

Coagulase 음성 포도구균에서의 메티실린 내성 검출

조영욱, 채정돈, 박혜영, 김미나

울산의대 서울아산병원 진단검사의학교실

Detection of Methicillin-Resistance of Coagulase-negative *Staphylococci*

Young-Uk Cho, Jeong-Don, Hye-Young Park, Mi-Na Kim

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: Coagulase-negative staphylococci (CNS) has been considered as a major causative agent of nosocomial infections. A prompt and accurate detection of methicillin resistance (MR) in staphylococci is a current issue of clinical microbiology laboratories. This study was purposed to evaluate various methods for detecting MR from CNS.

Methods: We selected 78 CNS strains obtained from blood cultures from April 1999 through July 2001 including 20 strains of *Staphylococcus epidermidis*, 20 *S. hominis* (SHO), 19 *S. capitis*, 9 *S. haemolyticus*, 3 *S. saccharolyticus*, 1 *S. saprophyticus* (SAP), 2 *S. warneri* (SWA), 2 *S. xylosus*, 1 *S. lugdunensis*, and 1 *S. auricularis*. In addition, one SAP strain received from World Health Organization for proficiency tests was also studied. The following methods were compared to the *mecA* gene PCR: MicroScan PosCombo 12, oxacillin salt agar containing 6 µg/mL (OSA-6) or 0.6 µg/mL (OSA-0.6) of oxacillin, oxacillin disk diffusion (ODD), and MRSA-Screen latex agglutination (LA) for detecting penicillin binding protein 2a.

Results: One SWA was failed in *mecA*-PCR and fifty-nine of 78 (75.6%) CNS were positive for *mecA* gene. The agreement rates, sensitivities, and specificities for each test were as follows: for MicroScan, 97.3%, 98.2%, 88.9%; for OSA-6 and OSA-0.6 at 24-h incubation, 79.5%, 74.6%, 94.7% and 79.5%, 72.9%, 100%, respectively, and at 48-h incubation, 91.0%, 91.5%, 89.5% and 91.0%, 96.6%, 73.7%, respectively; ODD, 84.6%, 84.7%, 84.2%; LA, 80.8%, 76.3%, 94.7%. One SHO and one SAP that were *mecA*-negative showed resistance in the MicroScan, ODD, and OSA.

Conclusions: MicroScan appears a reliable method to detect MR in all species of CNS except SHO and SAP. ODD and LA were not appropriate in detecting MRCNS due to a low sensitivity. Although OSA-0.6 at 48-h incubation showed a high sensitivity, the low specificity may limit a routine use in clinical laboratory.

(Korean J Clin Microbiol 2002;5:110-118)

Key words : Coagulase negative staphylococci, methicillin resistance, *mecA*, MicroScan, oxacillin salt agar, oxacillin disk diffusion, MRSA-Screen latex agglutination

서 론

Coagulase 음성 포도구균(coagulase-negative staphylococci, CNS)은 대표적인 피부상재균으로 병원성이 낮은 기회감염균이다. 과거에는 임상검체에서 분리될 때 오염균으로 간주되는 경우가 많았지만 최근 20년간 인공 삽입물 사용, 면역저하 환자의 증가 등으로 병원감염의

접수번호: CM 5-02-06

교신저자: 김미나

(138-736) 서울특별시 송파구 풍납동 388-1

서울아산병원 진단검사의학과

Tel: (02) 3010-4511 Fax: (02) 478-0884

E-mail: ikpaik@sanggyepaik.or.kr

주요 원인균으로 대두되었다. 본원에서 2001년 1월에서 8월까지 임상검체에서 분리된 세균들 중 CNS는 6%를 차지하여 *Staphylococcus aureus* 다음으로 빈번하게 분리되는 그람양성균이었다.

