

하수기반 항생제내성균 조사

- 부산지역 하수처리장의 항생제 내성균 모니터링으로 항생제 내성균에 의한 감염병의 선제적인 발생 감시 및 기존 임상검체 기반 감시체계 보완에 기여함

1. 조사개요

- 근거 : 질병관리청 위기대응연구담당관-333(2022.5.19.), -26(2024. 1. 5.)호 및 질병관리청 고위험병원체분석과-517(2024. 8. 29.)호
- 조사배경 : 카바페넴내성장내세균목(Carbapenem-resistant Enterobacterales, CRE)이 2010년 법정감염병으로 지정된 이후 꾸준히 환자발생 증가추세에 있으므로 생활 하수를 이용하여 부산지역에 영향을 미치는 CRE균종에 대한 감시 필요
- 조사기간 : 2024년 1월 ~ 12월
- 조사대상 : 강변·수영·남부·동부·해운대 및 중앙하수처리장의 1차 침전지 유출수(표 1).
- 조사항목 : 카바페넴내성장내세균목(CRE)

2. 조사방법

- 실험법 : 질병관리청 『하수기반 카바페넴분해효소 유전자 및 카바페넴 분해효소 생산 장내세균목종 검출검사 표준절차서』 참고
- 하수처리장 1차 침전지 유출수에서 주 1회 핵산을 추출하여 카바페넴 분해효소 2종[*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)와 New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)]의 유전자 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* 에 대한 Real-time PCR 신속 검사
- 하수처리장 1차 침전지 유출수에서 월 1회 장내세균을 분리 동정한 후 카바페넴 분해효소 6종[KPC, NDM 및 Guiana extended-spectrum (GES), imipenemase (IMP), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM), oxacillinase(OXA)]에 대한 conventional PCR과 염기서열분석을 통한 유전자 검사 및 액체배지미량희석법을 이용한 항생제 감수성검사 진행

표 1. 하수처리장별 검체 수 및 검사 건수

하수처리장 월	강변			수영			남부			
	건수	검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수	검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수	검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수
1	5	5	5	1/1	5	5	1/0	5	5	1/0
2	4	4	4	1/2	4	4	1/0	4	4	1/3
3	4	4	4	1/5	4	4	1/3	4	4	1/0
4	5	5	5	1/6	5	5	1/1	5	5	1/0
5	4	4	4	1/2	4	4	1/3	4	4	1/2
6	4	4	4	1/1	4	4	1/4	4	4	1/1
7	5	5	5	1/3	5	5	1/4	5	5	1/1

8	4	4	1/0	4	4	1/2	4	4	1/3
9	5	5	1/1	5	5	1/1	5	5	1/1
10	4	4	1/1	4	4	1/4	4	4	1/2
11	4	4	1/1	4	4	1/1	4	4	1/3
12	5	5	1/1	5	5	1/2	5	5	1/1
총 계	53	53	12/24	53	53	12/25	53	53	12/17
하수 처리장 월	동부			해운대			중앙		
	건수 검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수	건수 검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수	건수 검체 수	유전자 검출검사 건수	배양검사 건수/ 분리균주 수
1	5	5	1/1	5	5	1/5	5	5	1/2
2	4	4	1/1	4	4	1/5	4	4	1/0
3	4	4	1/0	4	4	1/1	4	4	1/3
4	5	5	1/0	5	5	1/0	5	5	1/0
5	4	4	1/2	4	4	1/1	4	4	1/1
6	4	4	1/1	4	4	1/3	4	4	1/1
7	5	5	1/1	5	5	1/2	5	5	1/1
8	4	4	1/0	4	4	1/0	4	4	1/0
9	5	5	1/1	5	5	1/1	5	5	1/3
10	4	4	1/1	4	4	1/1	4	4	1/0
11	4	4	1/3	4	4	1/1	4	4	1/1
12	5	5	1/2	5	5	1/1	5	5	1/1
총 계	53	53	12/13	53	53	12/21	53	53	12/13

* 유전자 검출검사 건수: 총 318건(53건*6지점)/ 배양검사 건수: 총 72건(12건*6지점)/ 분리균주 수: 총 113건(6지점)

3. 조사결과

○ 유전자 검출검사: 하수 내 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* 유전자 검출률 비교

하수 내 카바페뎀 내성효소 유전자의 정량적 분석을 위해 주 1회 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*을 타겟으로 하는 Real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, 총 318건의 하수 검체에서 *bla_{KPC}*는 모두(100.0%) 검출되었고 *bla_{NDM}*은 281건(88.4%)에서 검출되었다. 하수처리장별로 비교해보면 동부와 해운대 하수처리장에서 총 53건 검체 중 50건(94.3%)에서 *bla_{NDM}*이 검출되어 가장 높은 검출률을 나타내었다(표 2).

