

**ORIGINAL ARTICLE**

Molecular Detection of Virulence Factors in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Tertiary Hospital in Daejeon

Hye Hyun Cho

Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon Institute of Science and Technology, Daejeon, Korea

대전지역의 3차 병원에서 분리된 Carbapenem 내성 *Pseudomonas aeruginosa*의 병독성 인자 검출

조혜현

대전과학기술대학교 임상병리과

ARTICLE INFOReceived August 15, 2019
Revised 1st August 23, 2019
Revised 2nd August 27, 2019
Accepted August 27, 2019**Key words***ExoU* gene
Multidrug-resistant
Virulence factor**ABSTRACT**

The emergence and spread of multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* is a critical problem worldwide. The pathogenesis of *P. aeruginosa* is due partly to the production of several cell-associated and extracellular virulence factors. This study examined the distribution of virulence factors and antimicrobial resistance patterns of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolated from a tertiary hospital in Daejeon, Korea. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the disk diffusion method, and PCR and DNA sequencing were performed to determine the presence of virulence genes. In addition, the sequence type (ST) of MDR *P. aeruginosa* was investigated by multilocus sequence typing (MLST). Among 32 CRPA isolates, 14 (43.8%) were MDR and the major ST was ST235 (10 isolates, 71.4%). All isolates were positive for the presence of virulence genes and the most prevalent virulence genes were *toxA*, *plcN*, and *phzM* (100%). All isolates carried at least eight or more different virulence genes and nine (28.1%) isolates had 15 virulence genes. The presence of the *exoU* gene was detected in 71.4% of the MDR *P. aeruginosa* isolates. These results indicate that the presence of the *exoU* gene can be a predictive marker for the persistence of MDR *P. aeruginosa* isolates.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

*Pseudomonas aeruginosa*는 만성 감염과 심각한 급성 감염을 일으키는 광범위한 기회감염균이다. 또한 *P. aeruginosa*는 폐렴, 창상감염, 심각한 화상, 욕창, 면역력이 저하된 환자의 다양한 전신감염을 일으키는 원내감염균의 10~15%를 차지하고

있다. 최근 원내감염에 의한 사망율이 18~61%로 보고되고 있으며, 특히 다제내성 *P. aeruginosa*에 의한 원내감염은 전 세계적으로 증가하고 있는 실정이다[1-3].

최근 *P. aeruginosa*에 의한 발병기전 중 하나로, 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 생성은 광범위 조직 손상, 혈류 침입 및 확산을 일으키는 것으로 보고되고 있다[4, 5]. 세포관련 병독성 인자로는 flagella, lipopolysaccharide, pili (*piA*, *piB*), type III system effector proteins, type III secretion system (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*)과 alginate가 있으며, 세포외 병독성 인자로는 exotoxin A (*toxA*), phospholipases (*plcH*, *plcN*),

* Corresponding author: Hye Hyun Cho

Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon Institute of Science and Technology, 100 Hyecheon-ro, Seo-gu, Daejeon 35408, Korea
E-mail: airplane1102@hanmail.net* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0471-4938>

phenazine (*phzI*, *phzII*, *phzH*, *phzM*, *phzS*), elastase (*lasA*), zinc metalloprotease (*lasB*), alkaline protease (*aprA*), pyoverdine (*pvdA*)이 있다[6-9]. 이러한 세포 관련 및 세포외 병독성 인자에 의한 침입성 *P. aeruginosa* 감염은 carbapenem 과 같은 항균제의 사용에도 불구하고 높은 사망률을 나타내고 있다. 최근 carbapenem에 대한 높은 내성이 발달함에 따라 다제내성 *P. aeruginosa*의 출현은 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있으며 일본, 대만, 인도, 이란 등 아시아 지역 국가에서 항균제의 선택과 사용의 제한으로 인해 치료에 많은 어려움이 보고되고 있다[10-13]. 특히, 우리나라의 경우 carbapenem에 대한 내성이 지속적으로 증가하고 있으며, 대부분의 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*가 다제내성으로 보고되어 큰 우려를 낳고 있다[14]. 현재 우리나라에서는 다제내성 *P. aeruginosa*에 대한 많은 연구가 보고되고 있으나, 세포 관련 및 세포외 병독성 인자와 관련된 연구는 매우 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 대전지역의 3차 병원에서 분리된 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 주요 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 분포를 확인하고, 항균제 내성과의 관계에 대해 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주의 수집과 동정

본 연구는 2011년 3월부터 2012년 12월까지 대전지역의 3차 병원에 의뢰된 객담(21), 소변(5), 창상(3), 농(1), 담즙(1), 혈액(1)로부터 분리된 carbapenem 내성 *P. aeruginosa* 32균주를 대상으로 하였다. 이 중 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 임상검체로부터 분리 배양된 균주는 Vitek II automated ID system (BioMerieux, Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 동정하였고, carbapenem 내성 *P. aeruginosa*는 imipenem과 meropenem에 내성인 균주로 선별하였다.