일반적으로 CNS는 *S. aureus*보다 항균제 내성률이 더 높은 것으로 알려져 있다. 미국에서 1990년대 후반 혈액에서 분리된 포도구균들을 대상으로 시행한 연구에서 *S. aureus*의 26.0%가 methicillin 내성(methicillin resistance, MR)인데 비해, CNS는 68.3%가 MR이었다고 하였다[1]. 국내에서 분리되는 포도구균의 항균제 내성은 매우 높아서, 2001년 1월부터 8월까지 본원 환자들의 혈액에서 분리된 *S. epidermidis*의 88.6%, *S. aureus*의 81.5%에서 MR이 검출되어 *S. aureus*보다 CNS에서 MR률이 더 높았다. 다른 3차 병원에서 균종이 구분되지 않은 CNS의 MR률이 76.8%라는 보고가 있어서[2], 우리나라에서 methicillin 내성 CNS (methicillin-resistant CNS, MRCNS)의 빈도가 매우 높음을 알 수 있다. MR의 경우 β -lactam 항균제 뿐만 아니라 대부분 quinolone, macrolide, lincosamide, aminoglycoside 계열의 항균제에도 다제내성을 보이기 때문에 임상미생물 검사실에서는 MRCNS를 정확하고, 신속하게 검출해 주어야 한다.

포도구균이 *mecA* 유전자를 획득하면 β -lactam 항균제에 낮은 친화성을 갖는 penicillin결합 단백질 penicillin binding protein 2a (PBP2a)를 생성하여 β -lactam 항균제에 내성을 갖게 된다[3,4]. 역사적으로 β -lactamase에 안정적인 항포도구균 penicillin에 대한 내성을 MR이라고 해왔다. *mecA* 유전자에 의한 MR 표현 정도는 *S. aureus*에 비해 CNS에서 훨씬 다양하다[1,5]. 즉, 임상검체에서 분리되는 대부분의 CNS는 이질성을 보여 배양조건 또는 사용하는 β -lactam 항균제에 따라 다양한 정도의 MR을 보인다. 따라서 과거 *S. aureus*의 MR 기준을 CNS에도 적용하면 위감수성 오류를 초래한다는 것이 여러 연구에서 보고됨으로써[1,6,7], 2000년 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 CNS를 위한 감수성검사 판독 기준을 새로 만들었다[8]. 그러나 새 기준은 *S. epidermidis*의 검출율을 높이기 위해 MR의 최소발육저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 기준을 4 μ g/mL에서 0.5 μ g/mL로 낮춤으로써, 일부 CNS 종에서는 위내성이 너무 높아진 것이 문제가 되었다[6]. 이후 NCCLS 지침서에는 *S. saprophyticus*, *S. ludgenensis* 등에는 이 기준을 적용하지 말라는 단서가 붙었고[9,10], *S. epidermidis*를 제외한 CNS에서는 PBP2a 단백 검출, *mecA* 유전자 검출 등이 신뢰할 수 있는 방법이라고 언급하고 있다[10]. MR을 검출하기 위해서는 물론 *mecA* 유전자를 검사하는 것이 가장 확실한 방법이 되겠으나, 임상검체에 대해 일상적으로 사용하기에는 적합하지 않기 때문에 이를 대체하는 방법으로 oxacillin 선별 평판배지(oxacillin salt agar screen, OSA)[11,12], PBP2a를 검출하는 라텍스응집 검사(latex agglutination, LA) 등을 평가한 논

문들이 있다[13-20].

본 연구의 목적은 CNS 각 균종별로 *mecA* 유전자 검사 결과와 MicroScan과 디스크 확산법 감수성검사, OSA 검사, LA 검사 등을 비교평가하고, 임상미생물검사실에서 MRCNS를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상균주

1999년 4월부터 2001년 7월까지 혈액배양에서 분리된 CNS 78균주들과 외부 정도관리로 받은 *S. saprophyticus* 1주 등 모두 79균주들을 -70℃에 냉동보관하였다가 연구에 사용하였다. 임상검체에서 분리된 MRSA 1균주와 *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 29213 등을 대조균주로 사용하였다. 혈액배양에서 분리된 78균주들의 균종 분포는 *S. epidermidis* 20주, *S. hominis* 20주, *S. capitis* 19주, *S. haemolyticus* 9주, *S. saccharolyticus* 3주, *S. warneri* 2주, *S. xylosus* 2주, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis* 등이 각각 1주씩이었다. 혈액배양기는 BACTEC 9240 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)을 이용하였고, 균 동정 및 항균제 감수성 검사는 MicroScan PosCombo 12 panel (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. PosCombo 12는 oxacillin 0.5 μ g/mL에서 8.0 μ g/mL까지 5개의 농도만을 포함하고, 0.25 μ g/mL 농도가 없기 때문에 MIC가 0.5 μ g/mL 이하면 감수성, 1.0 μ g/mL 이상이면 내성으로 판독하였다.

