*) (n = 1). 분리주들은 Vitek 2 system (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO)을 이용하여 균종을 확인하였다. 이들 중, 52 개의 분리주들은 카바페네메이즈 생산주였다: KPC (n = 31), NDM-1 (n = 1), VIM (n = 16), IMP (n = 3) 및 SIM-1 (n = 1). 나머지 16 개의 분리주들은 DHA-1형 AmpC 생산과 포린 손실이 동반된 균주 (n = 8) 및 포린이 손실된 염색체성 AmpC 다량생산과 포린 손실이 동반된 균주 (n=8)였다 (표 1 내지 4). β -락타메이즈는 PCR과 서열결정으로 특성을 규명하였다 (Lee et al., Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91; Sole et al., Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4402-4; Yagi T. et al., J Clin Microbiol 2005;43:2551-8). 포린 손실 탐지는 선행 논문에 따라 수행하였다 (Song et al., Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65:447-9).

2.1. 카바페네메이즈 탐지를 위한 액체배지 미량희석 시험법

[0020] 카바페네메이즈 탐지 시험을 수행하였다. 이 시험법은 이미페넴 (imipenem) 또는 메로페넴 (meropenem)의 순차적인 2배 희석액 (농도 범위는 0.125 내지 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 포함하고, 고정 농도 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 APB, PB, CLX, DPA 또는 EDTA를 포함하거나 포함하지 않는 Mueller-Hinton 액체배지로 이루어졌다. 세균 현탁액은 각 웰에 CLSI 문서 M07-A8 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - eighth edition. M07-A8. Wayne, PA: CLSI; 2009)에 따라 접종시켰다. 플레이트는 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 18~24시간 배양하였다. 메로페넴 또는 이미페넴만 가했을 때와 비교하여 β -락타메이즈 저해제와 함께 메로페넴 또는 이미페넴을 처리했을 때의 최소생육저해농도가 3배 또는 그 이상 감소하면 양성으로 판단하였다. *E. Coli* ATCC 25922는 음성대조균으로 이용하였다.

3. 결과

[0022] 표현형 카바페네메이즈 탐지 시험법은 KPC 또는 MBL 저해제와 카바페넴 간의 시너지를 근거로 한다 (Birgy et

al., J Clin Microbiol 2012;50:1295-302; Pasteran et al., Clin Microbiol Infect 2011;17:1438-41; Stuart et al., Int J Antimicrob Agents 2010;36:205-10). 확산법을 이용한 더블 디스크 시너지 시험법, 조합 디스크 시험법 및 이미페넴/이미페넴-EDTA E시험법 등이 개발되어 있다 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)(Arakawa et al., J Clin Microbiol 2000;38:40-3; Lee et al., J Clin Microbiol 2003;41:4623-9). 액체배지 미량희석법은 반자동 항생제 감수성 시험 시스템의 도입으로 인해 임상 실험실에서 최소생육저해농도 (MIC) 결정에 가장 흔히 이용되고 있는 방법이다 (Yagi et al., J Clin Microbiol 2005;43:2551-8). 그렇지만, 임상 검체에서 카바페네메이즈 생산을 확인하기 위해 β -락타메이즈 저해제를 이용한 액체배지 미량희석법을 적용한 연구는 보고된 바가 없다.

[0023] KPC 생산균주, MBL 생산균주 및 카바페네메이즈 비생산균주에 대한 메로페넴 (또는 이미페넴) 최소생육저해농도 범위는 각각 2~256 $\mu\text{g/ml}$ (또는 4~256 $\mu\text{g/ml}$), 4~256 $\mu\text{g/ml}$ (또는 8~256 $\mu\text{g/ml}$) 및 0.5~32 $\mu\text{g/ml}$ (또는 1~64 $\mu\text{g/ml}$)였다. 모든 KPC 생산자들은 메로페넴-PB 및 이미페넴-PB에 양성 결과를 나타내었다. 이 균주들 중 단 두 개의 균주만이 이미페넴-CLX에 대해 양성 결과를 나타내었다. 모든 MBL 생산자들은 VIM-2를 생산하는 균주를 제외하고, 메로페넴-DPA 및 이미페넴-EDTA에 양성 결과를 나타내었다 (표 1~3). 모든 DHA-1 생산자들은 이미페넴-PB에 양성 결과를 나타냈고, 여섯 균주는 이미페넴-CLX에 양성 결과를 나타내었다 (표 4).

