

## 지속적 재발성 방광결석환자의 요검체에서 분리된 메티실린 내성 *Staphylococcus aureus* small colony variants 1예

박준완, 최혜심, 김의종

서울대학교 의과대학 임상병리과학교실

### A Case of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs) Isolated from Urine of a Patient with Persistent and Relapsing Bladder Stone

Jun Wan Park, M.D., Hae Shim Choi, M.T., and Eui Chong Kim, M.D.

Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) are frequently auxotrophic for hemin, menadione, thiamine, and CO<sub>2</sub> involved in biosynthesis of the electron transport chain element. This phenotype grows slowly, and forms very small, nonhemolytic colonies in routine culture, so it may be led to the misidentification of this organism. We isolated an organism with catalase-positive, gram-positive cocci in cluster from the urine of a 55-years-old woman with persistent and relapsing bladder stone, who had undergone the antibiotic treatment with cefotaxime, ceftizoxime, amikacin, and/or micromonicin, intermittently for three years. The possibility of SCVs should have been ruled out because this organism didn't grow on Mueller-Hinton agar (MHA) for the susceptibility test. It formed small colonies on blood agar plate overnight, and grew only on MHA with supplement of hemin, or with 5% CO<sub>2</sub>. This organism was coagulase-positive, DNase-positive, manitol-salt positive, and identified as *S. aureus* with VITEK GPI card. The susceptibility test could be performed after adding hemin(1mg/mL) into bacterial suspension and showed susceptibility against vancomycin, teicoplanin, and rifampin. Because these phenotypes can be misidentified as other non-pathogenic organisms due to their atypical characteristics, we should consider SCVs in case of small, nonhemolytic colonies with catalase-positive, gram-positive cocci in cluster, showing no growth on MHA. In addition, Infections caused by SCVs are recently recognized in relation to persistent and relapsing infection, so they could be isolated from the patients with long-term antibiotic therapy.

**Key words :** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, small colony variants, hemin, persistent and relapsing infection, long-term antibiotic therapy

#### 서 론

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) small colony variants (SCVs)는 호흡사슬의 전자 전달계

원본접수 : 2000년 1월 15일      접수번호 : CM 3-1-12

수정본접수 : 2000년 2월 29일

교신저자 : 김 의 종

(110-744) 주소 서울시 종로구 연건동 28번지

서울대학교병원 임상병리과

Tel : 760-3500 Fax : 764-3698

이상으로 인하여, 이 전자 전달계 요소의 생산과 관련된 hemin, menadione, thiamine과 CO<sub>2</sub> 등에 의존적 성장을 하며, 통상적인 배양에서는 균집락이 매우 작고 비용혈성이기 때문에 다른 비병원성 세균으로 잘못 동정되어 치료에 혼선을 유발할 수 있다. 과거 수십년간 SCVs에 의한 많은 감염 예가 보고되었으나 주목받지 못하다가 근래에 들어 지속성 재발성 치명적 감염 예가 보고되면서[1-3] 이에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 저자들은 지속성 재발성 방광결석 환자에서 MRSA에 의한 방광염을 치료하기 위하여 지난 3년간

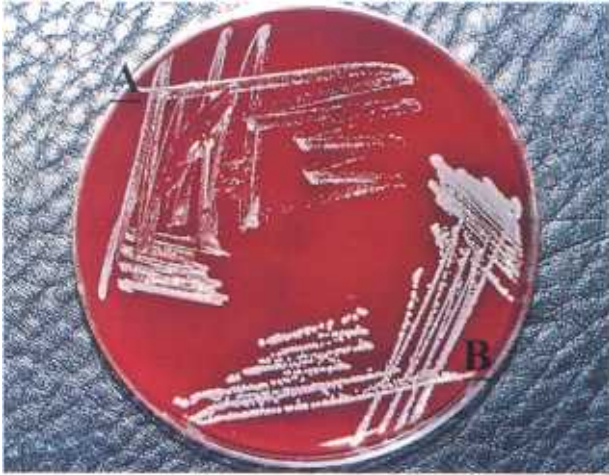


Fig. 1. Colonies incubated on blood agar plate overnight at 35°C: A: small colony variants; B: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

계속하여 간헐적으로 항생제(cefotaxime, ceftizoxime, amikacin, micromonicin)를 투여 받았던 55세 여자 환자의 소변에서 SCVs를 국내 최초로 분리하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