2. *mecA* 유전자 검사

mecA 유전자는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하여 검출하였다. 79균주의 CNS와 양성대조균인 MRSA 1균주, 음성대조균인 *S. aureus* ATCC 25923 등을 혈액항천배지에 하룻밤 계대배양하였다. 균집락을 1 μ L 루프로 가득 탄 후 100 μ L 멸균 증류수에 풀어서 30분 동안 가열하였다. 14,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상층액만 멸균 튜브에 옮겨 담아 *mecA* 유전자 증폭에 사용하였다.

PCR에 다음 2쌍의 시발체를 사용하였다. *mecA* 유전자를 증폭하기 위한 시발체는 M1 (5'-TGGCTATCGTGTGACAATCG-3')과 M2 (5'-CTGGAACCTGTTGAGCAGAG-3')로 310 bp 분획의 생산물을 얻고, PCR이 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 포도구균에 공통적으로 존재하는 staphylococcal insertion element *IS431*를 증폭하는 시발체 C1 (5'-AGGATGTTATCACTGTAGCC-3')과 C2 (5'-GATGTACAATGACAGTCAGG-3')를 사용하여 444 bp 분획의 생산물을 얻도록 고안되었다[21].

DNA 검체 2 μ L를 48 μ L의 반응액에 첨가하여 총 50 μ L

의 PCR 혼합액을 제조하였다. 반응액은 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2.5 mM dNTP, 시발체 각각 10 pmol, 1.25 U의 Taq polymerase 등으로 조성되었다. PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., Watertown, USA)로 증폭하였는데 조건은 다음과 같다. 94℃에서 5분간 초기 변성시킨 후 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분으로 초회 PCR을 하였고, 다음 회부터 72℃에서의 반응시간을 2초씩 늘려 총 36회 PCR을 시행하였다. 72℃에서 5분간 놓아둔 후 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 시행하였다. 310 bp와 444 bp의 분획이 모두 관찰되면 *mecA* 양성으로, 444 bp의 분획만 관찰되면 *mecA* 음성으로, 444 bp의 분획이 관찰되지 않으면 증폭에 실패한 것으로 판정하였다.

3. OSA 검사

0.6 µg/mL 및 6 µg/mL 농도의 oxacillin을 함유하고 있는 4% NaCl Mueller-Hinton (MH) 평판배지(각각 OSA-0.6, OSA-6)를 제조하였다. 혈액한천배지에 계대배양한 균집락을 MH 액체배지에 McFarland 탁도 0.5가 되게 부유시켰다. 멸균된 면봉에 부유액을 적신 후 두 가지 농도의 oxacillin 선별 평판배지에 점적하였다. 35℃ 배양기에서 24시간과 48시간 동안 배양한 후 균의 생장 여부를 관찰하였다. 균집락이 하나 이상 보였을 때 또는 확실한 집락이 없어도 얇게 퍼지는 형태로 균의 생장이 관찰되면 내성으로 간주하였다.

4. Oxacillin 디스크 확산법 (oxacillin disk diffusion, ODD)

혈액한천배지에 계대배양한 균집락을 MH 액체배지에 McFarland 탁도 0.5가 되게 부유시킨 후 멸균된 면봉에 부유액을 적신 다음 MH 평판배지 표면 전체에 고르게 도포하였다. 배지 중앙에 oxacillin 1 µg 디스크(Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)를 놓고 35℃ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 oxacillin의 억제대를 측정하였다. 억제대의 직경이 17 mm 이하이면 내성으로 판정하였다[3].

