

V. 유행(Outbreak) 감시와 배양검사-MRSA, VRE, CRE

1. 유행(outbreak)

일정지역 내에서 일정기간 동안 질병 발생이 기대수준 이상으로 증가하는 것을 말한다.

1) 감염발생의 증가: 부위별, 군주별 2~3배 증가(예: MRSA에 의한 SSI 유행)

2) 드물게 발생하는 감염: 단 한 건 발생해도 유행발생으로 간주한다.

예: Botulism, 새로 발견된 다제내성균 감염 등

3) Endemic: 토착화, 대부분의 병원감염

2. 유행조사의 목적

감염 전파의 증거를 확인하고 이에 따른 위험요인 확인, 적절한 감염관리 방법 등을 도입하여 유행을 종결하고 재발을 예방하는데 있다.

1) 유행발생의 원인(1)

(1) Products (22%): 내부적, 외부적, 미생물이나 미생물의 독소에 의한 오염

(2) Procedures (13%): GI endoscopy, Bronchoscopy, Hemodialysis, Peritoneal dialysis

(3) Devices (11%): 부적절한 세척, 소독, 자동세척, 소독기에 의한 내시경 오염, 멸균기구의 부적절한 handling

2) 유행발생의 원인(2)

(1) Toxin other organism (18%)

(2) Fungi (9%)

(3) Virus (8%)

(4) Mycobacteria (4%)

3) 유행조사 감시배양

(1) 선택 또는 감별배지를 사용 한다: 민감도를 높이고 업무량을 줄일 수 있다.

(2) 증균 배지 사용: 특정 병원감염균 검출의 민감도를 높인다.

(3) 보균자를 찾기 위한 특수 배양 실시

(4) Cross contamination의 매개체를 찾기 위한 특수한 환경배양

4) 병원 근무자의 배양

- (1) 역학적으로 병원근무자가 병원감염균의 전파에 기여했다는 증거가 있을 때만 실시
- (2) 보균자 검사
- (3) 손: 가장 중요한 전파경로로 액체배지 배양 또는 손바닥 모양 배지를 이용한다.

표 1. 감시배양 균주의 임상검체

균 주	임상 검체	기 타
<i>S. aureus</i> (MRSA)	Anterior nares, decubiti (욕창) surgical wound, hands	
<i>Enterococcus</i> spp. (VRE)	Rectal or stool	
<i>S. pyogenes</i> (gr. A streptococci)	Oropharynx or rectal	
<i>S. agalactiae</i> (gr. B streptococci)	Vagina or rectal	
Enteric bacilli (<i>Salmonella</i> spp.)	Stool or rectal	
<i>C. difficile</i>	Stool or rectal	*Toxin assay (asymptomatic carriage)
Enteric virus	Stool	

3. 유행조사

1) 잠재적인 유행의 인지

- (1) Small outbreak: cluster
- (2) Psedo outbreak: 실제 임상 질환은 없으나 실험 결과 상 증가
- (3) Surveillance를 하고 있는 병동에서 유행이 발생하는 것이 아님
->근무 직원, 감염관리실 모두 참여

4. 유행조사 절차

- 1) 문제 발생 시 유행을 확인한다.
- 2) 사례조사: Line listing, 분리된 미생물들의 항균제감수성 결과 등을 비교한다.
- 3) 가설설정: Target 설정
- 4) 문헌고찰(www.outbreak-database.com)
- 5) 감시배양 범위 결정: 환자, 환경 및 의료진을 대상으로 감시배양을 한다.
- 6) 감시 및 개선활동
- 7) 연관성 규명: Genotypic (molecular) method, PFGE (Pulsed gel Electrophoresis)

5. Screening test

1) MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)

병원감염을 일으키는 주요 내성균, Cephalosporin과 penicillin계 항균제에 전부 내성

- Methicillin 내성기전

MRSA가 가진 *mecA* 유전자는 항균제가 부착할 수 없는 PBP2a (penicillin binding protein 2a)를 생성하기 때문

• MRSA 판정기준

-항균제 감수성 시험에서 oxacillin/cefoxitin에 내성인 경우

-분자유전학적 검사상 *mecA* 유전자가 검출된 경우

(1) 검체 채취: Anterior nares

(2) 선택 증균: BHI broth + Vancomycin (6 µg/ml), 18~24 hr 37°C 5% CO₂

(3) 선택 배양: MSA: mannitol salt agar + oxacillin (6 µg/ml)

