

미국 NCCLS의 새 기준(1999년)에 의한 Coagulase Negative Staphylococcus 균종의 항생제 감수성검사와 *mecA* 유전자 검출의 비교

남명현, 우희연, 이장호, 이남용

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 임상병리과학교실

Comparison of *mecA* Gene Detection with Susceptibility Testing Methods in Coagulase Negative Staphylococcus According to the New NCCLS Guidelines(1999)

Myung Hyun Nam, M.D., Hee Yeon Woo, M.D., Jang Ho Lee, M.T.
and Nam Yong Lee, M.D.

Department of Clinical Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine,
Seoul, Korea

Background : Coagulase negative staphylococcus (CNS) spp. is a major pathogenic organism of nosocomial and community-acquired urinary tract infections, and causes infections in the immunocompromised host, and, in particular, bloodstream infections in patients with indwelling devices. High prevalence of methicillin resistance has been noticed in CNS which also have been recognized as an important multidrug resistant pathogen. The optimal phenotypic method for detecting methicillin resistance still remains controversial, and new guidelines for detecting methicillin resistance of CNS was proposed by NCCLS in January 1999. We evaluated the relationship between *mecA* gene by PCR method and antimicrobial susceptibility tests according to the new NCCLS guidelines.

Methods : A total of 82 CNS isolates were examined for oxacillin MICs and penicillin MICs by disk diffusion and agar dilution method according to NCCLS guidelines, and detection of *mecA* gene by PCR.

Results : In disk diffusion method, 66 strains (80.5%) and 63 strains (76.8%) showed resistance to penicillin and oxacillin, respectively, and in agar dilution method, 71 strains (86.6%) and 53 strains (64.6%), respectively. In PCR method, *mecA* genes were detected in 49 strains (59.8%). Comparing with *mecA* gene detection by PCR method, the sensitivity of disk diffusion and agar dilution method was 95.8% and 89.8%, respectively. However, the sensitivity of disk diffusion and agar dilution method was 65.3% and 75.5%, respectively using previous NCCLS criteria.

Conclusion : The new criteria of NCCLS detects the methicillin resistance induced by *mecA* gene more sensitively than the previous one.

Key words : Coagulase negative staphylococcus, methicillin resistance, 1999 NCCLS criteria, *mecA* gene

원 본 접 수 : 2000년 1월 22일
수정본접수 : 2000년 2월 29일
교 신 저 자 : 이 남 용

접수번호 : CM 3-1-9

서 론

(135-710) 서울시 강남구 일원동 50
성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 임상병리과학교실
Tel : (02) 3410-2706 Fax : (02) 3410-2719
E-mail: mrmicro@samsung.co.kr

Coagulase negative staphylococcus (CNS)는 요로 감염의 주 원인균이며 체내 유치물(indwelling device)에 의한 감염과 면역이 저하된 환자에게 균혈증을 일으키는 원인균으로 보고되고 있다. 특히, methicillin에 내성을

Table 1. Revised NCCLS criteria for the determination of methicillin susceptibility of CNS (NCCLS M100-S9, January 1999)

	Antimicrobial agent	Disk content	Disk diffusion		Agar dilution	
			R	S	R	S
Previous	Methicillin or Oxacillin	5 µg 1 µg				
					(MHA supplemented with 2% NaCl, µg/mL)	
1999. 1. Revised	Oxacillin	1 µg	≤17	≥18	≥0.5	≤0.25

Abbreviations : MHA, Muller-Hinton agar; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible

보이는 균주는 다른 항생제에도 내성을 보이는 다제 내성균일 경우가 많아 임상적으로 중요성이 높다. 미국의 통계를 보면 병원에서 분리된 CNS 균주의 약 75%가 methicillin에 내성을 보였다고 보고되고 있고 [1], 이들은 vancomycin으로 치료되고 있었다. 본원에서 1997년부터 32개월간의 자료를 조사한 결과 CNS의 73.0%가 methicillin에 내성을 보였다.

