

Evaluation of Diagnostic Performance of RAPIDEC CARBA NP Test for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*

Wonkeun Song¹, Gilsung Yoo², Gyu Yul Hwang², Young Uh²

¹Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul,

²Department of Laboratory Medicine, Wonju Severance Christian Hospital,
Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background: Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* are resistant to most β -lactam antibiotics except carbapenems. In recent years, infrequently isolated *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemase pose a serious threat in the selection of appropriate therapeutic antibiotics. The rapid detection method of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) is necessary to prevent the spread of CPE into healthcare facilities.

Methods: One hundred clinical *Enterobacteriaceae* isolates (*Klebsiella pneumoniae* 40, *Escherichia coli* 40, others 20) showing susceptibility to carbapenems and positivity in the CLSI ESBL phenotypic test from November 2015 to March 2016 and 59 stocked *Enterobacteriaceae* isolates harboring resistance genes producing carbapenemase (*K. pneumoniae* 56, *Enterobacter cloacae* 2, *E. coli* 1; types of CPE: KPC 36, GES 12, NDM 6, VIM 2, OXA 2, IMP 1) were subjected to the RAPIDEC CARBA NP test (bioMérieux,

France) and CPE phenotypic test using the modified Hodge test (MHT) and carbapenemase inhibition test.

Results: All of the 100 *Enterobacteriaceae* isolates with carbapenem susceptibility and ESBL positivity were negative on the RAPIDEC CARBA NP test and CPE phenotypic test. Of 59 stock CPE isolates, 53 and 42 showed positive results to the RAPIDEC CARBA NP test and MHT, respectively. The sensitivity and specificity of the RAPIDEC CARBA NP test for detecting CPE were 89.8% and 100%, respectively.

Conclusion: The RAPIDEC CARBA NP test is simple and produces a result within 3 hr. In conclusion, the test is a useful screen for detecting CPE because it shows high sensitivity and specificity for CPE detection. (Ann Clin Microbiol 2016;19:59-64)

Key Words: Carbapenem, Carbapenemase, *Enterobacteriaceae*, Modified Hodge test

INTRODUCTION

*Escherichia coli*나 *Klebsiella pneumoniae* 등의 많은 장내세균들은 예전부터 병원 내 감염의 주요 원인균으로 자리잡았다[1]. 그 중에서도 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 생성 균주들은 대부분의 β -lactam 계열 항생제에 대해서 내성을 보이기 때문에 치료효과를 기대할 수 있는 약제로 carbapenem 계열 정도만이 남아있는 실정이다[2]. 그러나 이미 20-30년 전부터 AmpC β -lactamase의 overexpression이나 porin mutation 등을 통해 carbapenem에 내성을 보이는 균주들이 보고된 바 있고, 최근에는 carbapenemase를 생성하는 장내세균(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE)이 늘어나고 있어 환자 치료와 감염관리에 커다란 문제가 되고 있다[3].

CPE의 검출 방법으로는 modified Hodge test (MHT)나 carbapenemase inhibition test (CIT) 등의 표현형검사가 대표적이지만 시간이 오래 걸리고 판독이 어려우며, carbapenemase 종류를 정확히 감별할 수 없다는 단점이 있다[4]. PCR이나 DNA 염기서열결정 등을 이용한 분자유전학적 검사 방법은 carbapenemase 생성 유전자를 검출할 수 있으므로 예민도와 특이도가 높은 확진 검사이지만 숙련된 검사자와 고가의 장비가 필요하고 검사비용이 높기 때문에 모든 검사실에 적용하기에는 제약이 있다[5].

따라서 병의원을 비롯한 기타 요양기관들을 통해 CPE가 확산하는 것을 조기에 방지하기 위해서는 특별한 장비와 시설 없이도 쉽고 빠르게 CPE를 감별할 수 있는 검사 방법이 필요하다. Nordmann 등[6]이 개발한 Carba NP 검사법은 carbapenemase에 의해 carbapenem의 β -lactam 고리가 가수분해되는 특

Received 10 July, 2016, Revised 26 August, 2016, Accepted 27 August, 2016

Correspondence: Young Uh, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, 20 Ilisan-ro, Wonju 26426, Korea. (Tel) 82-33-741-1592, (Fax) 82-33-731-0506, (E-mail) u931018@yonsei.ac.kr

© 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.