MRSA Chrom Agar, 18~24 hr 37°C CO₂-free

Identification, MIC test

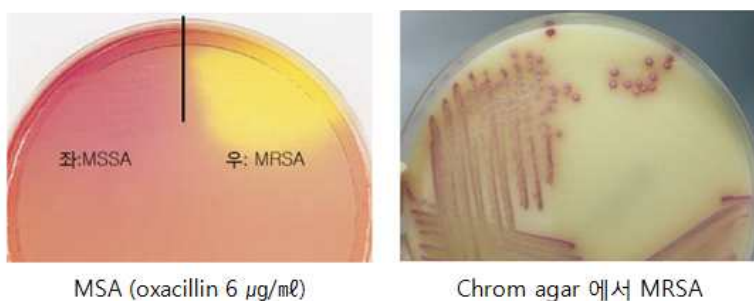


그림 1. MSA 배지(좌): MRSA, Chrom Agar (우)에서 배양된 MRSA (출처: blog.naver.com/mmrkang).

2) VRE Screening test

(1) 검체 채취: Rectal swab

(2) 선택 증균: BHI broth + vancomycin (6 µg/ml), 18~24 hr 35°C

(3) 선택 배양: Enterococcal broth 혹은 Enterococcal agar + vancomycin (6 µg/ml) 35°C 24 hr

->배지가 검은색으로 보이면 VRE로 잠정동정

->VRE Chrom Agar, 18~24 hr 35°C CO₂-free

Identification, MIC test 혹은 유전자검사로 확인(van A, van B)

* Enterococcal broth 와 Enterococcal agar에서 VRE (검은색)

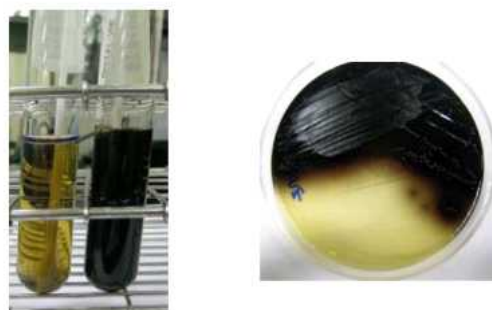


그림 2. 선택 배지에서 자란 VRE

* VRE Chrom 배지 판독 시 주의사항

- VRE Chrom agar에서 *E. faecium*과 *Pediococcus* 는 집락 색깔로 구분이 불가능

* 균종별 유의사항

Enterococcus casseliflavus/gallinarum 은 Genotype Van C 에 해당되므로 감염관리 대상이 아님.



E. faecalis

E. faecium

Pediococcus

그림 3. Chrom Agar에서 배양된 *Enterococcus* spp.와 *Pediococcus* (출처: blog.naver.com/mmrkang).

3) CRE screening test

(1) CRE 선별검사 대상

CRE 선별대상에 대해서는 “카바페넴내성장내세균목균종(CRE) 관리지침” 편 참조

(2) 검체 채취: Rectal swab, stool

(3) 선택 증균: MAC broth + Meropenem (10 µg/ml), 37°C 18~24 hr

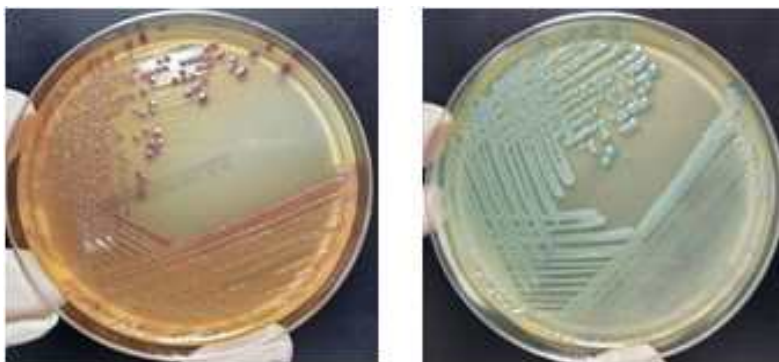
(4) 선택 배양: MacConkey Agar, 37°C, 18~24 hr

CRE Chrom agar Reading (Pink-red, colonies)

Identification, MIC test (자동화 장비를 사용)

* CARBA Chrom agar: 카바페네마아제를 생성하는 장내세균목균종의 감별에 이용되는 색소배지

- ChromID CARBA agar 배양된 *E. coli* (좌) 와 *K. pneumoniae* (우)-(주)비오메리오 제품.



E. coli (pink /burgundy) KPN (blue green)

- C-CARBA agar에서 배양된 *E. coli* (좌) 와 *K. pneumoniae* (우)-(주)BANDIO 제품.