CNS의 methicillin 내성기전은 *Staphylococcus aureus*와 유사한 것으로 추정되고 있으며 [2], *mecA* 내성유전자에 의해 유도되는 페니실린에 저항성을 보이는 페니실린 결합단백2a (PBP2a)의 생성이 주 내성기전이고, 그 밖의 내성기전으로는 beta-lactamase의 과량 생성, methicillin에 대한 페니실린 결합단백의 친화성이 감소된 변이균주, 성장 속도가 늦어 항생제의 침투가 감소하는 소집락 변이균주(small colony variants, SCV) 등이 생각되어지고 있다.

CNS의 methicillin 내성을 검출하기 위한 방법은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서 제시하는 기준이 있으나 가장 적절한 방법은 아직 논란이 되고 있고, 이와 같은 배경에서 1999년 1월에 NCCLS는 CNS의 methicillin 내성 검출에 대한 새 기준을 제시하였다 [3] (Table 1). 본 연구에서는 임상 검체에서 분리된 CNS 82 균주에 대하여 NCCLS에서 새로 제시한 기준에 따른 디스크 확산법과 한천 희석법에 의한 항생제 감수성검사와 *mecA* 유전자에 대한 polymerase chain reaction (PCR) 결과를 비교하였다.

방 법

1. 대상 균주

1999년 6월부터 9월까지 4개월간 삼성서울병원에서 임상 검체에서 분리된 CNS 82균주를 대상으로 하였다. 세균의 동정은 전통적인 방법 [4]에 따랐으며, 필요한 경우에는 Vitek GPI card (bioMerieux, Hazelwood, Mo., USA)로 동정을 확인하였다.

2. 디스크 확산법

NCCLS의 방법 [5]에 준하여 시행하였고 24시간 배양 후 억제대가 18mm 이상이면 감수성, 17mm 이하이면 내성으로 판정하였다.

3. 한천 희석법을 이용한 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

NCCLS의 방법 [6]에 준하여 penicillin G는 16-20시간, oxacillin은 24시간 배양 후 세균증식이 없는 최소 농도를 MIC로 하였다. 정도 판리를 위해 *S. aureus* ATCC 29212의 감수성 검사를 동시에 시행하였다.

4. PCR에 의한 내성 유전자형 판별

혈액한천배지나 Muller-Hinton 한천배지에서 18-24시간 배양시킨 균집락을 400 µL의 TE 완충액(10 mm Tris, 1mm EDTA, pH 8.0)에 포화될 정도로 풀어 섞은 후 96℃에서 10분간 가열한 다음, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액의 DNA를 얻었다. Primer로는 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'와 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'을 사용하였다. 추출된 주형 DNA 1 µL에 10X 반응완충액 5 µL, 200 µM dNTP 5 µL, 각 primer 쌍(10 pmol/µL) 2 µL를 넣고 Taq DNA polymerase (5 U/µL, Boehringer Mannheim, Germany) 0.5 µL, 증류수 10.5 µL를 넣어 총 PCR 혼합액이 30µL가 되도록 한 후 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 증폭시켰다. 반응조건은 94℃에서 1분간 변성(denaturation)시키고 55℃에서 30초간 결합(annealing)시킨 후 72℃에서 1분 30초간 중합(elongation)시키는 cycle을 총 40회 반복하여 DNA를 증폭시켰다. 증폭산물 10 µL를 DNA marker와 함께 1.3% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색해서 533 bp의 증폭 산물을 확인하였다. *mecA* 유전자 음성 대조 균주로는 *S. aureus* ATCC 29213을, 양성 대조 균주로는 *S. aureus* ATCC 44300을 사용하였다.

결 과

디스크 확산법에 의한 항생제 감수성검사 결과 penicillin 내성 (억제대: $\leq 28\text{mm}$)을 보인 균주는 66주 (80.5%), 감수성 (억제대: $\geq 29\text{mm}$)을 보인 균주는 16주 (19.5%)였고, oxacillin에 내성 (억제대: $\leq 17\text{mm}$)을 보인 균주는 63주 (76.8%), 감수성 (억제대: $\geq 18\text{mm}$)을 보인 균주는 18주 (23.2%)였다. 한천 회석법에 의한 항생제 감수성 검사 결과 penicillin 내성 (MIC: $\geq 0.25 \text{ g/mL}$)을 보인 균주는 71주 (86.6%), 감수성 (MIC: $\leq 0.12 \text{ g/mL}$)을 보인 균주는 11주 (13.4%)였고, oxacillin에 내성 (MIC: $\geq 0.5 \text{ g/mL}$)을 보인 균주는 53주