성을 이용한 방법으로 이는 2016년 개정된 CLSI guideline에서도 CPE의 감염관리 목적이나 carbapenem에 내성 판정 방법 중의 하나로 권고하고 있다[7]. 최근 bioMérieux사에서 이 Carba NP 검사 원리를 이용한 RAPIDEC CARBA NP test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)가 개발되어 해당 키트의 유용성을 평가하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

2015년 11월부터 2016년 3월까지 원주세브란스기독병원 미생물검사실에 의뢰된 임상검체에서 분리한 carbapenem 감수성이면서 ESBL을 생성하는 장내세균 100주와 다기관 연구[8]로 유전자 검사를 통해 carbapenemase 생성이 확인되어 보관 중인 장내세균 59주(*K. pneumoniae* 56주, *Enterobacter cloacae* 2, *E. coli* 1; 내성유전형 종류: KPC 36주, GES 12, NDM 6, VIM 2, OXA 2, IMP 1)를 대상으로 RAPIDEC CARBA NP 검사(bioMérieux)와 modified Hodge test (MHT)와 carbapenemase inhibition test (CIT)를 이용한 CPE 표현형 검사를 시행한 후 결과를 비교하였다.

ESBL 생성 장내세균 100주의 동정과 항균제감수성검사는 CLSI guideline [7]에 따라 Microscan (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA)과 Gram Negative Combo Panel Type 63 (Beckman Coulter)을 이용하여 판독하였고 carbapenem 중간이나 내성인 균주는 E-test (bioMérieux)로 추가 검사를 시행한 후 E-test 결과를 최종 결과로 해석하였다.

RAPIDEC CARBA NP 검사는 제조사에서 지시하는 대로 시행하였으며, 간략히 서술하면 다음과 같다. Mueller-Hinton 우무평판배지(MHA)에서 하루 동안 배양한 균주를 kit와 함께

제공되는 plastic stick으로 10 μ L 정도 덜어낸 후 kit와 함께 제공되는 API suspension medium 100 μ L와 잘 섞었다. 균 현탁액을 control well과 reaction well에 각각 25 μ L씩 옮기고 phenol red 지시약 25 μ L와 섞은 후, 37°C에서 배양하여 30분과 120분 후에 결과를 판독하였다. 30분과 120분 후의 결과가 다를 때(equivocal)는 확실한 양성을 기준으로 결과를 분석하였다.

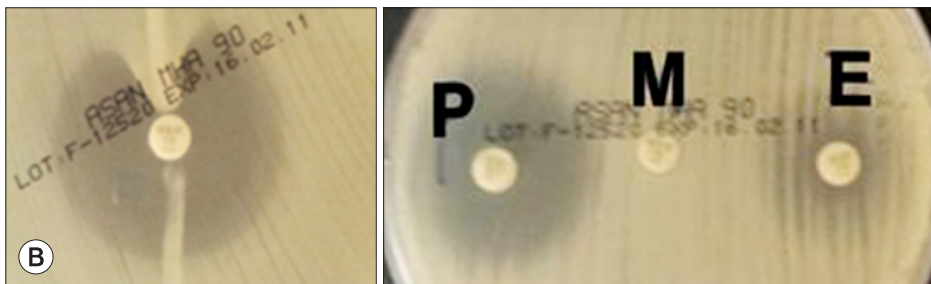
CPE 표현형 검사(MHT, CIT)는 Song 등[9]의 방법에 따라 시행한 후 서로 다른 두 명의 검사자가 맹검시험으로 판독하였다. CPE 표현형 검사인 MHT와 CIT의 검사 방법은 각각 다음과 같다. MHT는 CLSI 지침에 따라서 0.5 McFarland에 맞춘 *E. coli* ATCC 25922 균액을 broth나 saline으로 1 : 10 희석하여 MHA에 바르고 1-3분 동안 말린 다음, meropenem 디스크를 놓고, 백금이를 이용하여 검사하고자 하는 균집락 1-2개를 따서 디스크 끝부분에서 바깥쪽으로 긁는다. 35 \pm 2°C, 대기환경에서 16-20시간 배양 한 후 시험균주를 그은 부위에서 관찰되는 균 성장의 길이를 측정하여 2 mm 미만이면 음성, 2 mm-4 mm 미만이면 약양성, 4 mm 이상이면 양성으로 판독하였다.