E. coli (pink to mauve)

KPN (metallic blue)

그림 4. CARBA agar에서 배양된 *E. coli* (좌) 와 *K. pneumoniae* (우) (출처: blog.naver.com/mmrkang).

* ChromID CARBA agar의 집락 판독 시 유의 사항

- 일부 vancomycin 내성 *E. faecium* 청록색의 작은 집락형성
- 일부 다제내성 *Pseudomonas* 균주: 갈색색소 집락형성



E. faecium (VRE)



P. aeruginosa

그림 5. ChromID CARBA agar에서 배양된 VRE (좌)와 *P. aeruginosa* (우) (출처: blog.naver.com/mmrkang).

* 약제감수성 검사(MIC, Disk diffusion)에서 CPE 선별

- *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp.
->시험한 carbapenem 제 중 한 가지 이상의 약제에 중간 또는 내성을 보일 때
- *Proteus* spp., *M. morganii*, *Providencia* spp.
->시험한 carbapenem 제 중 Imipenem을 제외한 약제 중 한 가지 이상의 약제에 중간 또는 내성을 보일 때

(5) CPE 확인

* Carb NP test, eCIM, mCIM 유전자 검사 등 의료기관에 적합한 검사를 선택해서 시행한다.

- Carb NP test: 유전자형 구별은 불가

* 선별시험 양성인 경우, NDM-1, KPC, VIM type, IMP type등에 대한 유전자검사를 시행하여 유전자형을 확인한다.

* 유전자형 검사는 질병관리청 홈페이지를 통해 각 지역의 보건환경연구원으로 의뢰가 가능하다.
->의뢰 방법은 "카바페넴내성장내세균목균종(CRE)관리지침" 참조

6. Carbapenemase producing *Enterobacterales* (CPE) 검출시험

표 2. Carbapenemase 검출시험(CLSI M100 Ed31E-Tables 3B and 3C)

	Carba NP	mCIM*	mCIM with eCIM**	Other(eg. molecular)
대상균주	하나 이상의 Carbapenem에 내성인 <i>Enterobacterales</i> , <i>P. aeruginosa</i>		mCIM 양성인 <i>Enterobacterales</i>	하나 이상의 Carbapenem에 내성인 <i>Enterobacterales</i> , <i>P. aeruginosa</i> 에서 carbapenemase 존재 여부를 확인하거나 Carba NP, mCIM에 양성인 균주의 carbapenemase 종류를 확인하기 위한검사
검사장점	신속검사법	특정시약이나 배지가 필요 없다.	특정시약이나 배지가 필요 없다.	Carbapenemase의 존재 및 종류확인
검사항계	사용기한이 짧은 시약을 자가 제조해야 함 Invalid result가 일부 세균에 있으며 특정 종류의 carbapenemase (Chromosome에 코딩된 OXA-type)은 일관되게 검출되지 않음	검사소요시간 : over night incubation	검사소요시간 : over night incubation	특정 검사시약과 기기필요, 타깃유전자를 가진 경우에만 검출되며, 그 밖의 유전자를 가진 경우 위음성으로 보고됨

* : modified carbapenem inactivation method, ** : EDTA-modified carbapenem inactivation method

A. Carba NP test (CLSI M100 Ed31E-Tables 3B)

1) Carbapenemase Production (KPC, NDM-1, VIM, IMP, SPM, SME-type)

2) 대상 균주: *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*

Acinetobacter spp. - 2018년 CLSI에서 삭제(민감도 21.3%)

3) Test method: Colorimetric microtube assay

- Detected by change in pH of indicator (red to yellow/orange)

4) 검출시간: 2 hr

5) Material/Reagent

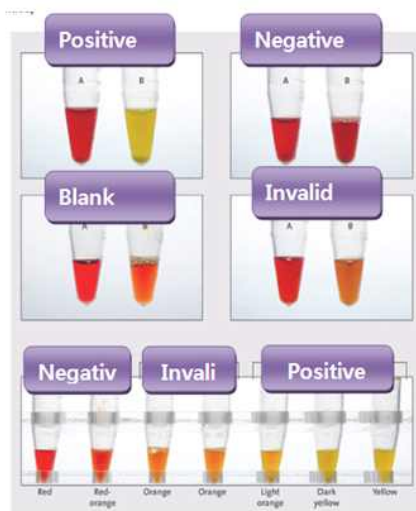
- 10 mM Zinc sulfate heptahydrate sol.
- 0.5% Phenol red solution
- 0.1 N NaOH
- Carba NP Solution A (phenol red + zinc solutions)
- Carba NP Solution B (Carba NP Solution A + 6 mg/mL imipenem)