[0024] 조합 디스크 시험법은 KPCs 탐지에 있어서 페닐보론산 (PB)이 APB보다 KPC 저해제에 좀더 민감함을 나타낸다. 또한, 메로페넴과 페닐보론산을 이용한 디스크 시험법은 저해영역 크기에 있어서 가장 큰 차이를 나타내었다 (Tsakris et al., J Clin Microbiol 2011; 49:2804-9). DPA와 EDTA는 모두 MBL을 생산하는 클렙시엘라 뉴모니에 탐지에 탁월한 민감도를 나타내었으나; EDTA는 특이도가 낮았다 (Giske et al., Clin Microbiol Infect 2011;17: 552-6). 페닐보론산을 넣거나 또는 넣지 않고 이미페넴으로 본 발명의 액체배지 미량희석법을 이용하여 얻어진 결과는 KPC 효소를 가진 클렙시엘라 뉴모니에 탐지에서 음성 CLX 결과라는 부가적인 기준을 포함하면, 가장 필적할 만한 민감도 (94%) 및 특이도 (95%)를 나타내었다.

[0025] DPA와 EDTA는 모두 MBL 생산 그람음성간균 탐지에 탁월한 민감도 (DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 이미페넴 처리는 90% vs. 95%; DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 메로페넴 처리는 95% vs. 86%)와 특이도 (DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 이미페넴 처리는 98% vs. 100%; DPA vs. EDTA가 있거나 또는 없이 메로페넴 처리는 98% vs. 98%)를 보였다 (표 5).

[0026] 결론적으로, 본 발명은 페닐보론산, 클록사실린 및 EDTA를 가하거나 가하지 않고 실시한 이미페넴을 이용한 액체배지 미량희석 시험법이 KPC 및 MBL 효소 탐지에 가장 효과적인 결과를 제공함을 보여주었다. 본 발명의 액체배지 미량희석 시험법은 그람음성간균에서 KPCs와 MBLs를 탐지하는 데 유용하므로 같은 액체배지 미량희석법을 이용하는 상품화된 반자동 항생제감수성시험 장비에 적용하여 이용할 수 있다.

표 1

No.	Species	Carbapenemase	MIC (μg/mL)		Decreased time in the MIC (μg/mL) compared with meropenem or imipenem alone									
			Meropenem	Imipenem	Meropenem plus:					Imipenem plus:				
					APB	PB	CLX	DPA	EDTA	APB	PB	CLX	DPA	EDTA
1	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	8	8	6	6	1	0	<0	3	4	0	0	<0
2	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	16	16	5	7	0	0	0	3	5	1	1	<0
3	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	8	8	4	7	1	1	0	2	4	1	1	0
4	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	8	4	7	7	3	1	0	2	3	0	0	0
5	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	2	4	5	5	1	2	1	3	5	2	2	0
6	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	64	128	1	4	0	0	<0	3	5	1	1	1
7	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	32	32	6	8	2	1	1	4	4	1	0	0
8	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	16	16	5	7	2	0	0	2	5	1	2	1
9	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	2	4	5	5	4	1	0	3	5	3	1	0
10	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	16	16	3	6	0	0	0	2	3	1	1	0
11	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	256	256	1	4	0	0	0	0	3	0	0	0
12	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	32	8	8	9	4	1	1	3	5	1	1	0
13	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	16	8	7	8	2	0	1	3	4	1	1	0
14	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	2	0	0	3	4	2	1	0
15	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	16	8	6	6	2	0	1	3	4	0	0	0
16	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	2	0	0	3	5	0	0	0
17	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	16	7	6	2	0	<0	3	4	1	1	1
18	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	6	2	<0	<0	5	5	1	1	0

APB = aminophenylboronic acid; PB = phenylboronic acid; CLX = cloxacillin; DPA = dipicolinic acid.

표 2

No.	Species	Carbapenemase	MIC (µg/mL)		Decreased time in the MIC (µg/mL) compared with meropenem or imipenem alone											
			Meropenem	Imipenem	Meropenem plus:								Imipenem plus:			
					APB	PB	CLX	DPA	EDTA	APB	PB	CLX	DPA	EDTA	APB	PB
19	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	3	2	0	2	3	1	1	0		
20	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	3	1	0	3	5	1	1	0		
21	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	16	16	7	8	2	0	0	3	5	1	1	1		
22	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	4	8	5	6	2	0	0	3	5	2	1	0		
23	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	2	0	0	2	5	1	0	0		
24	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	2	0	0	3	4	1	1	0		
25	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	4	8	4	6	1	0	<0	3	4	1	1	0		
26	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	5	7	1	0	0	2	4	2	1	1		
27	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	3	0	0	2	3	1	0	0		
28	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	2	8	5	5	2	0	<0	4	4	4	1	1		
29	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	8	6	7	3	1	1	3	3	2	1	1		
30	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	8	16	4	5	0	<0	<0	3	3	1	1	0		
31	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	2	4	5	5	4	1	0	2	3	2	1	0		
32	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	64	128	<0	<0	<0	6	6	0	1	1	8	8		
33	<i>E. cloacae</i>	VIM-2	16	64	1	4	0	4	2	1	4	1	4	4		
34	<i>E. cloacae</i>	VIM-2	4	8	1	2	1	2	2	1	2	1	3	3		

APB = aminophenylboronic acid; PB = phenylboronic acid; CLX = cloxacillin; DPA = dipicolinic acid.

