

중환자실에 근무하는 의료인의 전비강에서 PBP2a Rapid Kit와 직접 Coagulase 검사를 이용한 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*의 검출

주성대학 임상병리과¹, 분당제생병원 진단검사의학과², 충북대학교 의과대학 진단검사의학교실³

홍 승 복¹ · 신 경 아² · 손 재 철³ · 신 경 섭³

Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the Anterior Nares of Healthcare Workers in a Intensive Care Unit by Using PBP2a Rapid Kit and Direct Coagulase Test

Seung-Bok Hong¹, Kyung-A Shin², Jae-Cheol Son³, and Seob-Kyeong Shin³

Department of Clinical Laboratory Science, Juseong University, Cheongwon 363-794, Korea¹

Department of Laboratory Medicine, Pundang Jesaeng General Hospital, Seongnam 463-774, Korea²

Department of Laboratory Medicine, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju 361-711, Korea³

We evaluated the performance of a novel screening test, PBP2a MRSA rapid kit (Dinona Inc., Iksan, Korea), for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) based on a immunochromatographic assay. The test is able to detect penicillin-binding protein 2a (PBP2a) using the nasal specimens from health care workers. The nasal specimens were obtained from 69 healthcare workers and were incubated in enrichment broth followed eight hours incubation in BHI with cefoxitin 4 µg/mL. These broth were tested by PBP2a Rapid Kit. The enrichment broths were also directly tested for tube coagulase using the conventional identification method. 19 of 22 MRSA showed positive results by PBP2a rapid test and direct coagulase test (the sensitivity for detection of MRSA, 86.36%). While, 8 of 47 non-MRSA showed false positive results for the two tests. All of the 8 non-MRSA which showed false positive were co-colonizing isolates with MRCNS and MSSA. In addition, 46 of 49 methicillin-resistant staphylococci (MRS) showed positive results for PBP2a MRSA rapid kit (the sensitivity for detection of MRS, 93.8%), and all of 20 non-MRS showed negative results (specificity, 100%). The combination of PBP2a MRSA rapid kit and direct coagulase test showed the good sensitivity for detection of MRSA from anterior nares but frequently showed false positive results from the co-colonizing carrier with MRCNS and MSSA.

교신저자 : 신경섭. (우) 361-711, 충북 청주시 흥덕구 개신동 충북
대학병원 진단검사의학과

TEL : 043-269-6240, FAX : 043-271-5243,
E-mail : ksshin@chungbuk.ac.kr

Received 7, JUN 2010 / Returned for modification 14, NOV 2010 / Accepted 10, DEC 2010

Key words : MRSA, Nasal colonization, Intensive care unit, Healthcare worker, PBP2a MRSA rapid kit

I. 서 론

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 가장 중요한 원내감염균 중 하나이며, 이 균에 의한 감염은 methicillin-susceptible *S. aureus*(MSSA)에 의한 감염보다 유병률 및 사망률이 높고(Harboth 등, 1998; Cassandra 등, 2003; Cosgrove 등, 2003) 입원기간, 항생제 사용기간을 연장시키는 등 의료비 상승을 야기할 수 있다(Chaix 등, 1999). 의료 종사자에서 MRSA 보균자를 선별하며, 접촉주의 및 철저한 손위생의 실천은 이들 균의 전파 및 확산을 방지하는데 매우 중요하다(Sewell 등, 1993; Rubinovitch와 Pittet, 2001). 따라서 조기에 MRSA의 보균자를 검출하는 것은 적절한 감염관리를 할 수 있어 이들 균에 의한 감염의 전파를 줄일 수 있다. 그러나 전통적인 방법으로 비강에서 MRSA를 검출하는 것은 3-5일 정도 소요될 뿐 아니라 균의 재분리, 동정 및 감수성 검사를 시행해야 하므로 임상 미생물 검사실의 업무량을 가중시키게 된다.