6) 검사방법

- (1) microcentrifuge tubes를 준비하여 patient, QC 검체를 위해 각각 a, b 라벨을 하고, uninoculated reagent control tube (a, b)도 준비한다.
- (2) 각각의 tube에 100 μ l of bacteria protein extraction reagent을 분주한다.
- (3) Blood agar 에서 하룻밤 배양된 검체를 1 μ l loopful를 이용하여 각각 a. b tube에만 넣어서 5초간 vortex 한다.
- (4) A sol. 100 μ l 을 a tube에 넣고, B sol. 100 μ l 을 b tube에 넣는다.
- (5) Vortex를 이용하여 Tube의 내용물들을 잘 섞는다.
- (6) 35°C \pm 2°C, 대기환경에서 2시간 동안 배양한다.

7) 결과 판독 및 QC (그림 7. CLSI M100 Ed31E-Tables 3B and 3B-1)

Tube "a" Solution A (serves as internal control)	Tube "b" Solution B	Interpretation
Red or red-orange	Red or red-orange	Negative, no carbapenemase detected
Red or red-orange	Light orange, dark yellow, or yellow	Positive, carbapenemase detected
Red or red-orange	Orange	Invalid
Red or light orange, dark Yellow, or yellow	Any color	Invalid



8) 상품화된 kit를 사용하여 검사하면 편리하다.

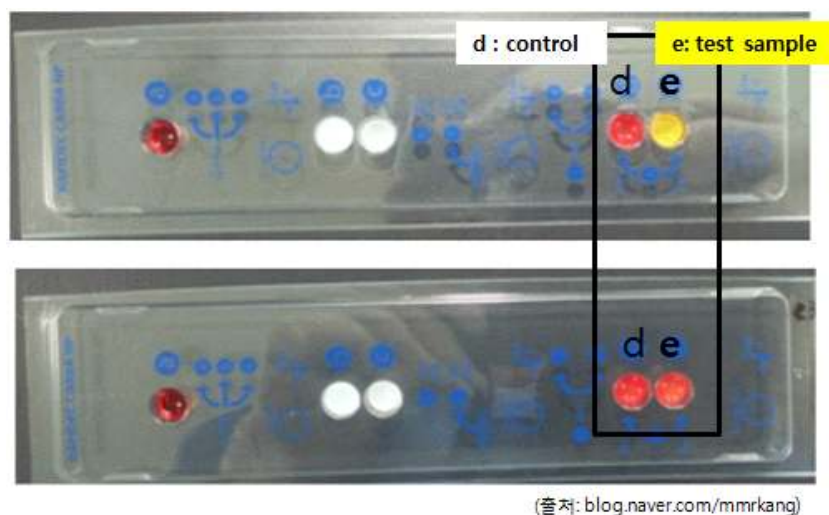


그림 6. 상품화된 Carba NP test kit. 위(yellow): Positive, 아래(red): Negative (주)비오메리의 제품.

* Carba NP test 주의사항

(1) MacConkey agar에서 배양된 균주는 시험균주로 부적합하다.

* 일반적으로 BAP에서 24시간 배양된 균주로 실험한다.

(2) CRE로 확인된 경우 신속하게 CPE 확인을 위한 검사이지만 유전자 타입 확인은 불가능 하다.

※ 유전자 타입은 감염관리나 역학조사 목적으로만 검사하고 Routine 검사법으로 권장하지 않는다.

B. mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method)

1) 최근 Carbapenemase 생성 장내세균 검출빈도가 높아짐에 따라 기존 CLSI M100에서 권장 되었던 Carba NP 검사법과 Carbapenemase phenotype 검출 민감도를 높이기 위한 mCIM 검사가 새롭게 소개되었다(CLSI M100-S27, Table 3B~D).

2) 검사기준

- (1) Carbapenem계 약제 중 1개 또는 2개 이상의 약제에서 중등도 내성(intermediate) MIC 이상 값을 보이는 장내세균목과 *P. aeruginosa* 한하여 진행한다.
- (2) Imipenem/Meropenem MIC 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ertapenem MIC 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상일 경우에 시행한다.
- (3) 감염관리나 역학조사 시에 진행하고 Routine 검사법으로 권장하지 않는다.