(64.6%), 감수성 (MIC: $\leq 0.25 \text{ g/mL}$)을 보인 균주는 29주 (35.4%)였다. PCR 방법에 의한 *mecA* 유전자 검출에서는 49주 (59.8%)가 양성을, 33주가 음성을 보였다 (Fig. 1). 디스크 확산법과 한천 회석법의 비교에서는 한천 회석법에서 oxacillin에 감수성으로 판정된 11개의 균주가 디스크 확산법에서는 내성으로 판정되었다 (Table 2).

PCR 방법에 의한 내성 유전자의 판별법과 항생제 감수성 검사법과의 불일치를 보인 것은 13 균주였는데, 이 중 PCR 방법에서는 양성이었으나 항생제 감수성 검사에서 감수성을 보인 것이 4 주였고, PCR 법에서는 음성이었으나 항생제 감수성 검사에서 내성으로 판정된 것이 9 주였다.

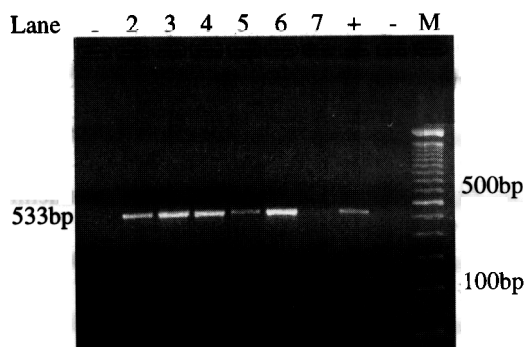


Figure 1. *mecA* gene detection by PCR method. Abbreviations : lane 1-7, isolates from clinical specimens; bp, base pair; +, positive control(*S. aureus* ATCC 44300); -, negative control(*S. aureus* ATCC 29213); M, size marker.

고 찰

CNS 균종은 과거에는 오염균으로 생각되어 임상적으로는 중요하지 않은 것으로 생각되었으나 최근 20년간 연구에 의하면 중요한 질병의 원인균으로 밝혀지고 있다[7]. CNS에 의한 감염증으로는 병원감염 혹은 지역사회 획득 요로 감염증, 체내 유치물에 의한 감염증, 면역저하 환자에서의 균혈증, 자연 혹은 인공판막 심내막염, 골수염 그리고 수술후 내안구염 등이 있다.

Methicillin에 내성을 보이는 CNS 균종은 보고자에 따라 차이가 있지만 병원내 분리된 CNS 균주의 75-80% 정도가 내성을 보인다고 보고되고 있다[1, 8, 9]. Methicillin에 감수성을 보이는 균주는 penicillinase-저항성 페니실린으로 치료하는 것이 원칙이나, 많은 임상

Table 2. Comparison between disk diffusion and agar dilution method for oxacillin(No. of isolates)

		Disk diffusion		Total
		Resistant	Susceptible	
Agar dilution	Resistant	52		53
	Susceptible	11	18	29
Total		63	19	82

Table 3. Comparison between oxacillin susceptibility test results and *mecA* gene detection by PCR(No. of isolates)

NCCLS Criteria		PCR		Sensitivity(%)
		Positive	Negative	
1999 criteria*	Disk diffusion	R	47	95.9
		S	16	
	Agar dilution	R	24	75.5
		S	5	
Previous criteria*	Disk diffusion	I	0	75.5
		R	17	
	Agar dilution	R	12	75.5
		S	37	

*Criteria for detecting methicillin resistance of CNS by NCCLS guidelines

Abbreviations : R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

의들은 methicillin에 대한 내성 판정을 위한 검사의 정확성에 의문을 가지고 있고 이 때문에 감수성을 보인 균주에 대해서도 vancomycin 으로 치료하는 경우가 많은 현실이어서 미국의 Centers for Disease Control (CDC)에서는 이러한 환자에서의 vancomycin 사용의 제한을 권고하고 있다[10].