MRSA가 집락화된 의료종사자를 선별하는 빠르고 효율적인 다양한 방법들이 소개되고 있다. 상품화된 실시간 증합효소 방법을 이용한 MRSA 검출 방법은 빠르고 정확한 결과를 보이거나(Louie 등, 2002; Huletsky 등, 2004; Stratidis 등, 2007) 특별한 장비 및 전문화된 인력이 필요하므로 대부분의 중소병원을 포함하여 많은 검사실에서는 효율적이지 않을 수 있다(Bennett와 Sharp, 2008). 또한 methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus*(MRCNS)와 MSSA가 동시에 존재하는 전비강 검체에서 위 양성을 보일 수 있다(Becker 등, 2006). 한편 MSSA나 MRCNS의 증식을 억제하고 MRSA가 특별한 색을 띄게 하는 CHROMagar가 MRSA의 검출에 이용하기도 하는데(Kluytmans 등, 2002; Perry 등, 2004) 이는 전비강과 같이 MRCNS와 MSSA가 동시에 존재하는 검체에서도 유용하게 사용될 수 있다. 그러나 아직까지 이

들 배지의 사용량은 많지 않아서 매일 사용하지 않는 경우 초기 배지의 구입에 많은 시간이 소요되며(1개월 이상), 사용하지 않고 남은 배지의 경우 오랫동안 보관할 수 없다(2개월 이내). 최근에 lateral-flow chromatographic immunoassay에 기초한 PBP2a MRSA rapid 키트(Dinona, Inc., Iksan, Korea)가 소개되었다. 이 키트는 PBP2a에 대한 단클론 항체를 선별 후 금입자에 접합(conjugation)하여 만들었으며 이전의 실험에서 혈액배양 양성 검체에서 PBP2a를 검출하는데 우수한 결과를 보였다(Shim 등, 2009).

이 연구의 목적은 중환자실에 근무하는 의료종사자의 전비강에서 MRSA 보균자를 검출하는데 PBP2a 신속동정 키트를 이용하여 MRSA 보균자 검색에 유용성을 알아 보도록 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

4일 동안 중환자실에 근무하는 의료인 69명을 대상으로 전비강에서 멸균된 면봉으로 검체를 채취하여 6.0% NaCl이 첨가한 tryptone soya broth(TSB; BBL, Sparks, MD, USA)에 증균하였다.

2. Rapid kit를 이용한 PBP2a 검출

TSB에 증균한 1 mL를 cefoxitin 4 µg/mL가 포함된 BHI broth(BBL, Sparks, MD, USA) 4 mL에 넣고 35°C에서 8시간 증균 시켰다. 이어서 증균액 1 mL를 취하여 lysis 완충액과 Tween 20, 100 µL를 넣고 10분 동안 실온에 방치한 후 100 µL를 취하여 Rapid kit에 떨어뜨린 후 20분 이내 판독하였다. 양성 결과는 대조선과 검사선에 붉은 침강선이 나타나게 되며, 대조선만 관찰되고 검사선

Table 1. The results of PBP2a MRSA rapid kit for the nasal swabs from the 69 healthcare workers.

Classification by identification and cefoxitin disk susceptibility test (No.)	PBP2a MRSA rapid kit	
	Positive	Negative
MRSA (22)	20	2
MSSA (9)	0	9
MRCNS + MSSA (11)	11	0
MRCNS (16)	15	1
MSCNS and/or other bacteria (11)	0	11
Total (69)	46	23

Abbreviations: MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; MRCNS, methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; MSCNS, methicillin-susceptible CNS

이 관찰되지 않으면 음성으로 판단하였다.