3) 검사원리: Meropenem disk Inactivation

4) mCIM 검사 방법(그림 7)

- (1) BAP에서 하룻밤 배양시킨 검사 대상 균주를 loop로 1회 취하여 TSB (액체배지) 2 ml 에 접종 후, 10~15초 vortexing 한다(장내세균: 1 μ l loop, *P. aeruginosa*: 10 μ l loop).
- (2) 10 μ g Meropenem disk를 대상 균주가 접종된 TSB 배지에 넣는다.
- (3) 35°C(\pm 2°C) 온도에서 4시간 동안(\pm 15분) 배양 한다.
- (4) 4시간 후, *E. coli* ATCC 25922 균주를 영양배지 또는 saline에 0.5 McF가 되도록 접종하여 disk diffusion 방법과 동일하게 MHA 배지에 접종한다(3회면).
- (5) MHA는 3~10분 동안 실온에서 건조 시킨다.
- (6) 대상균주가 접종된 TSB 배지에서 배양시킨 Meropenem disk를 10 μ l loop를 이용하여 *E. coli* ATCC 25922 균주가 접종된 MHA 배지에 올려준다.
- (7) 35°C(\pm 2°C) 온도의 산소 환경에서 18~24시간 배양 후, 결과를 판독한다(그림 8).

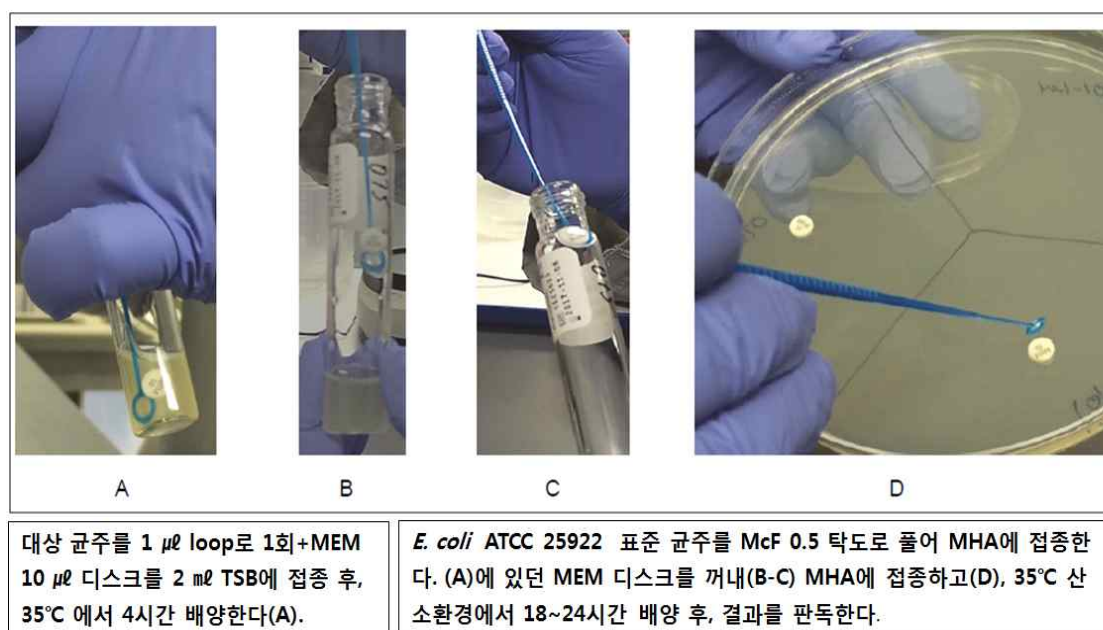


그림 7. CLSI M100 Ed31E-Tables 3C and 3C-1, mCIM test.

5. 검사 결과 판독 및 해석(그림 8. CLSI M100 Ed31E-Tables 3C)

1) 정도관리 균주 결과 판독



- A: Negative control *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706
- B: Positive control *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705

2) 대상균주 결과 판독



C. eCIM (EDTA Carbapenem Inactivation Method)

- 1) mCIM 양성균주의 경우, 장내세균에서만 선택적으로 검사를 시행한다.
- 2) mCIM 양성으로 확인된 균주를 미리 EDTA가 첨가된 튜브에서 Meropenem과 반응시킨 후, 항균제 분해능을 감수성 균주로 확인하는 방법이다.
- 3) 검사목적

Serin Carbapenemase (Class A, D)와 metallo β -lactamase (Class B)를 구분하여 항균제 사용에 도움을 주기 위한 검사이다.

- MBLs 은 Ceftazidime-avibactam, Meropenem-avibactam, Imipenem-avibactam 에 효과가 없다.