표 2. 하수처리장별 검사 건수 및 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* 검출 건수 (검출 기준*: 10≤Ct≤40)

하수처리장	강변	수영	남부	동부	해운대	중앙	총 계
검사 건수	53	53	53	53	53	53	318
검출 건수 (검출률)	<i>bla_{KPC}</i>	53 (100.0%)	53 (100.0%)	53 (100.0%)	53 (100.0%)	53 (100.0%)	318 (100.0%)
	<i>bla_{NDM}</i>	45 (84.9%)	43 (81.1%)	48 (90.6%)	50 (94.3%)	50 (94.3%)	45 (84.9%)

* 검출 기준: 하수기반 카바페뎀분해효소 유전자 및 카바페뎀 분해효소 생산 장내세균목종 검출검사 표준절차서(질병관리청)

○ 유전자 검출검사: 하수 처리장의 월별 *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* 유전자 Ct값 비교

하수 내 카바페뎀 분해효소 유전자의 월별 추이를 확인하기 위하여 각 하수처리장별로 월별 Ct(Cycle Threshold) 값의 평균을 비교해보았다. 유전자 검출검사를 위한 핵산 추출에 2월까지의 NX-48 Bacterial DNA kit (GENOLUTION, Korea)를 사용했고 3월부터 DNeasy PowerSoil Pro QIAcube Kit (QIAGEN, Germany)로 사용 시약을 변경하였으므로 Ct 값의 추이 분석에는 3월 이후의 데이터만 포함하였다.

그림 1을 참고하면, 모든 하수처리장에서 공통적으로 기온이 상승하는 5-8월에 Ct 값이 소폭 낮아지다가 동절기에 접어들며 Ct 값이 다시 상승하는 경향을 보였다. 또한, 모든 하수처리장에서 계절과 상관없이 bla_{KPC} , bla_{NDM} 과 비교하여 bla_{KPC} 가 대체로 낮은 Ct 값을 나타내는 것으로 보아 하수 중 bla_{KPC} 의 비중이 더 높은 것으로 파악된다.



그림 1 하수처리장 6개소의 월별 bla_{KPC} , bla_{NDM} Ct 값의 추이

○ 유전자 검출검사: 배양검사와 비교

유전자 검출검사와 배양검사의 연관성을 분석하기 위해 배양검사서에서 분리된 균주의 유전자 검출 결과(conventional PCR)와 월 1회 실시하는 배양검사와 동일한 주 수의 유전자 검출검사 결과(Real-time PCR)에서 전체 하수처리장 Ct 값의 평균을 비교해보았다(표 3). 배양검사서에서 bla_{NDM} 이 검출되지 않은 월(3, 5, 8 및 11월) 중, 3월의 경우 유전자 검출검사에서도 bla_{NDM} 이 검출되지 않는 공통점을 보였으나, 3월을 제외한 다른 월은 유전자 검출검사와 배양검사의 결과가 일치하지 않았다. 이는 생균만을 분리하는 배양검사와 달리 유전자 검출검사에서는 사균 및 하수 내 부유하는 유전자까지 검출된다는 차이에서 비롯된 것으로 사료된다.