CIT는 검사 대상 균주 집락을 0.5 McFarland에 맞춘 균액을 면봉에 적서 MHA에 바른 후 meropenem 디스크 3개를 적절한 간격으로 놓는다. 3개의 meropenem 디스크 중 한 개에는 30 mg/mL phenylboronic acid (PBA) 시약을, 다른 한 개에는 30 mg/mL EDTA 시약을 각각 10 μ L씩 점적한 뒤, 35 \pm 2°C, 대기 환경에서 16-20시간 배양한 후 각 디스크의 억제대를 측정한다. PBA나 EDTA가 추가된 디스크의 억제대 지름에서 억제제를 추가하지 않은 디스크의 억제대 지름을 뺀 값이 3 mm 이하이면 음성, 4 mm이면 약양성, 5 mm 이상이면 양성으로 판독하였다.

Fig. 1은 KPC-producing *K. pneumoniae*의 RAPIDEC CARBA NP 검사와 CPE 표현형 검사 결과이다.



▲ Positive finding in Rapidec RAPIDEC CARBA NP



▲ Positive findings in MHT & CIT

Fig. 1. Phenotype results of KPC-producing *K. pneumoniae*. (A) Positive finding in RAPIDEC CARBA NP, (B) Positive finding in MHT and CIT. Abbreviations: P, phenylboronic acid disk; M, meropenem disk; E, EDTA disk.

RESULTS

Carbapenem 감수성이면서 ESBL을 생성하는 장내세균 100균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사, MHT와 CIT에서 모두 음성이었다. CPE 59주는 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 30분과 120분 판독에서 각각 51균주(86.4%)와 53균주(89.8%)가 양성이었다고 표현형 검사에서는 45균주(76.2%)가 양성이었다. RAPIDEC CARBA NP 검사에서 음성인 6균주의 CPE 유전형은 GES-5 5주

(41.7%)와 IMP-1 1주였다. GES-5 12균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사 30분 판독 시에 2주가 약양성으로서 120분 판독 시에는 1주는 음성이었고 다른 1주는 약양성을 유지하였으며, 30분 판독 시에 음성이었던 2주는 120분 판독 시에 양성이었다. OXA-181 1균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사 30분에는 약양성이었으나 120분에는 양성이었다(Table 1).

CPE 59균주는 MHT에서 7주, CIT PBA 검사에서는 2주가 양성과 약양성의 구분이 어려웠다(Table 2).

Table 1. Results of RAPIDEC CARBA NP test result according to reading time

Type of CPE (No. of tested isolates)	Results by reading time						
	30 min		120 min		Final		
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Equivocal	Positive
Non-CPE (100)	100	0	100	0	100	0	0
CPE (59)							
KPC-2 (15)	0	15	0	15	0	0	15
KPC-3 (21)	0	21	0	21	0	0	21
GES-5 (12)	7	5 (2)	5	7 (2)	5	2*	7
NDM-1 (6)	0	6	0	6	0	0	6
VIM-2 (2)	0	2	0	2	0	0	2
OXA-48 (1)	0	1	0	1	0	0	1
OXA-181 (1)	0	1 (1)	0	1	0	0	1
IMP-1 (1)	1	0	1	0	1	0	1
Total	8	51	6	53	6	2	53

No. in parenthesis means that isolate show weakly positive result.

*One isolate changed from weakly positive (30 min) to negative (120 min), one isolate changed from negative to weakly positive.

Abbreviation: CPE, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.

Table 2. Comparison of RAPIDEC CARBA NP test with CPE phenotypic test

Type of CPE (No. of tested isolates)	RAPIDEC CARBA NP test		CPE phenotypic test					
			MHT		CIT			
					PBA		EDTA	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Non-CPE (100)	100	0	100	0	100	0	100	0
CPE (59)								
KPC-2 (15)	0	15	0	15 (1)	0	15	13	2
KPC-3 (21)	0	21	1	20 (3)	0	21	21	0
GES-5 (12)	5	7 (2)	11	1	7	5 (2)	11	1
NDM-1 (6)	0	6	4	2 (2)	6	0	0	6
VIM-2 (2)	0	2	0	2	1	1	0	2
OXA-48 (1)	0	1	0	1	1	0	1	0
OXA-181 (1)	0	1	0	1 (1)	1	0	1	0
IMP-1 (1)	1	0	1	0	0	1	1	0
Total	6	53 (2)	17	42 (7)	16	43 (2)	48	11

No. in parenthesis means that isolate shows weakly positive results.

Abbreviations: CPE, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*; MHT, modified Hodge test; CIT, carbapenemase inhibition test; PBA, phenylboronic acid.