2. 항균제 감수성 검사

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라, amikacin, gentamicin, imipenem, meropenem 및 ciprofloxacin, levofloxacin, ceftazidime, cefepime (BBL, Cockeysville, MI, USA)에 대한 감수성 검사는 Mueller-Hinton 한천배지 (Difco, Cockeysville, MD, USA)를 사용하여 디스크 확산법으로 확인하였다[15]. 정도관리를 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위 내에 있는지 확인하였다. Magiorakos

등[16]의 연구를 참고하여, aminoglycosides, carbapenems 및 fluoroquinolones 계열에 내성을 보인 균주를 다제내성 *P. aeruginosa*로 하였다.

3. 다제내성 *P. aeruginosa*의 multilocus sequencing typing (MLST) 분석

항균제 감수성 시험 결과, 다제내성 *P. aeruginosa*로 확인된 균주는 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, Genomic DNA Prep kit (Solgent, Daejeon, Korea)을 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출액(5 µL), 10× *Taq* buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U *Taq* DNA polymerase (Solgent) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. 7개의 housekeeping gene (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*)은 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)을 사용하여 96°C에서 1분간 반응시킨 후, 96°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 반응산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물은 PCR purification kit (Solgent)로 분리한 후, BigDye Terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. MLST는 *P. aeruginosa* MLST database website (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>)에 설명된 방법에 따라 분석하였다. 7개의 housekeeping gene에 대한 각각의 염기서열 분석 결과는 MLST database에 입력하여 allelic number와 sequence type (ST)를 확인하였다.

4. 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 검출

*P. aeruginosa*의 주요 병독성 인자인 *toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*, *plcH*, *plcN*, *phzI*, *phzII*, *phzH*, *phzM*, *phzS*, *lasA*, *lasB*, *piA*, *piB*, *aprA*, *pvdA* 유전자를 검출하기 위해 이전 연구에서 사용된 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 진행하였다[7, 17]. 먼저, *toxA*, *exoS*, *plcH*, *plcN*, *lasB* 유전자를 확인하기 위해, MLST 분석에서와 동일한 방법으로 DNA 추출액(5 µL), 10× *Taq* buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U *Taq* DNA polymerase (Solgent) 및 증류수를 혼합하여 총 부피 25 µL의 반응용액을 만들었다. PCR 과정은 94°C에서 3분간 반응시킨 후, 94°C에

Table 1. Oligonucleotides primers used for virulence genes amplification

Gene	Sequence (5'-3')	Size of product (bp)	References
<i>toxA</i>	F: CTGCGCGGGTCTATGTGCC R: GATGCTGGACGGGTCGAG	270	7
<i>exoS</i>	F: CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG R: CCGAACCGCTTCACCAAGGC	444	7
<i>exoT</i>	F: CAATCATCTCAGCAGAACCC R: TGTCGTAGAGGATCTCCTG	1159	17
<i>exoU</i>	F: GATTCATCACAGGCTCG R: CTAGCAATGGCACTAATCG	3308	17
<i>exoY</i>	F: TATCGACGGTCATCGTCAGGT R: TTGATGCACTCGACCAGCAAG	1035	17
<i>plcH</i>	F: GCACGTGGTCATCCTGATGC R: TCCGTAGGCGTCGACGTAC	608	7
<i>plcN</i>	F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG R: TCGCTGTGCGAGCAGGTCGAAC	481	7
<i>phzI</i>	F: CATCAGCTTAGCAATCCC R: CGGAGAAACTTTCCCTC	392	17
<i>phzII</i>	F: GCCAAGGTTTGTGTCGG R: CGCATTGACGATATGGAAC	435	17
<i>phzH</i>	F: GGGTTGGGTGGATTACAC R: CTCACCTGGGTGTTGAAG	1752	17
<i>phzM</i>	F: ATGGAGAGCGGGATCGACAG R: ATGCGGGTTTCCATCGGCAG	875	17
<i>phzS</i>	F: TCGCCATGACCGATACGCTC R: ACAACCTGAGCCAGCCTTCC	1752	17
<i>lasA</i>	F: GCAGCACAAAAGATCCC R: GAAATGCAGGTGCGGTC	1075	17
<i>lasB</i>	F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC R: TGGCGTCGACGAACCTCTCG	284	7
<i>piIA</i>	F: ACAGCATCCAAGTACGCG R: TTGACTTCTCCAGGCTG	1675	17
<i>piIB</i>	F: TCGAACTGATGATCGTGG R: CTTTCGGAGTGAACATCG	408	17
<i>aprA</i>	F: TGTCAGCAATTCTCTTGC R: CGTTTTCCACGGTGACC	1017	17
<i>pvdA</i>	F: GACTCAGGCAACTGCAAC R: TTCAGGTGCTGGTACAGG	1281	17