표 3. 월 별 유전자 검출검사와 배양검사에서의 유전자 검출 여부 비교 (검출 기준: $10 \leq Ct \leq 40$)

검사결과 월	유전자 검출검사				배양검사	
	bla_{KPC}		bla_{NDM}		bla_{KPC}	bla_{NDM}
	Ct값 평균	검출 여부	Ct값 평균	검출 여부	검출 여부	검출 여부
1	30.1	○	34.7	○	○	○
2	34.7	○	35.4	○	○	○
3	33.9	○	41.0	X	○	X
4	32.3	○	35.3	○	○	○
5	29.0	○	30.7	○	○	X
6	25.3	○	27.7	○	○	○
7	30.0	○	28.3	○	○	○
8	26.1	○	30.3	○	○	X
9	26.3	○	30.7	○	○	○
10	28.3	○	31.4	○	○	○
11	26.7	○	30.8	○	○	X
12	25.8	○	30.9	○	○	○

○ 배양검사 : 분리 균종별 분석

총 72건의 하수 검체에서 113주의 카바페넴분해효소생성 장내세균목(Carbapenemase-Producing Enterobacterales, CPE)를 분리하였으며, 분리된 113주는 7개의 속(genus), 11개의 종(species)로 분류되었다. 7개 속 중에서 *Klebsiella* 46주(40.7%), *Enterobacter* 36주(31.9%)로 2개 속이 전체의 72.6%를 차지하였으며, 그 외 *Raoultella* 14주(12.4%), *Citrobacter* 7주(6.2%), *Escherichia* 6주(5.3%), *Kluyvera* 2주(1.8%), *Pantoea* 2주(1.8%) 분리되었다(그림 2).

균종별 분리율은 가장 분리율이 높았던 *Klebsiella* 속 중 *Klebsiella pneumoniae*가 40주로 전체의 35.4%를 차지하였고, 다음으로 *Enterobacter cloacae* complex 35주(31.0%), *Raoultella planticola* 12주(10.6%), *Citrobacter freundii* 7주(6.2%), *Escherichia coli* 6주(5.3%)의 순서로 분리되었다(표 4).

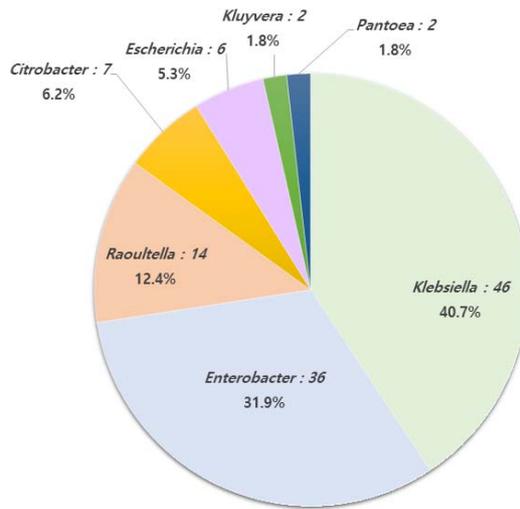


그림 2 부산지역 하수에서 분리한 장내세균 분포(n=113)

표 4. 분리 균의 속, 종별 분리율 (n=113)

균속	분리균주 수 (분리율)	균종	분리균주 수 (분리율)
<i>Klebsiella</i>	46 (40.7%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 (35.4%)
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	3 (2.7%)
		<i>Klebsiella aerogenes</i>	3 (2.7%)
<i>Enterobacter</i>	36 (31.9%)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	35 (31.0%)
		<i>Enterobacter asburiae</i>	1 (0.9%)
<i>Raoultella</i>	14 (12.4%)	<i>Raoultella planticola</i>	12 (10.6%)
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2 (1.8%)
<i>Citrobacter</i>	7 (6.2%)	<i>Citrobacter freundii</i>	7 (6.2%)
<i>Escherichia</i>	6 (5.3%)	<i>Escherichia coli</i>	6 (5.3%)
<i>Kluyvera</i>	2 (1.8%)	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	2 (1.8%)
<i>Pantoea</i>	2 (1.8%)	<i>Pantoea</i> spp.	2 (1.8%)

○ 배양검사: 유전자형별 분석

카바페넴 분해효소의 유전자형 확인은 카바페넴 분해효소 6종(KPC, GES, NDM, IMP, VIM, OXA)의 유전자(bla_{KPC} , bla_{GES} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{OXA})에 대해 conventional PCR을 수행, 해당 유전자의 염기서열을 분석하여 진행하였다.

6종의 유전자 중 5종(bla_{KPC} , bla_{GES} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{OXA})이 검출되었으며, 그 중 단일 내성 유전자는 bla_{KPC} 80건, bla_{NDM} 11건, bla_{GES} 11건 및 bla_{OXA} 와 bla_{VIM} 1건이었으며 내성유전자가 중복으로 검출된 경우는 bla_{GES} 와 bla_{KPC} 7건 및 bla_{NDM} 과 bla_{KPC} 2건이었다. 반면, bla_{IMP} 는 검출되지 않았다(그림 3).