DISCUSSION

CPE의 빠른 진단이 중요한 이유는 적절한 항생제의 선택이 어렵다는 점 이외에도 다른 균종으로 전파될 수 있는 가능성이 존재하기 때문이다[10]. 기존 CPE 진단에 활용되던 MHT나 CIT 등의 표현형 검사는 해석의 주관성뿐 아니라 porin mutation을 동반한 ESBL 생성 균주 등에서 위양성이 나타날 수 있기 때문에 보다 특이적인 검사법이 요구된다[11].

기존에 널리 사용되던 MHT와 CIT를 이용한 표현형검사와 RAPIDEC CARBA NP 검사간 비교에서 특이도는 두 검사 모두 100%로 차이가 없었으나 예민도는 각각 76.2%와 89.8%로 RAPIDEC CARBA NP 검사가 더 우수한 검사방법으로 생각되었다. 이전 연구들[4,5,12,13]에서 보고된 RAPIDEC CARBA NP 검사의 예민도와 특이도는 각각 92.0-99.0%와 96.0-100.0% 수준이었었는데 이번 연구에서 RAPIDEC CARBA NP 검사의 특이도는 100%로 이전 결과들과 비슷하였으나, 예민도는 89.8%로 다소 낮았다. 이러한 차이를 유발한 주요 원인은 CPE 유전형에 따른 차이이다.

본 연구에서의 RAPIDEC CARBA NP 검사의 GES-5의 양성 검출률은 58.3% (7/12)로 KPC와 NDM-1의 100%에 비해 낮았다. 또한 GES 유전형 균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 판독 시간에 따라 결과에 차이가 있는 경우가 많아 판독에도 주의가 필요하였다. Poirel 및 Nordmann [5]은 RAPIDEC CARBA NP 검사의 예민도를 96%로 보고하였는데 이 중 GES 유전자를 갖고 있는 2균주의 carbapenemase 양성인 *Pseudomonas aeruginosa*에서 1균주는 음성으로서 원법 Carba NP 검사에서 30분 판독 시에는 양성이었으나 120분 판독에서는 음성이었다. Kabir 등[13]은 3균주의 GES-5 양성인 *E. cloacae*는 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 모두 양성임을 보고하였다. 이번 연구에서 GES-5의 RAPIDEC CARBA NP 검사 양성률이 낮은 이유는 정확히 알 수는 없었으나 GES-5는 다른 class A carbapenemase에 비해 효소 활성이 낮은 것이 하나의 원인으로 생각되었다[13].

OXA-181인 1균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사 30분에는 약양성이었으나 120분에는 양성이었었는데 Poirel 및 Nordmann [5]은 2 균주의 OXA-181인 장내세균에서 모두 양성임을 보고하였다. Class D carbapenemase에 속하는 OXA-type CPE 균주는 이미 알려진 것처럼 carbapenemase 효소의 활성이 낮으며 [4,12] 이로 인해 균주별로 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 위음성이거나 약양성 결과를 초래할 수 있을 것이다. Studentova 등[14]에 의하면 pH의 변화로 OXA-type carbapenemase의 활성도를 향상시킬 수 있으므로 이를 활용한 연구가 이뤄진다면 OXA-type CPE에 대한 낮은 예민도를 개선할 수도 있을 것이라 생각된다.

RAPIDEC CARBA NP 검사의 carbapenemase 검출 예민도

는 대상 균주의 유전형에 따라 차이가 있기 때문에 의료기관에서 분리되는 균종들의 유전형의 분포와 내성 세균의 유행에 따라 달라질 수밖에 없다. 최근 질병관리본부에서 발표한 2014년 국내 CPE 발생 현황[15]에 따르면 유전형별로 OXA-232, KPC, NDM-1, VIM 등의 순으로 자주 발생하는 것으로 나타났는데 OXA-232를 제외한 나머지 유전형들은 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 높은 예민도를 보이므로 현재 상황에서 해당검사가 국내 여러 검사실에 보편적으로 적용될 수 있음을 예측해 볼 수 있다. 그러나 향후 다양한 국내 병원을 대상으로 지속적으로 CPE 균주들에 대한 분자생물학적 방법을 포함한 역학적 연구를 시행하여 새로운 유전형의 발견이나 유행을 인지하고 이와 동반하여 RAPIDEC CARBA NP 검사의 검출력을 평가하는 다기관 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구는 처음으로 국내에서 분리된 CPE들을 대상으로 한 RAPIDEC CARBA NP 검사의 유용성을 평가하였고 결론적으로 RAPIDEC CARBA NP 검사는 간단하고 판독이 직관적이며, 검사 후 3시간 이내의 빠른 시간 내에 결과를 확인할 수 있는 검사로서 CPE 진단에 있어 높은 예민도와 특이도를 가진 우수한 검사방법으로 생각된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구에서 사용한 RAPIDEC CARBA NP test 키트 시약은 bioMérieux Korea에서 제공하였음.