서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 또한, *exoT*, *exoU*, *exoY*, *phzI*, *phzII*, *phzH*, *phzM*, *phzS*, *lasA*, *piIA*, *piIB*, *aprA*, *pvdA* 유전자 검출을 위해 Finnan 등[17]의 연구에서 사용된 primer와 반응조건을 참고하여 진행하였다. PCR 반응산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물은 PCR purification kit (Solgent)로 분리한 후, BigDye Terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5. 통계분석

Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc., Redmond, WA, USA)를 이용한 chi-square test를 통해 $P < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 항균제 감수성 양상과 다제내성균의 MLST 분석

총 32균주의 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 항균제 감수성 검사를 실시한 결과, amikacin에 14균주(43.8%), gentamicin에 16균주(50.0%), ciprofloxacin에 22균주(68.8%) levofloxacin에 22균주(68.8%), ceftazidime에 13균주(40.6%), cefepime에 16균주가 내성을 보였으며, imipenem과 meropenem에 32균주(100%) 모두 내성을 보였다(Table 2). 이 중 14균주는 다제내성임을 확인하였고, ST235가 10균주(71.4%), ST245가 2균주(14.3%), ST589, ST654가 각각 1균주(7.1%)를 나타내었다. 또한, 다제내성균(14균주)와 다제내성이 아닌 균(18균주)에 대한 세포관련 및 세포외 병독성 인자의 분포 차이를 확인하였다(Table 3). 15개의 세포관련 및

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 32 CRPA isolates

Antimicrobial agent	No. of isolates (%)		
	Resistant	Susceptible	Intermediate
Amikacin	14 (43.8%)	17 (53.1%)	1 (3.1%)
Gentamicin	16 (50.0%)	16 (50.0%)	0 (0.0%)
Imipenem	32 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Meropenem	32 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Ciprofloxacin	22 (68.8%)	10 (31.3%)	0 (0.0%)
Levofloxacin	22 (68.8%)	8 (25.0%)	2 (6.3%)
Ceftazidime	13 (40.6%)	13 (40.6%)	6 (18.8%)
Cefepime	16 (50.0%)	12 (37.5%)	4 (12.5%)

Table 3. Prevalence of virulence genes between MDR and non-MDR *P. aeruginosa* isolates

Genes	No. of isolates (%)		
	Total (N=32)	MDR (N=14)	non-MDR (N=18)
<i>toxA</i>	32 (100.0%)	14 (100.0%)	18 (100.0%)
<i>exoS</i>	20 (62.5%)	4 (28.6%)	16 (88.9%)
<i>exoT</i>	31 (96.9%)	13 (92.9%)	18 (100.0%)
<i>exoU</i>	12 (37.5%)	10 (71.4%)	2 (11.1%)
<i>exoY</i>	27 (84.4%)	10 (71.4%)	17 (94.4%)
<i>plcH</i>	27 (84.4%)	10 (71.4%)	17 (94.4%)
<i>plcN</i>	32 (100.0%)	14 (100.0%)	18 (100.0%)
<i>phzI</i>	31 (96.9%)	13 (92.9%)	18 (100.0%)
<i>phzII</i>	27 (84.4%)	10 (71.4%)	17 (94.4%)
<i>phzH</i>	30 (93.8%)	12 (85.7%)	18 (100.0%)
<i>phzM</i>	32 (100.0%)	14 (100.0%)	18 (100.0%)
<i>phzS</i>	31 (96.9%)	14 (100.0%)	17 (94.4%)
<i>lasA</i>	27 (84.4%)	9 (64.3%)	18 (100.0%)
<i>lasB</i>	31 (96.9%)	14 (100.0%)	17 (94.4%)
<i>piIA</i>	8 (25.0%)	3 (21.4%)	5 (27.8%)
<i>piIB</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>aprA</i>	30 (93.8%)	12 (85.7%)	18 (100.0%)
<i>pvdA</i>	16 (50.0%)	3 (21.4%)	13 (72.2%)

Abbreviation: MDR, multidrug resistant.