CNS의 methicillin 내성의 유전적 기초, 발현 및 조절은 현재까지의 자료로는 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)의 그것과 유사할 것으로 생각된다[2]. Archer 등[11]의 연구에 의하면, 몇몇 MRSA의 *mecR1* 유전자의 삽입(insertion)과 결실(deletion)이 *Staphylococcus epidermidis*의 것과 동일함을 발견하였고, MRSA의 *mecA* 유전자와 *Staphylococcus sciuri* 염색체의 페니실린 결합단백 유전자 해석 부위가 88%의 동일성을 보였다는 보고도 있다[2].

CNS의 methicillin 내성 판정을 위한 방법으로는 액체배지 희석법(broth dilution), 한천 희석법(agar dilution), 한천 선별법(agar screening), Epsilonometer test (E-test), 디스크 확산법(disk diffusion), 상품화된 액체배지 미량희석법(API-Plus system, bioMerieux) 그리고 자동화된 장비를 이용한 방법 등이 소개되고 있고, CNS의 경우 *S. aureus*와는 달리 NaCl 첨가, 배양 시간, 접종량 등이 검사 결과에 많은 영향을 준다고 보고되고 있다[14]. CNS의 methicillin 내성 판정을 위한 방법으로 NCCLS에서는 2% NaCl을 첨가한 Müller-Hinton 한천배지를 사용한 한천 희석법을 참고 방법으로, 4% NaCl을 첨가한 oxacillin 한천선별배지로 35℃, 48시간 배양 후 판독하는 것을 가장 신뢰할 만한 방법으로 추천하고 있다[6]. 최근 연구에 의하면 *mecA* 유전자에 의한 CNS의 methicillin 내성을 검출하는데 있어 항생제 감수성검사의 내성 판정기준을 낮은 항균제 농도로 하였을 때 더 잘 검출할 수 있었다는 보고들이 있다[1, 8, 12, 13]. 이러한 배경에서 NCCLS에서는 1999년 1월 디스크 확산법과 한천 희석법에서의 CNS의 내성 판정 기준을 *S. aureus*와 구별하여 새 기준을 제시하였다[3]. 이 기준에서는 디스크 확산법의 내성 판정 기준을 과거 10 mm 이하에서 17 mm 이하로, 한천 희석법은 4 µg/mL 이상에서 0.5 µg/mL 이상으로 기준 농도를 더 낮추어 정하였다.

본 연구에서는 *mecA* 유전자를 PCR법으로 검출하는 방법과 디스크 확산법, 한천 희석법을 비교하여 보았다. 과거 NCCLS에서 제시한 내성 판정 기준에 의하여 디스크 확산법과 한천 희석법에 의한 methicillin 내성을 판정해 보았을 때, *mecA* 유전자가 검출된 균주를 내성으로 판정할 수 있는 민감도가 디스크 확산법은 65.3%, 한천 희석법은 75.5%였다. 이는 York 등[1]이 보고한 디스크 확산법의 민감도 84%, 박 등[15]이 보고한 한천 희석법의 민감도 31.7%, Kohner 등[14]의 보고에 의한 디스크 확산법의 민감도 90.0%, 한천 희

석법의 민감도 63.3% 등 다른 여러 논문에서와 같이 낮은 결과였다. 1999년 1월에 NCCLS에서 개정된 디스크 확산법과 한천 희석법에 의한 CNS의 methicillin 내성 검출 기준을 적용하였을 경우에는 각각 95.9%, 89.8%의 민감도를 보여서 새로 개정된 기준이 *mecA*에 의한 methicillin 내성을 더 민감하게 검출하였다. 한편 본 연구에서 PCR 법에서는 음성이었으나 항생제 감수성검사서 내성으로 판정된 9 균주의 경우는 위에서 설명한 *mecA* 유전자 이외의 다른 내성 기전에 의한 내성 균주로 생각되어 진다.