5. MRSA-Screen LA 검사

MRSA-Screen (Denka Seiken, Tokyo, Japan)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 검사하였다. 혈액한천배지에 계대배양한 균집락을 루프로 따서 추출용액 1에 부유시킨 후 3분간 가열하였다. 실온으로 식힌 후 50 µL의 추출용액 2를 첨가하였다. 추출용액 1과 2는 검사 키트에 포함되어 있다. 원심분리 후 상층액을 50µL씩 따서 두 개의 시험 슬라이드에 문혔다. 황색 포도구균의 PBP2a에 특이적인 단클론 항체에 감작된 라텍스 입자액과 감작되지 않은 대조 입자액을 한 방울씩 각각의 시험 슬라이드에 떨어뜨

린 후 교반기에 놓아두었다. 응집반응은 3분이 지난 후 판독하였다. 3분이 지나도 응집이 보이지 않으면 추가로 10분까지 더 교반시킨 후 다시 판독하였다. 재검하여 한번이라도 응집반응이 관찰되면 PBP2a 양성으로 판정하였다.

결 과

1. *mecA* 유전자 분석 결과

79균주들 중 59주에서 *mecA* 유전자가 검출되었다(Fig. 1). *S. warneri* 중 1균주가 *mecA* PCR이 실패하여 최종분석에서 제외하였기 때문에 전체적인 *mecA* 유전자 양성률은 75.6%(59/78)이었다. 균종별로 *S. epidermidis* 20균주 중 19주에서 *mecA*가 검출되어 양성률이 가장 높았다(95.0%). *S. haemolyticus*는 9균주 중 8주에서 양성(88.9%)이었고, *S. hominis*는 20균주 중 17주가 양성(85.0%)이었다. *S. capitis*는 19균주 중 10주가 양성(52.6%)이었다. *S. saccharolyticus*는 3균주 중 2주에서, *S. xylosus*는 2균주 중 2주 모두에서, 그리고 *S. lugdunensis* 1주에서 *mecA* 양성이었다(Table 1).

2. Oxacillin 감수성 검사 결과

MicroScan MIC 결과는 *S. hominis* 1균주가 MIC 0.5 µg/mL 이하인데 *mecA* 양성이었다고, *S. hominis* 1균주와 *S. saprophyticus* 1균주가 *mecA* 유전자가 음성인데도 MIC가 모두 1.0 µg/mL로서 위내성이 있었다. *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis* 등의 균종에서는 MIC 결과와 *mecA* PCR 결과와 완전히 일치하여 감수성검사를 할 수 없었던 *S. saccharolyticus* 3균주를 제외한 75균주 중 72균주에서 *mecA* PCR 결과와 일치하였다. ODD는 *S. epidermidis* 4균주, *S. hominis* 4균주, *S. lugdunensis* 1균주가 *mecA* 양성인데도 위감수성 결과를 보였고, *S. hominis* 1균주와 *S. saprophyticus* 2균주는 위내성을 보였다(Table 1). 전체적인 일치율, 민감도, 특이도는 MicroScan MIC는 97.3%, 98.2%, 88.9%, ODD는 84.6%, 84.7%, 84.2%이었다.

3. OSA 검사 결과

24시간 배양 후 판독하였을 때는 59주의 *mecA* 양성균주 중 OSA-6는 44균주(74.5%), OSA-0.6은 43균주(72.9%)만을 내성으로 검출하였고, 48시간 배양하여 판독하면 각각 54균주(91.5%), 57균주(96.6%)를 검출하였다. *mecA* 양성 *S. hominis* 17 균주 중 OSA-6에 48시간 배양하였을 경우 2주에서, OSA-0.6에 48시간 배양하였을 경우 1주에서 균생장을 관찰할 수 없었고, *mecA* 양성 *S. lugdunensis*

Table 1. The results of susceptibility testing methods for methicillin resistance in CNS

Species	Total	No. of MR isolates detected by						
		Micro Scan	ODD	OSA-6 24 hr	OSA-6 48 hr	OSA-0.6 24 hr	OSA-0.6 48 hr	LA
<i>S. epidermidis</i>								
<i>mecA</i> +	19	19	15	18	18	19	19	12
<i>mecA</i> -	1	0	0	0	0	0	0	
<i>S. hominis</i>								
<i>mecA</i> +	17	16	13	5	15	3	16	12
<i>mecA</i> -	3	1	1	0	0	0	1	0
<i>S. capitis</i>								
<i>mecA</i> +	10	10	10	10	10	9	10	9
<i>mecA</i> -	9	0	0	0	0	0	1	1
<i>S. haemolyticus</i>								
<i>mecA</i> +	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>mecA</i> -	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saccharolyticus</i>								
<i>mecA</i> +	2	NA	2	2	2	1	2	2
<i>mecA</i> -	1	NA	0	0	0	0	1	0
<i>S. warneri</i>								
<i>mecA</i> +	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mecA</i> -	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. xylosum</i>								
<i>mecA</i> +	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>mecA</i> -	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>								
<i>mecA</i> +	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mecA</i> -	2	1	2	1	2	0	2	0
<i>S. lugdunensis</i>								
<i>mecA</i> +	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>mecA</i> -	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. auricularis</i>								
<i>mecA</i> +	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mecA</i> -	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	78							
<i>mecA</i> +	59	56	50	44	54	43	57	45
<i>mecA</i> -	19	2	3	1	2	0	5	1