세포의 병독성 인자의 유전자의 경우, 다제내성균과 다제내성이 아닌 균에서 큰 차이를 보이지 않았으나, *exoS*, *exoU*, *pvdA* 유전자의 경우, 유의한 차이를 보였다($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P = 0.004$). 특히, *exoU* 유전자의 경우, 다제내성균에서 71.4% (10/14)의 높은 비율을 보인 반면, 다제내성이 아닌 균에서는 11.1% (2/18)의 낮은 비율로 확인되었으며, *exoS* 유전자의 경우, 다제내성균에서 28.6% (4/14)의 낮은 비율을 보였으나, 다제내성이 아닌 균에서는 88.9% (16/18)의 높은 비율이 확인되었다(Table 4).

2. 세포 관련 및 세포의 병독성 인자의 확인

18개의 세포 관련 및 세포의 병독성 인자의 유전자 확인을 위해 PCR과 염기서열을 분석한 결과, 총 32균주의 carbapenem 내성 *P. aeruginosa* 중 32균주(100.0%) 모두에서 확인되었다(Table 3). 18개의 세포 관련 및 세포의 병독성 인자 유전자 중 *toxA*, *plcN*, *phzM* 유전자(100%, 32/32)가 가장 높은 비율로 확인되었으며, *exoT*, *phzI*, *phzS*, *lasB* 유전자가 각각 96.9% (31/32), *phzH*, *aprA* 유전자가 각각 93.8% (30/32)의 높은 비율로 확인되었다. 반면, *piIB* 유전자는 32균주 모두에서 확인되지 않았으며, *exoU*와 *piIA* 유전자는 각각 37.5% (12/32)와 25.0% (8/32)로 비교적 낮은 비율로 확인되었다. 또한, 32균주는 각각 8~16개의 유전자를 동시에 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 그 중 15개의 유전자를 가지고 있는 균주가 9균주

(28.1%)로 가장 높은 비율을 보였다(Table 5). 그 다음으로 14개의 유전자를 가지고 있는 균주가 8균주(25.0%), 13개와 16개의 유전자를 가지고 있는 균주가 각각 5균주(15.6%)로 확인되었으며, 12개의 유전자를 가지고 있는 균주가 2균주(6.3%), 8개와 9개, 11개의 유전자를 가지고 있는 균주가 각각 1균주(3.1%)로 확인되었다.

고찰

Carbapenem 내성 *P. aeruginosa*의 증가는 전세계적으로 높은 사망율의 원인이 되고 있으며, 다제내성으로 발달하고 있어 매우 심각한 실정이다[9, 14, 18]. 본 연구에서도 32균주의 carbapenem 내성 *P. aeruginosa* 중 14균주(43.8%)가 다제내성균이었으며, 이 중 71.4% (10균주)가 ST235로 확인되었다. 이전 많은 연구에서 다제내성으로 보고되고 있는 ST235는 CC235의 대표적인 클론으로, 유럽, 아시아, 남아메리카 등에서 보고되고 있다[19, 20]. 우리나라의 경우, IMP-6를 생성하는 ST235의 출현과 확산에 대해 보고하고 있으며, 최근에는 IMP-10을 생성하는 ST235가 보고되어 carbapenemases의 다양화에 대한 우려를 낳고 있다[21, 22].