증 례

환자는 55세 여자로서, 육안적 혈뇨, 잔뇨감, 빈뇨를 주소로 1999년 8월 입원하였다. 과거력상 1994년 2월 자궁경부암으로 진단 받고 방사선치료를 시행 받았으며 1996년 4월 방사선장염(radiation enteritis) 및 직장방광루(rectovesical fistula)로 누공제거술(fistulectomy)을 시행 받았다. 1997년 4월 육안적 혈뇨, 우하복부 동통 등으로 재입원하여 방광결석 및 동반된 MRSA에 의한 방광염으로 결석제거술 및 항생제(cefotaxime, ceftizoxime, amikacin, micromonicin)치료를 받았다. 1998년 8월, 1999년 1월에는 재발성 방광결석과 방광염으로 같은 치료를 받았고 1999년 8월 육안적 혈뇨, 잔뇨감 등을 주소로 결석제거술 위해 다시 입원하였다. 신체검사 소견상 의식은 명료하였고 활력징후는 정상이었으며 검사실 검사소견에서는 중등도의 빈혈(hemoglobin 7.9 g/dL)이 있는 것 외에는 특이소견은 없었다.

**미생물 검사소견 :** 환자의 요검체를 혈액한천배지 및 MacConkey배지에 접종한 다음, 37°C 배양기에서 하룻밤 배양하였을 때 혈액한천배지에서 0.5~1.0 mm 크기의 매우 작은 비용혈성 균 집락(>10<sup>8</sup> CFU/mL) 형성되었고, 그람염색상 그람양성의 군집상(clustered) 구균이 관찰되었다(Figure 1). 균의 동정을 위하여 생화학적 동정시험을 시행하였는데 catalase양성, coagulase 양성(PS Einken, Einken chemical Co. LTD., Japan), 7.5% mannitol-salt 양성, DNase 양성 이었고 Vitek GPI

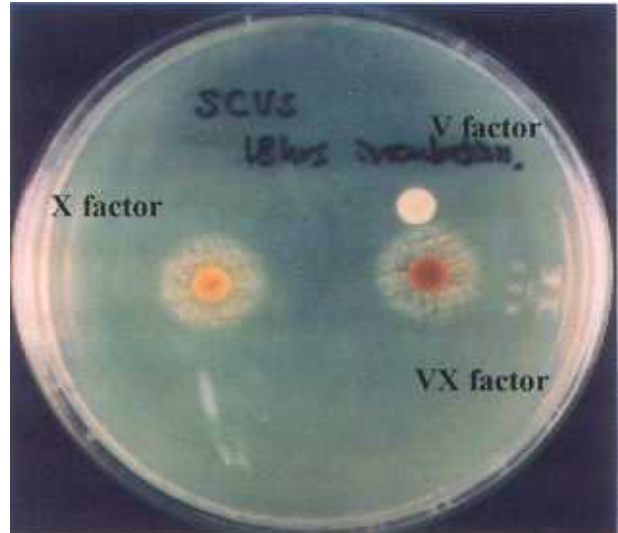


Fig. 2. small colony variants showing the satellitism with X and VX disk, not V disk



Fig. 3. Susceptibility test after adding hemin(1mg/mL of Mueller-Hinton broth) into bacterial suspension, showing susceptible to vancomycin, teicoplanin, chlormphenicol, rifampin and trimethoprim/sulfomethoxazole

card(bioMerieux Vitek, Inc.,USA)에서 *S. aureus*로 동정되었다(Bionumber: 77127030051). 항생제 감수성 검사는 NCCLS 지침에 따라 디스크 확산법으로 시행하였는데 CO<sub>2</sub>가 없는 배양기에서 하룻밤 배양시 Mueller-Hinton agar (MHA)에서 균이 증식하지 않아 처음에는 이상하게 생각하였고 반복 배양에서도 역시 증식하지 않아 감수성 검사는 할 수가 없었으며, MHA에서 자라지 않는, 즉 특별한 영양요구인자가 필요한 균주일 것이라

고 생각하게 되어 SCVs의 가능성을 고려하였다.

5% CO<sub>2</sub> 배양기에서는 배양 이틀째, 측정 가능한 억제대를 형성하는 균의 증식이 관찰되었으며, MHA에 0.5 McFarland의 균 부유액을 바른 후 hemin (10µg) disk를 놓고 배양 시에 hemin disk 주위에서만 균이 증식하는 위성현상이 관찰되었다(Figure 2). 또 hemin을 첨가한 MH broth로 균 부유액(hemin 1 mg/mL, 0.5 McFarland)을 만들어 MHA에 접종하고 디스크 확산법으로 감수성 검사를 시행하였는데, CO<sub>2</sub>가 없는 배양기에 하룻밤 배양시 확실히 균이 증식하였고 각 항생제에 대하여 억제대를 관찰할 수 있었다(Figure 3). 이 균은 penicillin, oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline, clindamycin, erythromycin에 내성을 보였으며 vancomycin, teicoplanin, rifampin, chlormphenicol, trimethoprim/sulfomethoxazole에 감수성을 나타내었다. 감수성 검사와 같은 방법으로 균 부유액에 hemin을 첨가한 후 E-test를 시행하였을 때 penicillin (MIC > 32 µg/mL), gentamicin (MIC > 256 µg/mL), oxacillin (MIC > 256 µg/mL), ciprofloxacin (MIC > 32 µg/mL)에 대해 내성을 보였으며, vancomycin (MIC = 1.0 µg/mL), teicoplanin (MIC = 0.5 µg/mL)에 대하여 감수성을 나타내었다.