3. 균의 동정, cefoxitin 감수성 검사 및 직접 coagulase 검사

TSB에서 하룻밤 증균한 용액을 혈액우무배지(Cheongmeak, Daejeon, Korea)에 접종하여 균의 성장을 관찰하고, 균이 증식하면 그람염색과 coagulase 검사를 시행하여 *S. aureus*와 coagulase negative staphylococci(CNS)로 감별하였다. 포도알균이 동정된 균의 methicillin 내성을 판단하기 위해 CLSI guideline(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009)에 따라 cefoxitin 감수성 검사를 시행하였다. Cefoxitin 디스크 확산법은 Muller-Hinton 우무배지에 0.5 McFarland 균액을 접종한 후 cefoxitin 30 µg(BBL, Cockeysville, MD, USA) 디스크를 올려 놓고 16-18시간 동안 35°C에서 배양하였다. 모든 증균 배양 검체에서 직접 시험관 coagulase 검사를 시행하였다. 시험관 coagulase 검사는 사람 혈장에 증균 배양액을 넣고 4시간 배양한 후 응고여부를 판정하였다.

4. 검출 예민도 및 특이도

전통적인 방법의 동정 및 cefoxitin 디스크 확산법을 기준으로 MRSA, MSSA, MRCNS, MSCNS 또는 기타세균으로 나누고 MRSA, MRCNS가 분리된 경우는 MR-staphylococci(MRS)로 나머지의 경우는 non-MRS로 구분하였다. 그리고 MRSA 이외의 모든 경우를 non-MRSA로 간주하여 1) MRS와 non-MRS의 구분은 PBP2a MRSA rapid kit로 2) MRSA와 non-MRSA로 구분

은 PBP2a MRSA rapid kit와 direct coagulase 검사로 평가하였다. 마지막으로 2가지를 구분하는데 있어 PBP2a MRSA rapid kit의 예민도, 특이도, 양성예측률 및 음성예측률을 계산하였다.

III. 결 과

총 69명의 의료인의 비강에서 MRSA, MSSA, MRCNS 이 각각 22명, 9명 그리고 16명에서 분리되었으며 11명에서는 MRCNS와 MSSA가 동시에 분리되었고 11명에서는 MSCNS 또는 기타 세균이 분리되었다(Table 1). 22주의 MRSA 중 PBP2a MRSA Rapid kit에서 20주가 검출되었으나 이중 한 검체에서는 직접 coagulase 검사에서 음성을 보여 22주 중 rapid kit와 직접 coagulase 검사에 의해 19주가 MRSA로 판단되었다(MRSA 검출 예민도, 86.36%). MSSA 9주, MRCNS 16주 그리고 MSCNS 또는 기타 세균 11주는 rapid kit 및 직접 coagulase 검사 중 1개 또는 2개 모두 음성을 보였다. MRCNS 와 MSSA가 동시에 양성을 보인 11개의 검체 중 8개가 rapid kit 및 직접 coagulase 검사에서 양성을 보여 MRSA로 잘못 판정되었다(특이도, 82.98%)(Table 2). Methicillin 내성 staphylococci(MRSA 22, MRCNS 16, MRCNS 와 MSSA 11)는 49예 이었으며 이들 중 신속검사에서 46예가 양성을 보여 methicillin 내성 검출 예민도는 93.8%이었으며, methicillin 감수성 staphylococci (MSSA 11, MSCNS 9)가 분리된 20예는 모두 음성을 보였다(특이도,

Table 2. Detection of MRSA from nasal swabs of 69 healthcare workers by using PBP2a MRSA rapid kit and direct coagulase test

Classification by identification and cefoxitin disk susceptibility test (No.)	PBP2a MRSA Rapid kit and coagulase test	
	Positive	Negative
MRSA (22)	19	3
Non-MRSA* (47)	8	39
Total (69)	27	42
Sensitivity (%)		86.36
Specificity (%)		82.98
PPV (%)		70.37
NPV (%)		92.86

*Included MSSA, MRCNS, MSCNS and other bacteria

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

100%)(Table 3).

IV. 고 찰

한 대학병원 중환자실에 근무하는 의료인 69명의 비강 검체에서 PBP2a MRSA Rapid kit와 직접 coagulase 검사를 시행하여 간편하고 빠르게 MRSA 보균자를 검출하고자 실험을하여, 22명의 MRSA 보균자 중 19명이 검출되었으며(MRSA 검출 예민도 86.36%), MRSA 미 보균자 47명중 8명의 위 양성을 보였다(MRSA 검출 특이도 82.98%).