또한, 항균제 감수성 결과, 8개의 항균제에 대해 모두 40%이상의 높은 내성율을 보임에 따라, 향후 다제내성으로의 발달 가능성과 항균제의 선택과 사용에 대한 어려움이 대두되고 있다

Table 4. Distribution of *exo* genes between MDR and non-MDR *P. aeruginosa* isolates

	Strain	Source	ST	Virulence gene	Resistance profile
MDR (N=14)	26	Wound	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV
	29	Sputum	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	31	Wound	235	<i>exoU</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CFP
	38	Sputum	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	82	Urine	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	87	Sputum	245	<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CFP
	114	Wound	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CFP
	169	Sputum	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	255	Sputum	654	<i>exoS</i> , <i>exoT</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV
	257	Urine	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	269	Sputum	589	<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV
	293	Urine	245	<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV
	308	Urine	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV, CFP
	310	Sputum	235	<i>exoT</i> , <i>exoU</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LEV
non-MDR (N=18)	19	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	32	Blood		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM
	107	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM
	184	Urine		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CAZ, CFP
	196	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	213	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ, CFP
	252	Bile		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV
	254	Pus		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM
	274	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM
	275	Sputum		<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	AMK, GEN, IPM, MEM, CAZ, CFP
	279	Sputum		<i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	GEN, IPM, MEM, CAZ, CFP
	300	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV
	325	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ
	337	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CIP, LEV
346	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM	
351	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM, CFP	
369	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	IPM, MEM	
371	Sputum		<i>exoS</i> , <i>exoT</i>	IPM, MEM, CIP, LEV, CAZ	

Abbreviations: MDR, multidrug resistant; ST, sequence type; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; CAZ, ceftazidime; CFP, cefepime.

[23]. 최근 *P. aeruginosa*는 많은 항균제에 내재된 또는 획득된 내성 관련 연구 뿐만 아니라, 세포 관련 및 세포외 병독성 인자에 대한 많은 연구가 보고되고 있다[2, 9]. 이러한 병독성 인자들은 심각한 조직 손상, 혈액 감염 전파 및 질병의 진행에 관여하며, 현재 사용 가능한 항균제의 치료를 제한하고 있어 그 심각성이 중요시되고 있다[24, 25]. 이전 연구에서 특정 항균제인 fluoroquinolone과 일부 병독성 유전자인 *exoS*와 *exoU*의 관계를 확인한 결과를 토대로, 이번 연구에서는 동일 지역의 병원에서 분리한 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 다양한 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 분포 및 항균제 내성과의 관계를 확인하였다. 18개의 세포 관련 및 세포외 병독성 인자를 확인한 결과, 32균주 모두에서 유전자가 확인되었으며, *toxA*, *plcN*, *phzM* 유전자(100%, 32/32)가 가장 높은 비율로 확인되었다. 앞서 발표된 많은 연구에서도 *toxA* 유전자는 높은 빈도로

확인되었는데, Badr RI 등[26]의 연구에 의하면, 화상환자로부터 분리된 *P. aeruginosa*에서 89%의 높은 비율로 확인되었으며, Haghi 등[9]의 연구에서도 총 93균주의 *P. aeruginosa* 중 97.8%에서 확인되었다. *toxA* 유전자에 의해 암호화된 exotoxin A는 type II secretion system (T2SS)의 주요 구성 성분으로, 인체에서 세포 사멸, 심각한 조직손상과 괴사를 일으키고 있다. 이러한 exotoxin A는 ADP-ribosyl 부분을 신장인자 2로 전달하는 ADP-ribosyl transferase로서, 포유동물 세포에서 단백질 합성을 억제하고 있다[7, 8]. 또한, *P. aeruginosa*에서 rhamnolipid와 2종류의 phospholipases C (용혈성 phospholipase C (PlcH)와 비용혈성 phospholipase C (PlcN))는 3가지 용해성 단백질로써, 숙주세포의 침입에 관여하고 있다. PlcH는 적혈구 막의 분해를 촉진하는데 외막의 인지질 성분인 phosphatidylcholine과 sphingomyelin을 분해하