4) 검사방법(그림 9)

- (1) mCIM 양성으로 확인된 대상균주를 1 μ l loop로 1회 취하여 0.5M EDTA 20 μ l가 첨가된 2 ml TSB (액체배지)에 접종한다(EDTA의 최종농도 5 mM).
- (2) 10 μ g Meropenem disk 를 대상균주가 접종된 TSB 배지에 넣는다.
- (3) 35°C(\pm 2°C) 온도에서 4시간 동안(\pm 15분) 배양한다.
- (4) *E. coli* ATCC 25922 균주를 영양배지 또는 saline에 0.5 McF가 되도록 접종하여 disk diffusion 방법과 동일하게 MHA배지에 접종한다(3회면).
- (5) MHA배지는 3~10분 동안 실온에서 건조시킨다.
- (6) 4시간 후, TSB배지에 접종되었던 Meropenem disk를 10 μ l loop를 취하여 *E. coli* ATCC 25922 균주가 접종된 MHA 배지에 올려준다.
- (7) 35°C(\pm 2°C) 온도의 산소환경에서 18~24시간 배양 후, 결과를 판독한다(그림 10).

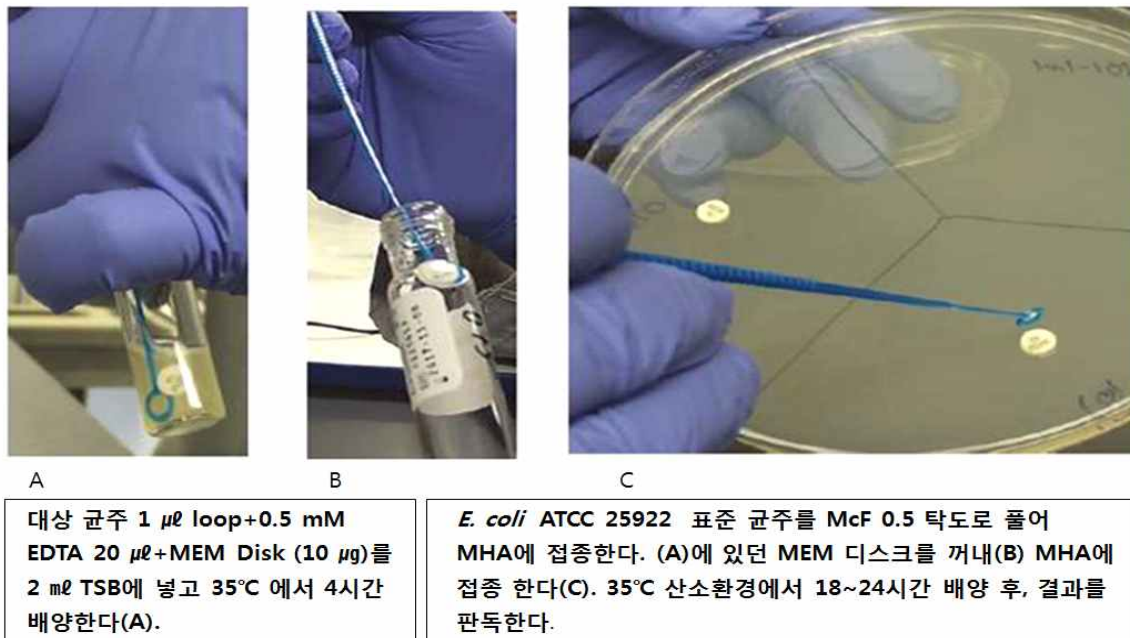
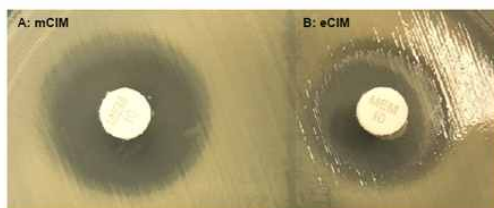


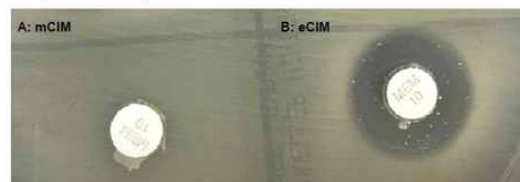
그림 9. CLSI M100 Ed 28E-eCIM test.