예비실험에서 PBP2a MRSA Rapid kit는 면역크로마토그래피 분석방법으로 고체 배지에서 분리된 균 집락보다 증균 배지에서 자란 균에서 명확한 결과를 보였으며

cefoxitin 포함 배지에서 2차 증균하였을 경우 더 명확한 결과를 보였다(자료 미제시). 따라서 본 실험은 모두 1차 증균 배지로 TSB를 사용하였고 cefoxitin 4 µg/mL를 첨가한 2차 증균 배지를 사용하였다. 한편 저자들의 이전 보고(Shin 등, 2009)에 의하면 그람양성 알균이 자란 혈액배양에서 4시간 배양에 의해 PBP2a MRSA Rapid kit는 94.4%의 예민도를 보였다. 그러나 비강에서 검사하였을 때는 검출률이 낮아 모든 실험은 8시간 동안 증균시켰다.

중환자실에 근무하는 의료인 69명 중 22명(31.88%)에서 MRSA를 보균하고 있었는데, Lee 등(2007)과 Ryoo 등(2007)이 중환자실 의료인의 비강에서 분리한 16.5%와 21.5%보다 높았으며, Ahn 등(2007)이 입원한 환자의 비강에서 분리한 29.9%와 유사하였다. 한편 29명(39.1%)에서 MRCNS를 보균하고 있어 MRS의 보균율은 71%를 보

Table 3. Detection of methicillin-resistance of staphylococci from the nasal swabs of 69 healthcare workers by PBP2a MRSA rapid kit

Methicillin susceptibility of staphylococci by cefoxitin disk test (No.)	PBP2a MRSA Rapid kit	
	Positive	Negative
MR (49)	46	3
MS (20)	0	20
Total (69)	46	23
Sensitivity (%)		93.8
Specificity (%)		100
PPV (%)		100
NPV (%)		87.0

Abbreviations: MR, methicillin resistant; MS, methicillin susceptible

였다. MRSA와 MRCNS를 보균한 49예 중 46예가 PBP2a MRSA Rapid kit 의해 검출되어 이 키트의 methicillin 내성의 검출률은 93.8%이었으며 methicillin 감수성 균주는 모두 음성을 보여 methicillin 내성균에 대한 특이도는 100%이었다. 그러나 PBP2a Rapid kit와 직접 coagulase 검사로 MRSA, MSSA, MRCNS, 기타의 경우로 구분하였을 때 다음과 같은 결과를 보였다. 우선 22개의 MRSA 중 PBP2a MRSA Rapid kit에 의해 20명이 검출되었으며, 20명 중 19명에서 직접 coagulase 검사에서 양성을 보여 신속키트 및 직접 coagulase 검사의 MRSA 검출 예민도는 86.36%이었다. 검출되지 못한 3검체는 MRSA와 non-MRSA가 섞여 관찰되었고, MRSA 균수가 상대적으로 적었기 때문으로 사료되었다. 한편 전비강에서 MRCNS와 MSSA를 동시에 보균하게 될 경우 *mecA* 유전자와 *S. aureus* 특이 유전자(*nuc*, *femA* 등)을 동시에 검출하는 분자생물학적 방법에서도 위양성을 보일 수 있는데 (Becker 등, 2006) 11명에서 MRCNS와 MSSA를 동시에 보균하고 있었으며 이중 8명에서 PBP2a MRSA Rapid 검사와 coagulase 검사에서 양성을 보여 MRSA의 양성예측도가 70.37%(8/27)로 감소하게 되었다.

그러나 MSSA와 MRCNS가 있는 20명은 PBP2a 검사에서 모두 음성을 보였다(음성예측도 92.86%). 한편 비강내 MRSA의 보균율이 낮은 경우(유병률이 낮은 경우) 양성예측도가 낮게 되는데, 실제로 Becker 등(2006)은 분자생물학적 방법으로 비강 내 MRSA 보균자를 검출할 때 낮은 MRSA 보균율과 MRCNS와 MSSA가 동시에 존재하여 양성예측도가 39.3%(예민도, 99%, 특이도 96%)를 보였다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 MRSA 보균율이 31.88%이어서 양성 예측도가 Becker 등(2006)보다 높았을 가능성이 있다.