Abbreviations : MR, methicillin resistance; NA, not applicable; LA, MRSA-Screen latex agglutination; OSA-6, oxacillin salt screening agar containing 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oxacillin; OSA-0.6, oxacillin salt screening agar containing 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oxacillin; ODD, oxacillin disk diffusion.

1군주도 두 가지 OSA 모두에서 음성이었다. *mecA* 음성 *S. hominis* 중 MicroScan MIC가 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었던 균주가 OSA-0.6 48시간 배양에서 양성이었고, *mecA* 음성 *S. saprophyticus* 2주에선 48시간 배양 OSA-6과 OSA-0.6에서 자랐다(Table 1). *mecA* PCR 검사와의 일치율, 민감도, 특이도는 OSA-6는 24시간 배양시 79.5%, 74.6%, 94.7%, 48시간 배양시 91.0%, 91.5%, 89.5%였고, OSA-0.6은 24시

간 배양시 79.5%, 72.9%, 100%, 48시간 배양시 91.0%, 96.6%, 73.7%이었다.

4. MRSA-Screen LA 검사 결과

mecA 유전자 양성인 59균주 중 45주(76.3%)만을 내성으로 검출하였다. *mecA* 양성 *S. epidermidis* 19균주 중 7주

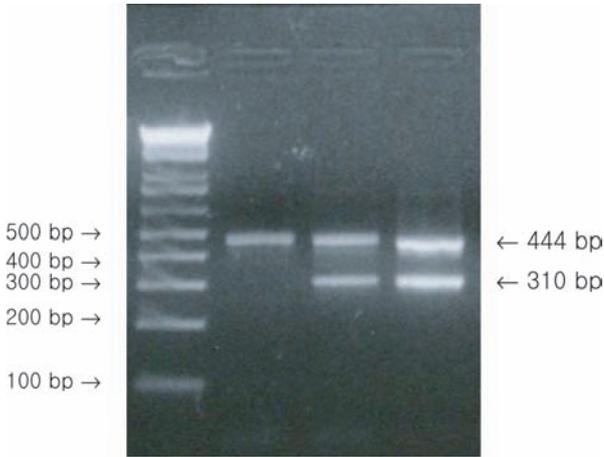


Fig. 1. Gel electrophoresis of DNA fragments generated by multiplex PCR amplification, showing the typical patterns of methicillin-susceptible *S. aureus*, MRSA, and methicillin-resistant CNS. Lane 1 shows *S. aureus* ATCC 25923 (methicillin-susceptible *S. aureus*). Lane 2, MRSA for positive control. Lane 3, methicillin-resistant *S. epidermidis*. Lane M indicates 1 kb DNA size marker (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

(37.8%), *S. hominis* 17균주 중 5주(29.4%), *S. capitis* 10균주 중 1주(10.0%), 그리고 *S. lugdunensis* 1주에서 PBP2a 음성이었다. 양성인 균주들 중 응집정도가 매우 약해서 10분 후에야 미약한 응집을 보인 경우가 *S. epidermidis* 6주, *S. hominis* 4주, *S. capitis* 1주, *S. xylosum* 2주, *S. haemolyticum* 1주 등 총 14주였다. *mecA* 음성인 *S. capitis* 1주는 LA에서 양성결과를 보였다(Table 1). *mecA* PCR 결과와 비교했을 때 일치율, 민감도, 특이도는 80.8%, 76.3%, 94.7%이었다.