Table 5. Distribution of virulence genes among 32 CRPA isolates

Genes	Virulence genes profile	No. of isolates (%)	Total No. (%)
8 genes	<i>toxA, exoU, plcN, phzI, phzM, phzS, lasA, lasB</i>	1 (3.1%)	1 (3.1%)
9 genes	<i>toxA, exoT, exoU, plcH, plcN, phzM, phzS, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	1 (3.1%)
11 genes	<i>toxA, exoT, exoU, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB</i>	1 (3.1%)	1 (3.1%)
12 genes	<i>toxA, exoT, exoU, exoY, plcH, plcN, phzI, phzH, phzM, phzS, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	2 (6.3%)
	<i>toxA, exoT, exoU, exoY, plcN, phzI, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	
13 genes	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, aprA</i>	1 (3.1%)	5 (15.6%)
	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	
	<i>toxA, exoS, exoT, plcH, plcN, phzI, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA, pvdA</i>	1 (3.1%)	
	<i>toxA, exoT, exoU, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, lasA, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	
	<i>toxA, exoT, exoU, exoY, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA</i>	1 (3.1%)	
14 genes	<i>toxA, exoT, exoU, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA</i>	5 (15.6%)	8 (25.0%)
	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA</i>	2 (6.3%)	
	<i>toxA, exoS, exoT, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasB, pilA, aprA, pvdA</i>	1 (3.1%)	
15 genes	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, aprA, pvdA</i>	7 (21.9%)	9 (28.1%)
	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasB, pilA, aprA, pvdA</i>	1 (3.1%)	
	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, pilA, aprA, pvdA</i>	1 (3.1%)	
16 genes	<i>toxA, exoS, exoT, exoY, plcH, plcN, phzI, phzII, phzH, phzM, phzS, lasA, lasB, pilA, aprA, pvdA</i>	5 (15.6%)	5 (15.6%)

여 내막을 노출시키고, PlcN은 내막에 존재하는 phosphatidylserine을 가수분해함으로써, 2종류의 phospholipases는 상승작용을 하고 있다[27]. Georgescu 등[28]은 *plcH* 유전자만 확인되었던 루마니아의 이전 연구 결과와 달리, 혈액배양과 상처부위로부터 분리된 *P. aeruginosa*에서 *plcH*와 *plcN* 유전자 모두 84.6%의 높은 빈도로 확인된 결과를 보고하였다. 2016년 이란에서 발표한 Faraji 등[29]은 낭포성 섬유증과 화상감염을 가진 소아에서 *P. aeruginosa*의 병독성 인자를 각각 확인한 결과, *plcH* (87.7%, 79.0%)와 *plcN* (60.0%, 63.1%) 유전자 모두 검출되었으며, 본 연구에서도 *plcN*와 *plcH* 유전자가 100%와 84.4%로 확인되어, 이전 연구보다 높은 결과를 보였다.

Phenazine 오페론(*phzI, phzII*) 및 유전자(*phzH, phzM, phzS*)는 *P. aeruginosa*에 의해 수동적으로 분비되는 3 가지 phenazine 화합물의 형성에 관여하는 전구 단백질을 암호화한다[30]. 이러한 3가지 phenazine 화합물은 pyocyanin, 1-hydroxyphenazine, phenazine-1-carboxamide로써, 세포 내 산화 스트레스를 증가시키는 원인이 되고 있으며, 2015년 미국에서 발표한 Goldufsky 등[6]은 *P. aeruginosa* 균주의 90% 이상이 pyocyanin을 생성함으로써 만성 폐 감염에서 관찰된 폐 조직 손상에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 5개의 phenazine 오페론 및 유전자가 84% 이상의 높은 빈도를 보였으며, *phzM* 유전자가 32균주 모두에서 확인되었다. *P. aeruginosa* 감염에 의한 조직손상의 또 다른 원인 중 하나는 type III secretion proteins로써, *exo* 유전자(*exoS, exoT, exoU, exoY*)는 type III secretion systems의 발현과 분비에

관여하고 있다[31, 32]. Allydice-Francis 등[33]의 연구에 의하면, 대부분의 많은 *P. aeruginosa* 균주들이 여러 *exo* 유전자를 동시에 가지고 있는 것을 보고하였다. 이와 유사하게, 본 연구에서는 *exoT* 유전자가 96.9%로 가장 높은 빈도로 확인되었고, 그 다음으로 *exoY* 유전자가 84.4%, *exoS* 유전자가 62.5%, *exoU* 유전자가 37.5%를 보였으며, 1균주를 제외한 31균주 (96.9%)가 2개 이상의 *exo* 유전자를 가지고 있었다. 이 중 *exoU* 유전자와 *exoS* 유전자는 유의한 관계를 보이는데, *exoU* 유전자가 확인된 12균주 중 10균주는 다제내성균(83.3%)인 반면, *exoS* 유전자가 확인된 20균주 중 16균주는 다제내성이 아닌 균(80.0%)으로 확인되었으며, 두 유전자를 모두 가지고 있는 균주는 한 균주도 확인되지 않았다. 2019년 이란에서 발표한 Khodayary 등[18]은 *exoU* 유전자의 획득과 항균제의 높은 내성에 대한 정확한 기전은 알려지지 않았으나, *exoU* 유전자의 존재는 *exoS* 유전자와 비교하여 항균제에 대한 내성이 높다는 점을 확인하였고, 이러한 결과는 이란과 한국, 인도, 호주 등 다른 국가에서 연구한 결과와 일치하였다. 그 밖에 *P. aeruginosa*는 *lasA*와 *lasB* 유전자가 암호화하는 elastase 효소를 가지고 있는데, 이 효소는 사이토카인, 백혈구 및 방어세포를 분해할 수 있으며, 폐와 혈관 조직의 분해에 중요한 역할을 하고 있다[34, 35]. 또 다른 병독성 인자 중 하나로, *aprA* 유전자가 암호화하는 alkaline protease는 각막염, 중이염, 낭포성 섬유증 및 균혈증에서 생성되며, 사이토카인, 보체, 인터페론 및 종양괴사인자와 같이 생물학적으로 중요한 단백질의 가수분해에 관여하고 있다 [36]. 본 연구에서 *lasB*와 *lasA, aprA* 유전자는 각각 96.9%와