REFERENCES

- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:996-1011.
- Jacoby GA and Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-91.
- Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011;53:60-7.
- Garg A, Garg J, Upadhyay GC, Agarwal A, Bhattacharjee A. Evaluation of the rapidec carba NP test kit for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7870-2.
- Poirel L and Nordmann P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 2015;53:3003-8.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1503-7.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- Jeong S, Kim JO, Jeong SH, Bae IK, Song W. Evaluation of

- peptide nucleic acid-mediated multiplex real-time PCR kits for rapid detection of carbapenemase genes in gram-negative clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2015;113:4-9.
9. Song W, Hong SG, Yong D, Jeong SH, Kim HS, Kim HS, et al. Combined use of the modified Hodge test and carbapenemase inhibition test for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. *Ann Lab Med* 2015;35:212-9.
 10. Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010;48:1019-25.
 11. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012;50:477-9.
 12. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC[®] CARBA NP, the Rapid CARB Screen[®] and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:3014-22.
 13. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC[®] CARBA NP for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1213-6.
 14. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, Pfeifer Y, Chudackova E, Bergerova T, et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiol (Praha)* 2015;60:119-29.
 15. Park JW, Lee EJ, Lee DH. Status of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Korea, 2014. *Public Health Weekly Report* 2016;9:9-13.

=국문초록=

RAPIDEC CARBA NP 검사의 Carbapenemase 생성 장내세균의 진단 수행능력 평가

¹한림대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²연세대학교 원주의과대학 원주세브란스기독병원 진단검사의학교실

송원근¹, 유길성², 황규열², 어 영²

배경: Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)를 생성하는 장내세균은 carbapenem에만 감수성이고 나머지 β -lactam 계열 약물에는 대부분 내성이다. 최근에는 carbapenemase를 생성하는 장내세균(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, CPE)이 분리되고 있어 치료 항균제 선택에 심각한 문제가 되고 있다. CPE 균종들의 병원 내 확산을 방지하기 위해서는 CPE 균종의 신속한 검출 방법이 필요하다. 이에 본 연구에서는 RAPIDEC CARBA NP 검사(bioMérieux, France)의 carbapenemase 생성 장내세균의 진단 수행능력을 평가하였다.

방법: 2015년 11월부터 2016년 3월까지 임상 검체에서 분리된 carbapenem 감수성이면서 ESBL을 생성하는 장내세균 100주(*Klebsiella pneumoniae* 40주, *Escherichia coli* 40주, 기타 20주)와 다기관 연구로 carbapenemase 생성을 유전자 검사로 확인하여 보관한 장내세균 59주(*K. pneumoniae* 56주, *Enterobacter cloacae* 2, *E. coli* 1; 내성유전형 종류: KPC 36주, GES 12, NDM 6, VIM 2, OXA 2, IMP 1)를 대상으로 RAPIDEC CARBA NP 검사와 modified Hodge test (MHT) 및 carbapenemase inhibition test (CIT)를 이용한 CPE 표현형 검사를 시행하였다.

결과: Carbapenem 감수성이면서 ESBL 생성하는 장내세균 100주는 RAPIDEC CARBA NP 검사와 CPE 표현형 검사에서 모두 음성이었다. 59주의 CPE 균주는 RAPIDEC CARBA NP 검사에서 53균주가 양성되었고, MHT에서는 42균주가 양성이었다. RAPIDEC CARBA NP 검사의 CPE 검출 예민도와 특이도는 89.8%와 100%였다.

결론: RAPIDEC CARBA NP 검사는 방법이 간단하고 판독이 쉬우며, 3시간 내에 결과를 확인할 수 있는 검사로서 CPE 검출 예민도와 특이도가 매우 높기 때문에 임상검사실에서 사용하기에 매우 유용한 검사로 판단되었다. [Ann Clin Microbiol 2016;19:59-64]

교신저자 : 어 영, 26426, 강원도 원주시 일산로 20
연세대학교 원주의과대학 진단검사의학교실
Tel: 033-741-1592, Fax: 033-731-0506
E-mail: u931018@yonsei.ac.kr