주요 균 속 별로는 *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Raoultella* 및 *Citrobacter*에서는 다른 유전자와의 중복검출을 고려하여 bla_{KPC-2} 가 가장 많이 검출되었으며, *Escherichia*에서는 bla_{NDM-5} 가 가장 높은 빈도를 차지하였다(그림 4).

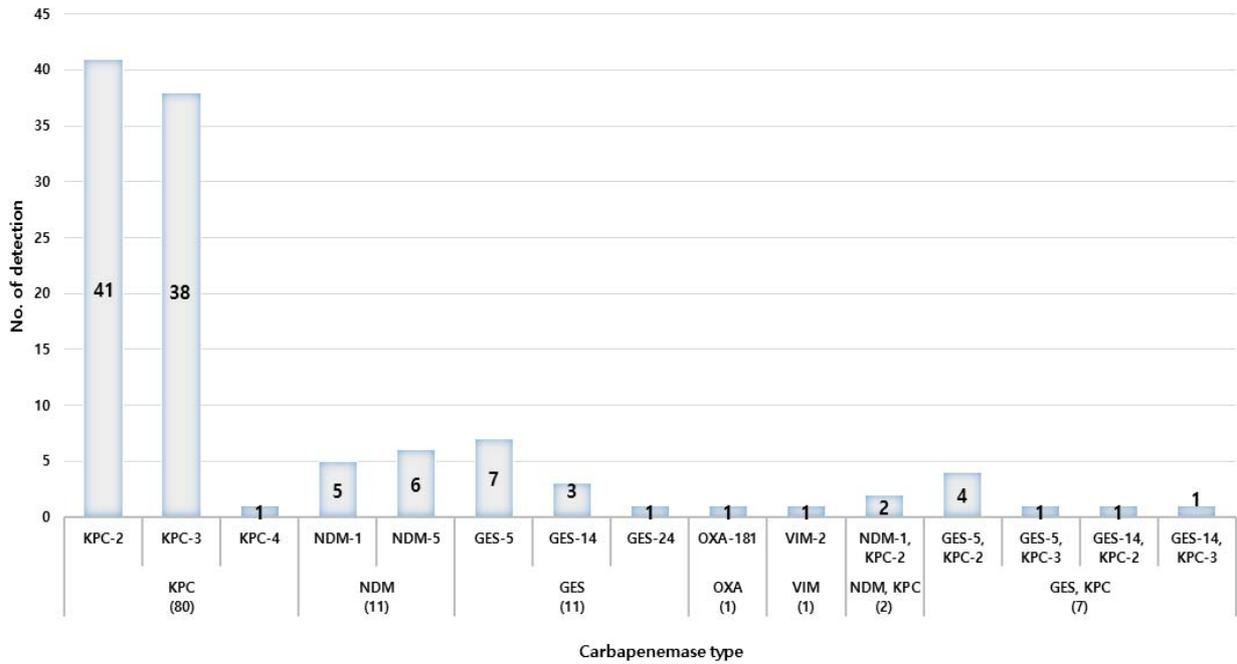


그림 3. 카바페넴 분해효소 유형별 검출 건수 (n=113)