84.4%, 93.8%의 높은 빈도로 확인되었다. 또한, pyoverdine 생합성에 관여하는 *pvdA* 유전자는 50.0%가 확인되었으며, type IV pili의 생합성에 관여하는 *pilA* 유전자는 25.0%를 보였고 *pi/B* 유전자는 한 균주에서도 검출되지 않았다. 또한, 이전 연구에서 Fazeli N 등[2]은 다제내성 *P. aeruginosa* 균주에서 병독성 관련 유전자의 다양한 범위와 조합을 확인하였다. 이와 유사하게 32균주에서 확인된 17개의 세포 관련 및 세포외 병독성 인자는 8개 이상의 유전자가 다양한 조합으로 확인되었으며, 이 중 15개의 유전자를 가지고 있는 9균주(28.1%)는 가장 높은 빈도로 확인되었다.

2011년 3월부터 2012년 12월까지 대전지역의 3차 병원에서 분리된 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 한 항균제 감수성 결과, 43.8%가 다제내성균으로 확인되었으며, 각 항균제에 대한 내성율이 40%이상을 보임에 따라 다제내성으로의 발달 및 확산, 항균제의 선택과 제한이 심각한 실정이다. 또한, 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 생성을 확인한 결과, 32 균주 모두에서 확인되었고 8개 이상의 유전자를 가진 다양한 조합으로 존재하는 것을 확인하였으며, 이 중 *exoU* 유전자와 다제내성균과의 유의한 관계를 확인하였다($P < 0.001$). 향후 다제내성균에 대한 중요한 예측 마커로써 활용되기 위해 *exoU* 유전자와 다제내성균과의 연관성에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요약

다제내성 *P. aeruginosa*의 출현과 확산은 전 세계적으로 중요한 문제가 되고 있다. *P. aeruginosa*에 의한 발병은 일부 몇몇 세포 관련 및 세포외 병독성 인자의 생성에 기인한다. 본 연구에서는 대전지역의 3차 병원에서 분리된 carbapenem 내성 *P. aeruginosa*를 대상으로 병독성 인자의 분포와 항균제 내성 양상을 조사하였다. 항균제 감수성 시험은 디스크 확산법으로 확인하였고, 병독성 유전자의 분석을 위해 PCR과 염기서열분석을 수행하였다. 또한, 다제내성 *P. aeruginosa*의 sequence type (ST)은 multilocus sequence typing (MLST)을 통해 확인하였다. 32균주의 carbapenem 내성 *P. aeruginosa* 중, 14균주(43.8%)가 다제내성이었으며, 주요 ST는 ST235 (10균주, 71.4%)임을 확인하였다. 병독성 유전자는 32균주 모두에서 확인되었고, 이 중 가장 높은 빈도로 확인된 병독성 유전자는 *toxA*, *plcN*, *phzM* (100%)이었다. 또한, 32균주는 모두 8개 이상의 병독성 유전자를 가지고 있었으며, 9균주(28.1%)가 15개의 병독성 유전자를 가지고 있었다. *exoU* 유전자는 다제내성 *P.*

aeruginosa 균주의 71.4%에서 확인되었다. 이러한 결과는 *exoU* 유전자가 다제내성 *P. aeruginosa* 균주의 지속성에 대한 예측 표지자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Cho HH, Professor.