**임상경과** : 환자는 결석 제거술과 고농도의 항생제(miconomicin 4.5g/day, cefotaxime 3g/day)로 치료하여 증상이 호전되어 퇴원하였으며, 외래 추적검사 중 2000년 2월 12일 외래로부터 접수된 요검체 배양에서 같은 성상의 SCVs가 다시 분리되어 임상에 보고 하였다.

## 고 찰

지난 수십 년간 외국문헌에 *Staphylococcus aureus* SCVs에 대한 많은 보고가 있어 왔으나 특별한 주목을 받지 못하였다. 그 후 1995년 Proctor 등이 지속적이고 재발성 감염을 가진 환자에서 분리된 다섯 예의 SCVs 증례를 발표하였고[1] 이후 Kahl 등이 장기간 trimethoprim/sulfomethoxazole의 예방적 항생제 투여를 받고 있는 cystic fibrosis 환자에서 SCVs에 의한 지속적 감염을 보고하였으며[2] Sefert 등은 AIDS 환자에서 MRSA SCVs에 의한 치명적 감염사례를 보고하여[3] 점차 치료가 어려운 중증, 지속성 SCVs 감염 예가 증가하고 있다.

MRSA SCVs는 호흡사슬의 전자 전달계 이상으로 인하여 menadione, thiamine, hemin, CO<sub>2</sub> 등에 의존적 성장을 하는데[4-7], Pelleier 등은 장기간 aminoglycoside의 사용이 심부조직 감염에서 hemin 등에 의존적 성장을 하는 SCVs를 선택적으로 유발시킨다는 주장을 하였고[8], Musher 등은 실험실 조건에서 고농도의 gentamicin을 정상 *S. aureus*에 노출시킬 때 gentamicin에 대해 저항성인 SCVs를 유도할 수 있다는 사실을 발표하였는데[9], 본 증례에서도 amikacin, miconomicin

같은 aminoglycoside계를 장기간 사용하였다는 사실은 위의 사실을 뒷받침한다. 그 이후 Balwit 등이 SCVs가 숙주세포 내에서 생존하며, 이것이 숙주의 공격에 대한 회피기전일 것이며 항생제에 대한 내성 발생의 원인일 것이라는 가설을제안하였으며[10], Von Eiff 등은 *S. aureus*의 heme생산에 필요한 유전자인 hemB를 선택적으로 파괴하면 정상 *S. aureus*가 임상적으로 분리된 SCVs와 동일한 특징을 가진 균으로 형태학적 변화가 일어나며 세포 내에서도 생존한다는 것을 발표하였다[11]. 이는 만성적으로 고농도의 항생제에 노출될 때 *S. aureus*의 형태학적 변화가 일어나 SCVs가 선택되고 이것이 숙주세포내 생존하면서 지속적이고 반복적인 감염을 일으키는 것으로 설명할 수 있다[8-10]. 또 ATP를 생산하는 데 관여하는 전자 전달계의 이상으로 에너지를 필요로 하는 과정이 저해됨에 따라, 양전하를 띤 항생제의 세포내 유입 감소와 alpha-toxin, protein A의 생산 감소를 가져오게 되고, 따라서 조직파괴성은 약하나 숙주의 공격과 항생제 치료에 대해 내성을 가지게 되어 지속적 반복적인 감염을 유발할 수 있을 것으로 생각된다[11-13].

SCVs는 통상적 배양에서는 집락형성이 느리고 집락이 작으며 황색색소가 없고 beta 용혈이 거의 관찰되지 않으며 낮은 coagulase활성을 보이는 등 비전형적인 집락을 형성하는 것이 특징인데[1-4,10,13] 이러한 형태학적인 특징들도 앞에서 다른 저자들이 언급한 바 에너지 생산감소에 따른 세포벽 합성속도 감소[13], hemin 결핍으로 인한 carotene 생산저하[4,13], 용혈소 생산저하, 효소활성 저하[13]에 기인하는 것으로 설명할 수 있다.