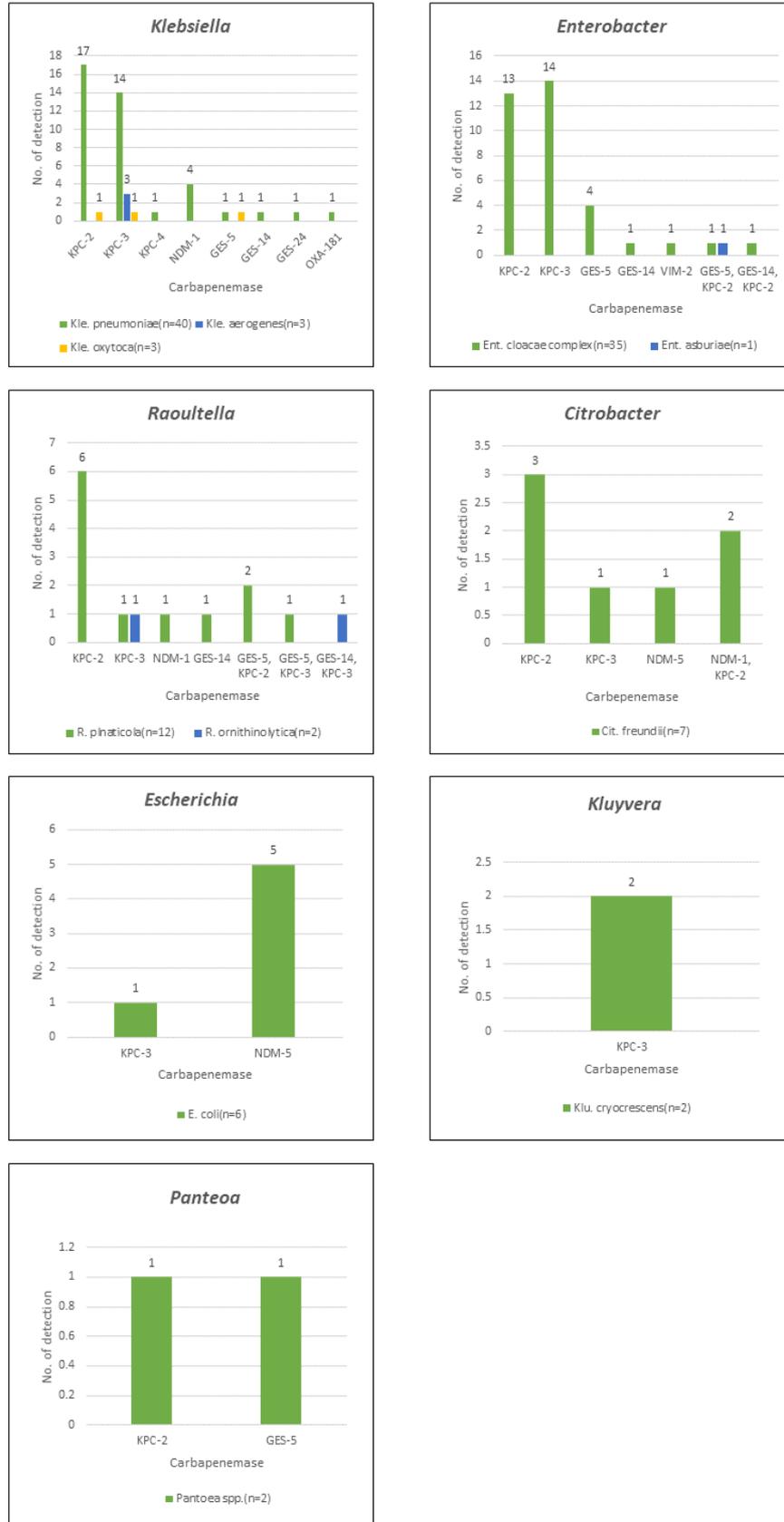


그림 4. 균속별 카바페넴 분해효소 분포

○ 배양검사: 항생제 감수성 분석

하수에서 분리한 CPE 113주를 대상으로 카바페넴계 항생제인 ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem 4종류에 대한 항생제 감수성 시험 결과 카바페넴 내성균(CRE) 97주(85.8%), 중등도 내성균(CIE) 11주(9.7%), 감수성균(CSE) 5주(4.4%)였으며, 카바페넴 내성균 97주의 균속별 분포는 *Klebsiella* 40주, *Enterobacter* 30주, *Raoultella* 11주, *Citrobacter* 6주, *Escherichia* 6주, *Kluyvera* 2주, *Pantoea* 2주 씩이었다. 균종별로는 CPE 11종 중 *Enterobacter asburiae* 1주를 제외한 10종에서 내성균을 1주이상 포함하고 있었으며, *Klebsiella pneumoniae*가 34주로 내성균이 가장 많았고, 다음으로는 *Enterobacter cloacae complex* 30주, *Raoultella planticola* 10주 순이었다(그림 5).