한편 PBP2a MRSA Rapid 검사 및 직접 coagulase 검사는 MRCNS와 MSSA가 동시에 존재하는 가능성이 적은 임상검체(혈액배양, 관절액배양 등)에서 유리할 수 있으나(Shin 등, 2009), 비강 검체나 귀농액에서는 MRCNS와 MSSA 균이 동시에 존재하는 경우가 많아 위양성을 보일 가능성이 높을 것이다. 따라서 이들 검체를 oxacillin 또는 cefoxitin 등을 첨가한 1차 증균 배지를 사용하여 methicillin 감수성 균의 증식을 억제시키면 MRCNS와 MSSA가 동시에 존재하는 경우에 어느 정도 유용할 것으

로 생각된다.

결론적으로 PBP2a MRSA Rapid kit는 전비강에서 MRSA의 검출에 우수한 예민도를 보였으나, MRCNS와 MSSA가 동시 존재하는 경우가 많아 양성 예측률은 낮았다. 그러나 MR-staphylococci를 검출하는 능력은 매우 우수하였다. 앞으로 전비강을 포함하여 정상군무리가 존재하는 검체에서 더 많은 수의 검체와 항균제를 첨가한 1차 증균배지를 사용하여 추가적인 평가가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ahn DH, Kim MN, Sung HS, Jun HS, Park SJ. Evaluation of MRSASelect for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance specimens. *Korean J Nosocomial Infect Control* 12:28-35, 2007.
2. Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Fiedrich A.W, Kipp F. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant Coagulase-negative Staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? *J Clin Microbiol* 44:229-231, 2006.
3. Bennett K, Sharp SE. Rapid differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from blood cultures by use of a direct cefoxitin disk diffusion test. *J Clin Microbiol* 46:3836-3838, 2008.
4. Cassandra D, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 36:131-139, 2003.
5. Chaix C, Durand-Zaaleski I, Alberti C, Burn-Buisson C. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in anintensive care unit. *JAMA* 282:1745-1751, 1999.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute

- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S19, Wayne, Pa, 2009.
7. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36(1):53-59, 2003.
 8. Harbath SO, Rutschmann O, Sudre P, Pittet D. Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 158:182-189, 1998.
 9. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 42:1875-1884, 2004.
 10. Kluytmans J, van Griethuysen A, Williamse P, van Keuken P. Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 40:2480-2482, 2002.
 11. Lee SO, Ryoo JH, Kwon YM, Park YJ, Han KJ. The investigation of surveillance culture for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the nasal cavity of the patient at intensive care unit and the medical staffs. *Korean J Clin Microbiol* 10(S1):S84, 2007.
 12. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE et al. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 40:2786-2790, 2002.
 13. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley ALJ, Nicholson A, Gould FK. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 42:4519-4523, 2004.
 14. Rubinovitch B, Pittet D. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? *J Hosp Infect* 47:9-18, 2001.
 15. Ryoo NH, Choi SI, Ryu SY, Ha JS, Jeon DS, Kim JR. Prevalence and epidemiological evaluations of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital staffs. *Korean J Clin Microbiol* 10(S1):S83, 2007.
 16. Sewell DL, Potter SA, Jacobson CM, Strausbaugh LJ, Ward TT. Sensitivity of surveillance cultures for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a nursing-home-care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17:53-56, 1993.
 17. Shin KS, Song HG, Kim JW, Roh KH, Kim JM, Koo SH et al. Development and evaluation of EZ-Step MRSA PBP2a rapid Kit for rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens. *Korean Soc Lab Med* 50th Congress P-MB-39, 2009.
 18. Stratidis J, Bia F, Edberg S. Use of real-time polymerase chain reaction for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58:199-202, 2007.