REFERENCES

1. Kumari H, Balasubramanian D, Zincke D, Mathee K. Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on β -lactam and non- β -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *J Med Microbiol.* 2014;63:544-555. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.070185-0>.
2. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16:E15722. <http://dx.doi.org/10.5812/ircmj.15722>.
3. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009;58:1133-1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>.
4. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol.* 2004; 53:73-81. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05324-0>.
5. Choy MH, Stapleton F, Willcox MD, Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *J Med Microbiol.* 2008;57:1539-1546. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003723-0>.
6. Goldufsky J, Wood S, Hajihossainlou B, Rehman T, Majdobehe O, Kaufman HL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T induces potent cytotoxicity against a variety of murine and human cancer cell lines. *J Med Microbiol.* 2015;64:164-173. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000003>.
7. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pol J Microbiol.* 2009;58:255-260.
8. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006;36:78-91. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>.
9. Haghi F, Zeighami H, Monazami A, Toutouchi F, Nazarian S, Naderi G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microb Pathog.* 2018;115:251-256. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.052>.
10. Makedou KG, Tsiakiri EP, Bisiklis AG, Chatzidimitriou M, Halvantzis AA, Ntoutsou K, et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. *J Hosp Infect.* 2005;60:245-248. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.01.013>.
11. Tsukayama DT, van Loon HJ, Cartwright C, Chmielewski B, Bluit

- AC, van der Werken C, et al. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24:339-345. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.04.011>.
12. Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DWDF, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol*. 2017;48:211-217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>.
 13. Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo- β -lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *Med Microbiol*. 2011;60:988-994. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029868-0>.
 14. Cho HH. Molecular analysis of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients hospitalized in Daejeon between 2008 and 2014 year. *Korean J Clin Lab Sci*. 2018;50:406-413. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.406>.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
 17. Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5783-5792. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5783-5792.2004>.
 18. Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A, Elmi A, et al. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes*. 2019;12:28. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4071-0>.
 19. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:346-352. <http://doi.org/10.1128/AAC.00824-09>.
 20. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2578-2583. <http://doi.org/10.1128/JCM.00102-11>.
 21. Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH, Lee K. Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*_{IMP-6} and emergence of *bla*_{GES-24} and *bla*_{IMP-10} on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:7216-7223. <http://doi.org/10.1128/AAC.01601-16>.
 22. Wi YM, Choi JY, Lee JY, Kang CI, Chung DR, Peck KR, et al. Emergence of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:767-769. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.023>.
 23. Kim D, Ahn JY, Lee CH, Jang SJ, Lee H, Yong D, et al. Increasing resistance to extended-spectrum cephalosporins, fluoroquinolone, and carbapenem in Gram-negative bacilli and the emergence of carbapenem non-susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*: Analysis of Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) data from 2013 to 2015. *Ann Lab Med*. 2017;37:231-239. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.3.231>.
 24. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011;19:419-426. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
 25. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009;73:338-344. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>.
 26. Badr RI, Nagdy M, Sabagh A, Din AB. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A as a virulence factor in burn wound infections. *Egypt J Med Microbiol*. 2008;17:125-132.
 27. Cotar AI, Chifiriuc MC, Banu O, Lazar V. Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples. *Biointerface Res Appl Chem*. 2013;3:551-558.
 28. Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC Infect Dis*. 2016;16:92. <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1396-3>.
 29. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis and burn wounds in Iran. *Microb Pathog*. 2016;99:1-4. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.013>.
 30. Jamunadevi S, Balashanmugam P, Muralitharan G, Kalaichelvan PT. Molecular characterization of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to phenazine gene. *J Mod Biotechnol*. 2012;1:70-74.
 31. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13:831-842.
 32. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:654-665. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
 33. Allydice-Francis K, Brown PD. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int J Microbiol*. 2012;2012:426241. <http://doi.org/10.1155/2012/426241>.
 34. Kruczek C, Kottapalli KR, Dissanaik S, Dzvova N, Griswold JA, Colmer-Hamood JA, et al. Major transcriptome changes accompany the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in blood from patients with severe thermal injuries. *PLoS One*. 2016;11:E0149229. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0149229>.
 35. Islamieh DI, Afshar D, Esmaeili D. Effect of Satureja khuzistanica essential oil (SKEO) extract on expression of *lasA* and *lasB* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*. 2019;11:55-59.
 36. Andrejko M, Siemińska-Kuczer A, Janczarek M, Janik E, Bednarczyk M, Gagoś M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability. *Acta Biochim Pol*. 2019;66:91-100. http://doi.org/10.18388/abp.2018_2741.