5) 검사결과 판독 및 해석(그림 10. CLSI M100 Ed31E-Tables 3C)

① mCIM: negative, eCIM: invalid result

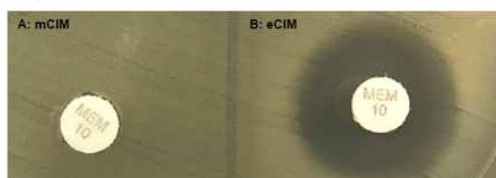


② Result: positive mCIM and eCIM



- A: mCIM-양성(6 mm 직경), B: eCIM: 양성 (15 mm 직경: pinpoint colonies)
- 보고방법: metallo- β -lactamase detected

③ Result: positive mCIM and eCIM



- A: mCIM: 양성(6 mm 직경)
- B: eCIM: 양성(19 mm 직경)
- 보고방법: metallo- β -lactamase detected

④ Result: positive mCIM and negative CIM



- A: mCIM: 양성(6 mm 직경)
- B: eCIM: 음성(6 mm 직경)
- 보고방법: serine carbapenemase detected

D. NG[®]-test CARBA (상품화 kit)

1. 장점

카바페넴 비감수성 콜로니에서 일반적으로 알려진 5가지 카바페네마제(KPC, OXA-48 유사, VIM, IMP 및 NDM)를 다중 면역크로마토그래피 분석법을 이용하여 정성적으로 빠르게 검출할 수 있는 검사법이다.

표 3. Comparison of the main features of three carbapenemase detection methods

Parameter	NG-Test CARBA 5	mCIM/eCIM	Xpert [®] CARBA R
검체	균 집락, 혈액배양액	균 집락	균 집락, rectal swabs
비용	Moderate	Low	High
특별한 검사장비	No	No	Yes
간편성	Simple	Moderate	Simple
검사 소요시간	15 min	18-24 hr	1 hr
결과해석	Simple	Moderate	Simple
측정 카바페네마제	KPC, NDM, VIM, IMP OXA-48-like	Serine cabapenemase MBL	KPC, NDM, VIM, IMP OXA-48-like

Abbreviations: KPC, *K. pneumoniae* Carbapenemase; NDM, new Delhi metallo-β-lactamase; VIM, verona integron-encoded metallo-beta-lactamase; IMP, imipenemase; OXA, Oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamase.

2. 대상균주

카바페네마제를 생성하는 장내세균목균종(*E. coli*, *K. pneumoniae* 포함) 및 *P. aeruginosa*

3. 검사방법

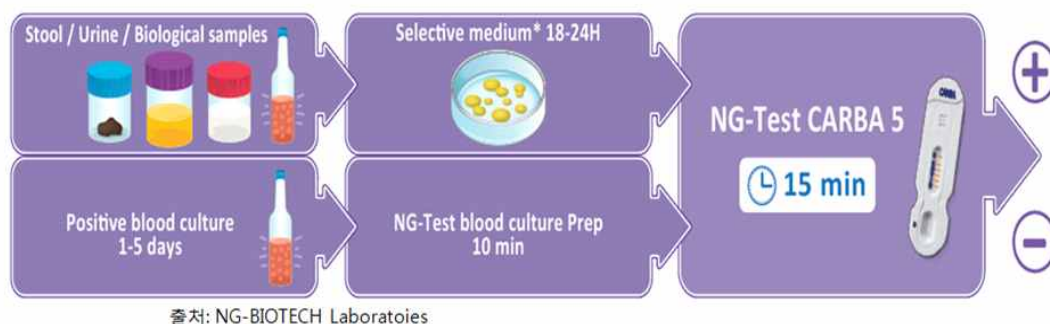
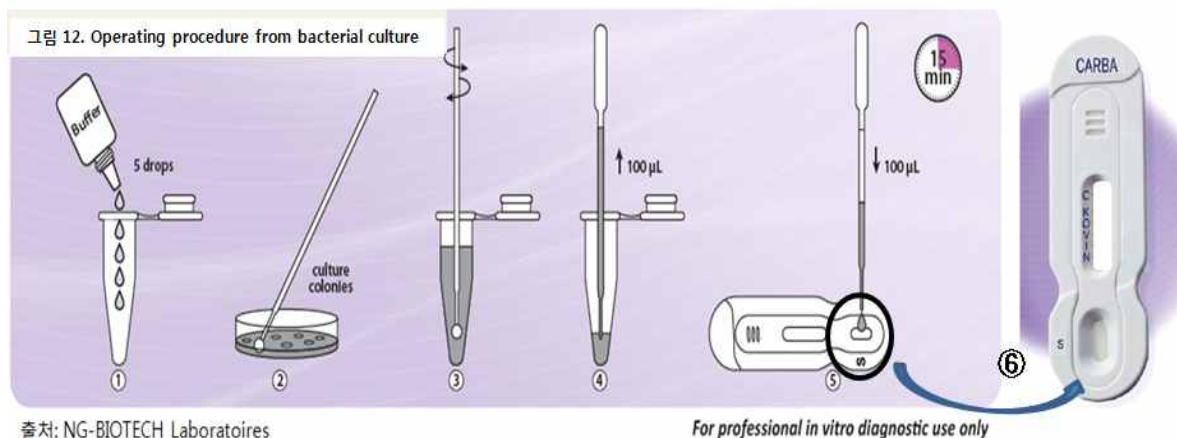