카바페넴 내성균 97주 중 56주는 4종류의 항생제에 모두 내성이었고 나머지 41주 중 19주는 ertapenem 1종류에만 내성이었으며, 그 외의 22주는 2 또는 3종류의 항생제에 내성을 나타내었다. 카바페넴계 항생제별 내성률은 ertapenem의 경우 내성균 97주 모두(100.0%) 내성이었고, imipenem은 73.2%, meropenem은 71.1%, doripenem은 66.0%였다. 최소억제농도 32 ug/mL 초과인 고도 내성은 ertapenem 11.3%, imipenem 4.1%, meropenem과 doripenem은 6.2%임을 확인하였다(표 5).

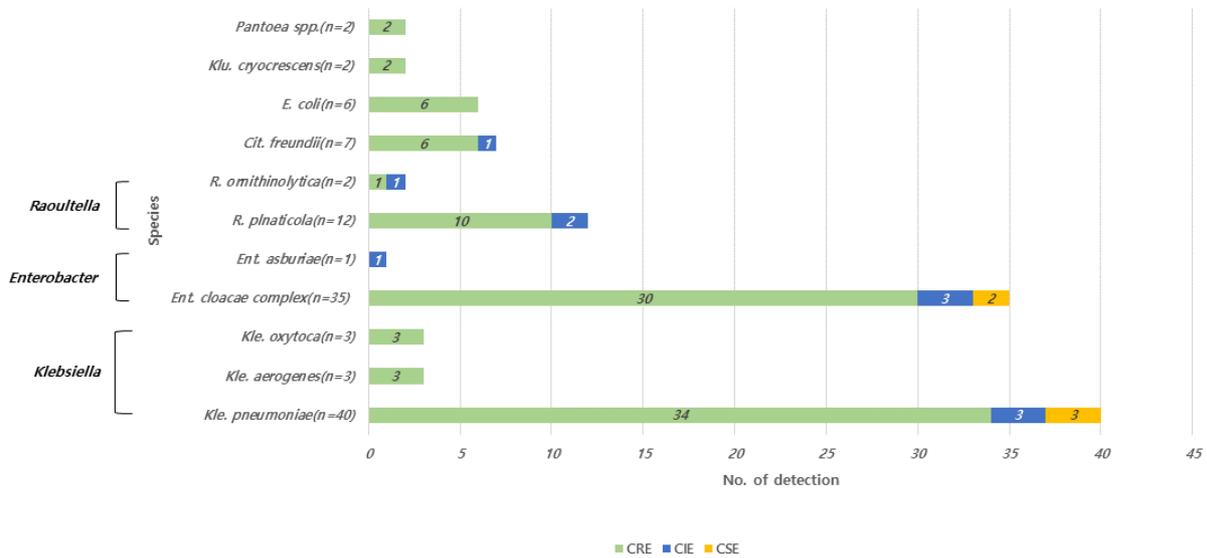


그림 5. 장내세균 균종별 카바페넴 항생제 감수성 결과

표 5. 하수에서 분리한 CRE의 카바페넴계 항생제별 최소억제농도 분포 및 내성률 (n=97)

Antimicrobial agents(ug/mL)	No. of isolates (%)									R*(%)
	≤0.5 (Ertapenem : ≤0.25)	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	
Ertapenem	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (11.3)	22 (22.7)	28 (28.9)	17 (17.5)	8 (8.2)	11 (11.3)	100
Imipenem	3 (3.1)	0 (0.0)	6 (6.2)	17 (17.5)	31 (32.0)	24 (24.7)	5 (5.2)	7 (7.2)	4 (4.1)	73.2
Meropenem	4 (4.1)	0 (0.0)	8 (8.2)	16 (16.5)	21 (21.6)	28 (28.9)	6 (6.2)	8 (8.2)	6 (6.2)	71.1
Doripenem	6 (6.2)	0 (0.0)	8 (8.2)	19 (19.6)	26 (26.8)	20 (20.6)	6 (6.2)	6 (6.2)	6 (6.2)	66.0

* R(Resistance) : 항생제 내성 비율

4. 활용방안 및 기대효과

- 하수를 기반으로 한 감염병 감시는 기존의 임상기반 감염병 감시체계의 한계점인 무증상자, 개인정보 유출 우려 및 비용 문제 등을 보완할 수 있는 신개념의 감시체계임.
- 하수에서 주로 검출되는 항생제 내성균의 특성을 파악하여 부산 관내의 CRE감염증 확산 방지에 기여할 수 있는 하수기반 항생제 내성균 감시의 기초자료를 제공하고자 함.