결론적으로 새로 개정된 NCCLS의 CNS 내성 검출의 기준은 과거의 기준에 비해 *mecA* 유전자에 의한 methicillin 내성의 검출에 더 민감한 결과를 나타내었고, 본 연구의 결과가 NCCLS의 새로 개정된 기준을 임상 검사실에서 적용하는데 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 그리고, 앞으로 더 많은 균주를 대상으로 연구가 이루어져 새 기준에 대한 검증이 되고, 자동화된 장비로 이루어진 항생제 감수성 검사와도 비교하는 연구도 시행되어서 가장 적합한 CNS의 methicillin 내성 검출법이 확립되어야 할 것이다.

요 약

배 경 : Coagulase negative staphylococcus (CNS)는 요로 감염의 주 원인균이며 체내 유치물(indwelling device)에 의한 감염과 면역저하된 환자에서의 균혈증을 일으키는 원인균으로 보고되고 있다. 특히, methicillin에 내성을 보이는 균주는 다른 항생제에도 내성을 보이는 다제 내성균일 경우가 많아 임상적으로 중요성이 높다. CNS의 methicillin 내성을 검출하기 위한 가장 적절한 방법은 아직 논란이 되고 있고, 1999년 1월에 NCCLS에서는 CNS의 methicillin 내성 검출에 대한 새 기준을 제시하였다. 본 연구에서는 임상 검체에서 분리된 CNS 균주에 대하여 NCCLS에서 새로 제시한 기준에 따른 디스크 확산법과 한천 희석법에 의한 항생제 감수성 검사와 *mecA* 유전자에 대한 PCR 결과를 비교하여 보았다.

방 법 : 총 82주의 CNS 균주에 대해 NCCLS 기준에 따라 디스크 확산법과 한천 희석법에 의한 항생제 감수성검사를 실시하였고, 동시에 *mecA* 유전자 검출을 위한 PCR 검사를 시행하였다.

결 과 : 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 검사 결과 penicillin 내성을 보인 균주는 66주(80.5%)였고, oxacillin에 내성을 보인 균주는 63주(76.8%)였다. 한천 희석법에 의한 결과 penicillin 내성을 보인 균주는 71주(86.6%)였고, oxacillin에 내성을 보인 균주는 53주(64.6%)였다. PCR 법에 의한 *mecA* 유전자 검출에서는 49주(59.8%)가 양성을 보였다. PCR 법에 의한 내성 유전자의 판별을 기준으로 했을 경우 디스크 확산

법과 한천 회석법의 민감도는 각각 95.9%, 89.8%였고, 감수성 판정 기준을 1999년 1월 NCCLS 개정 이전의 기준으로 하였을 때는 각각의 민감도는 65.3%, 75.5%였다.

결론 : CNS의 methicillin 내성을 판정하기 위한 NCCLS의 새 기준은 *mecA* 유전자에 의한 내성을 검출하는데 더 민감하였다.

참 고 문 헌

1. York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GK. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:249-253.
2. Brakstad OG and Maeland JA. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS* 1997;105:264-275.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. M100-S9, Villanova, Pa.. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
4. Kloos WE and Bannerman TL. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC, ASM Press, 1995;282-98.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-sixth edition; approved standard, M2-A6, Villanova, Pa., National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - fourth edition; M7-A4, Villanova, Pa., National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
7. Koneman EW, Allen SD, et al. eds. *The Gram-Positive Cocci: Part I: Staphylococci and Related Organisms*. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1997;539-76.
8. Ramotar K, Bobrowska M, Jessamine P, Toye B. Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci Initially reported as Methicillin Susceptible Using Automated Methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:267-73.
9. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med* 1987;316:927-31.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Morbidity and Mortality Weekly Rep* 1995;94(RR-12):1-13.
11. Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:447-454.
12. Frebourg NB, Nouet D, Lemee L, Martin E, Lemeland JF. Comparison of ATB Staph, Rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J Clin Microbiol* 1998;36:52-57.
13. Mulder JG. Comparison of disk diffusion, the E-test, and detection of *mecA* for determination of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:567-573.
14. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill III F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus spp. *J Clin Microbiol* 1999;37:2952-61.
15. 박종인 및 이정녀. Methicillin 내성 *Staphylococcus epidermidis* 검출을 위한 항생제감수성검사와 *mecA* 유전자검사의 비교. *대한임상병리학회지* 1998;18:391-5.