그림 11. Identification process from bacterial culture or direct blood culture

* 선택배지: BAP, MacConkey agar, TSA, Mueller Hinton, ChromID[®] CARBA, CHROMagar, etc.

1) 검체 준비 및 검사

- (1) 키트에 제공된 마이크로튜브에 추출 버퍼 5방울($150\ \mu\text{L}$)을 떨어뜨린다.
- (2) 배지에 배양된 집락을 루프로 3개 정도 터치한 다음 $150\ \mu\text{L}$ 의 추출 버퍼가 들어 있는 마이크로튜브에 잘 푼다.
- (3) 마이크로튜브를 닫고, 사용하기 전에 혼합물을 균질화하기 위해 vortex mixing 한다.
※ 점액질이 높은 집락은 점액성분을 균질화시키기 위해 3분정도 vortex mixing 후, 실온에서 10분 동안 배양한다.
- (4) 포장된 파우치를 개봉하여 인적사항을 적고 제공된 피펫으로 $100\ \mu\text{L}$ 를 취해서 파우치의 S라고 표시된 홀에 분주 한다(그림 12의 ⑥번).
- (5) 정확하게 15분 후 결과를 판독한다.



* ⑥ 번 그림은 편집자가 검체 분주 시 이해도를 돕기 위해 삽입한 그림이다.

4. 결과 판독

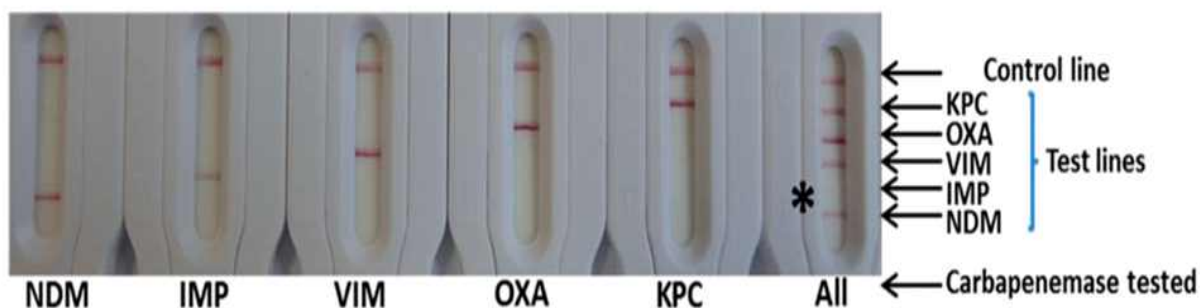
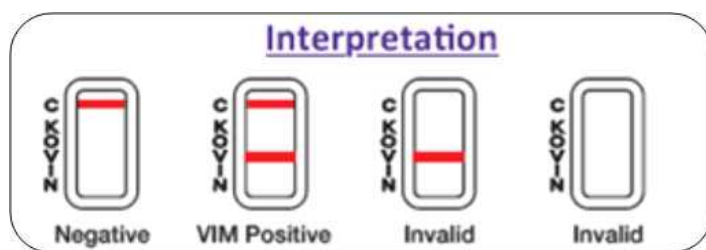


그림 13. Data acquisition using a handheld reader (출처: j Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkx521)

5. 결과 판독 시 주의사항



* 결과 판정 시 K, O, V, I, N 위치에 있는 여러 선 또는 한 선은 양성 결과로 간주한다.

참고문헌

1. 질병관리청. 2021 의료관련감염병 관리지침(의료관련감염병 표본감시), 2021.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI M100-S28. Wayne; PA:2018).
3. 대한임상미생물검사학회. 미생물전문임상병리사 교육자료(Vol 2), 항균제 감수성방법론, 2019.
4. Herve' Boutal et al., A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkx521.
5. Ying Zhu et al., Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis, Ann Transl Med 2021; 9(9):769. | <http://dx.doi.org/10.21037/atm-20-8216>.