표 3

No.	Species	Carbapenemase	MIC (µg/mL)		Decreased time in the MIC (µg/mL) compared with meropenem or imipenem alone											
			Meropenem	Imipenem	Meropenem plus:						Imipenem plus:					
					APB	PB	CLX	DPA	EDTA	APB	PB	CLX	DPA	EDTA		
35	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-1	64	128	1	1	0	7	9	0	1	0	8	9		
36	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	64	128	1	1	0	5	4	0	<0	0	5	4		
37	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	64	256	1	0	0	4	3	1	0	0	5	5		
38	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	64	128	1	0	0	4	4	0	<0	0	5	4		
39	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	16	32	1	1	0	4	4	1	1	0	5	5		
40	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	128	256	1	1	0	5	6	0	0	0	6	6		
41	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	64	128	1	1	0	4	4	1	0	0	5	5		
42	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	128	256	0	0	0	5	1	0	0	0	3	1		
43	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	8	16	2	2	1	5	4	1	1	1	4	5		
44	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	16	16	1	2	0	5	5	1	1	0	4	5		
45	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	4	8	1	1	0	4	3	1	0	0	4	5		
46	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	16	64	0	0	0	3	3	0	0	0	5	5		
47	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	32	32	1	0	0	5	5	1	0	2	5	6		
48	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-3	4	8	1	0	0	5	5	1	0	0	4	4		
49	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-6	256	8	0	0	0	4	3	0	0	0	2	3		
50	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-6	256	16	0	0	0	6	5	1	1	1	2	4		
51	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-26	64	16	0	0	0	7	6	2	2	1	5	5		
52	<i>A. genomospecies 3</i>	SIM-1	16	16	0	2	0	6	6	1	2	1	7	6		

APB = aminophenylboronic acid; PB = phenylboronic acid; CLX = cloxacillin; DPA = dipicolinic acid.

표 4

No.	Species	AmpC	MIC (μg/mL)		Decreased time in the MIC (μg/mL) compared with meropenem or imipenem alone											
			Meropenem	Imipenem	Meropenem plus:					Imipenem plus:						
					APB	PB	CLX	DPA	EDTA	APB	PB	CLX	DPA	EDTA		
1	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	8	32	3	3	3	1	0	2	4	3	<0	0		
2	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	16	32	6	6	1	2	2	6	7	1	3	2		
3	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	32	64	3	4	4	1	1	3	4	3	1	1		
4	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	4	16	1	1	1	0	0	3	4	3	0	0		
5	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	4	16	0	1	0	1	0	2	4	2	0	0		
6	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	8	16	4	4	4	2	1	5	6	4	0	0		
7	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	16	32	5	5	5	3	3	5	5	5	1	1		
8	<i>K. pneumoniae</i>	DHA-1	4	32	1	1	0	0	0	2	3	3	1	1		
9	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	0.5	1	2	1	2	2	2	1	1	2	0	1		
10	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	8	4	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2		
11	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	8	8	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1		
12	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	0.5	2	1	1	1	2	0	0	1	1	2	1		
13	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	4	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0		
14	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	8	1	2	3	2	3	0	1	2	1	1	<0		
15	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	8	2	1	2	1	3	0	0	0	0	2	<0		
16	<i>S. marcescens</i>	Hyper-AmpC	8	4	1	1	1	2	1	<0	0	0	0	<0		

APB = aminophenylboronic acid; PB = phenylboronic acid; CLX = cefoxitin; DPA = dipicolinic acid; Hyper-AmpC = chromosomal AmpC hyperproduction.

표 5

Tests	Resistant mechanism	Sensitivity (%)		Specificity (%)	
		Meropenem	Imipenem	Meropenem	Imipenem
APB-positive plus CLX-negative	KPC	68	61	97	97
PB-positive plus CLX-negative	KPC	77	94	95	95
DPA-positive	Metallo-β-lactamase	95	90	98	98
EDTA-positive	Metallo-β-lactamase	86	95	98	100
APB-negative or APB-positive plus CLX-positive	AmpC with porin loss	94	94	85	96
PB-negative or PB-positive plus CLX-positive	AmpC with porin loss	88	88	85	96

APB = aminophenylboronic acid; PB = phenylboronic acid; CLX = cloxacillin; DPA = dipicolinic acid.