그 밖의 생화학적 성상은 병원성 MRSA와 같으며 일반검사실에서는 이러한 비전형적인 생화학적 특징으로 인하여 주로 coagulase-negative staphylococcus (CNS)로 잘못 동정되어 비병원성균으로 인지됨으로써 감염의 원인균으로 판단되지 않을 가능성이 높다. 따라서 현실적으로 발생 빈도는 알 수 없으나 실제로는 빈도가 높을 것으로 추정되며, 검사실에서도 이러한 점에 주의하여 혈액한천배지에서 용혈이 없는 작은 균집락이 catalase양성, 그람양성구균이면서 항생제 감수성 검사에서 MHA에 쉽게 증식하지 않을 경우 SCVs의 가능성을 고려해야 할 것이다. 언급한 바대로 최근 SCVs에 의한 지속적 재발성 중증감염이 보고되고 있으므로 임상적으로도 관심을 가지고 장기간 항생제 치료를 받는 지속성 재발성 감염이 있는 환자의 경우 SCVs의 발견에 주의를 기울여야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony

variants (SCVs)는 호흡사슬의 전자 전달계 이상으로 인하여 hemin, menadione, thiamine, CO<sub>2</sub> 등에 의존적 성장을 하며, 통상적인 배양에서는 집락 형성이 느리고 매우 작으며 비용혈성이기 때문에 검사실에서 다른 균으로 잘못 동정될 수 있다. 저자들은 지속성 재발성 방광결석 환자에서 *S. aureus*에 의한 세균성 방광염을 치료하기 위하여 지난 3년간 계속하여 간헐적으로 항생제 (cefotaxime, ceftizoxime, amikacin, micronomicin)를 투여 받았던 55세 여자 환자의 요검체에서 SCVs를 분리하였다. 이 균은 항생제 감수성검사 과정 중 Mueller-Hinton agar (MHA)에서 증식하지 않았기 때문에 SCVs를 의심하였는데, 혈액한천배지에서 하룻밤 배양시 비용혈성의 작은 균집락을 형성하였고 MHA에 hemin을 첨가하거나 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양해야만 균이 증식하는 현상을 나타내었으며 대부분의 생화학적 성상은 병원성 MRSA와 같았다. 균부유액에 hemin을 첨가(hemin 1 mg/mL, 0.5 McFarland)하고 시행한 감수성 검사에서는 vancomycin, teicoplanin, rifampin에 대해 감수성을 보였다. 이러한 비전형적인 생화학적 형태학적 특징으로 인하여 다른 균으로 잘못 동정되어 비병원성균으로 인지될 가능성이 높으므로, 혈액한천배지에서 용혈이 없는 작은 균집락이 catalase양성, 그람양성구균이면서 항생제 감수성 검사시 MHA에서 쉽게 증식하지 않을 경우 SCVs의 가능성을 고려해야 할 것이다. 최근 SCVs에 의한 지속적 재발성 중증감염이 보고되고 있으므로 장기간 항생제 치료를 받는 지속성 재발성 감염이 있는 환자의 경우 SCVs의 발견에 주의를 기울여야 할 것으로 생각되어 본 증례를 보고하는 바이다.

### 참 고 문 헌

1. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. *Persistent and relapsing infections associated with small colony variants of Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1995;20:95-102.
2. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. *Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis*. *J Infect Dis* 1998 Apr;177(4):1023-9.
3. Seifert H, von Eiff C, F tkenheuer G. *Fatal case due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus small colony variants in an AIDS patient*. *Emerg Infect Dis* 1999 May-Jun;5(3):450-3.
4. Kaplan M and Dye WE. *Growth requirements of some small-colony-forming variants of Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1976;4:343-8.
5. Devriese LA. *Hemin-dependant mutants isolated from methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain*. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* 1973;39:33-40.
6. Yegian D, Fallo G, Toll MW. *Kanamycin resistant staphylococcus mutants requiring hemin for growth*. *J Bacteriol* 1950;62:499-500.
7. Acar JF, Goldsein FN, Lagtange P. *Human infections caused by thamine or menadione-requiring Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1978;8:142-7.
8. Pelletier LL Jr, Richardson M, Feist M. *Virulent gentamicin-induced small colony variants of Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med* 1979;94:324-34.
9. Musher DM, Baughn RE, Templeton GB, Minuth JN. *Emergence of variant forms of Staphylococcus aureus after exposure to gentamicin and infectivity of the variants in experimental animals*. *J Infect Dis* 1977;136:360-9.
10. Balwit JM, van Langvelde P, Vann JM, Proctor RA. *Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic Staphylococcus aureus persist within cultured endothelial cells*. *J Infect Dis* 1994; 170:1033-7.
11. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Golz F. *A site-directed Staphylococcus aureus hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly*. *J Bacteriol* 1997 ;179(15):4706-12
12. Proctor RA and Peters G. *Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implication*. *Clin Infect Dis* 1998 ;27(3):419-22
13. Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DF, Peter G. *Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance*. *Clin Infect Dis* 1998 ;27 (Suppl 1):S68-74.