고 찰

CNS에서의 *mecA* 양성률은 75.6%이었고, 각 균종별로는 *S. epidermidis* 95.0%, *S. haemolyticum* 88.9%, *S. hominis* 85.0%, *S. capitis* 52.6%이었다. CNS 균종 별로 MR 빈도가 다른 점은 과거 여러 보고가 있었는데, Hussain 등[6]은 *S. epidermidis*의 61.9%, *S. haemolyticum*의 83.3%, *S. hominis*의 51.8%에서 MR이 검출되었다고 하였고, York 등[7]은 *S. epidermidis*의 56.7%, *S. haemolyticum*의 28.6%, *S. hominis*의 23.5%에서 MR이 검출되었다고 하였다. 본 연구결과도 *S. epidermidis*와 *S. haemolyticum*의 MR률이 높다는 다른 연구결과와 일치한다. MR을 표현하는 PBP2a의 구조 결정인자가 바로 *mecA* 유전자인데, 이는 MRSA와 MR *S. epidermidis*에서 매우 높은 상동성을 보인다고 하며[22,23], methicillin 감수성 포도구균에서는 *mecA* 유전자가 검출되지 않는다. 또한 MR 표현형 검사는 NaCl의 농도, 배양시간 등의 조건이 중요한 작용을 하는 반면, 유

전자 검사는 성장조건에 구애받지 않고 검사할 수 있다. 이러한 점 때문에 *mecA* 유전자는 균종에 관계없이 methicillin 내성 포도구균을 검출할 수 있는 가장 유용한 분자생물학적 지표로 간주된다[21]. 하지만 *S. warneri* 1균주에서 PCR에 실패했던 본 연구에서처럼 PCR 증폭이 안 되는 경우가 생길 수 있기 때문에, PCR 검사시 성공 여부를 판단할 수 있는 내부지표를 꼭 포함시켜야 할 것이다.

본 연구에서 실시한 여러 감수성 검사들 중 현재 NCCLS에서 제시하고 있는 *S. epidermidis*의 oxacillin 내성기준을 적용한 MicroScan MIC 검사가 가장 높은 일치율을 보였고, 특히 *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticum*, *S. xylosum* 등에서는 100%의 일치율을 보였다. 이는 *S. epidermidis*와 *S. haemolyticum* 균종은 MIC 결과와 유전자 검사가 잘 일치한다는 보고들과 같은 결과이다[5,6]. 그러나 *S. saprophyticum*는 두 균주 중 한 균주에서 위내성이 있어 MIC법에 의한 oxacillin 감수성 검사를 신뢰할 수 없었다. *S. hominis*는 *mecA* 음성인 한 균주가 MIC 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 위내성을 보였고, *mecA* 양성인 한 균주는 MIC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 위감수성을 보였다. *S. hominis*는 *mecA* 양성과 *mecA* 음성인 균주들의 MIC가 0.25~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 사이에 분포하는 경우가 종종 있어 MIC 감수성 검사로는 오류가 있을 수 있다[5]. 이들 세 균주는 OSA 검사 결과가 ODD, LA, MicroScan 결과와 일치해서 *mecA* 유전자의 표현정도가 낮거나, 다른 기전에 의해 MIC가 올라간 상태로 판단된다.

ODD의 경우 민감도가 84.6%로 낮아서 *mecA* 유전자 검사와 일치율이 낮았다. MRCNS를 검출함에 있어 디스크 확산법은 일반적으로 다른 검사들보다 민감도가 낮은 것은 이미 다른 연구들에서도 보고한 바 있는데, Tenover 등[12]은 *mecA* 양성 CNS와 *mecA* 음성 CNS들을 MIC와 억제대 직경에 따라 분포도를 그린 후 현재 NCCLS에서 제시하고 있는 CNS의 oxacillin 내성 기준(MIC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 억제대 직경 17mm 이하)을 적용하여 일치 정도를 평가하였더니 상당수의 검체에서 불일치 결과를 보였다고 한다. 그러나 48시간 배양하면 민감도를 높일 수 있다고 한다[11].

OSA의 경우 OSA-6 또는 OSA-0.6으로 48시간 배양하였을 때의 일치율이 모두 91.0%로, 24시간 배양하였을 때(79.5%)보다 높은 일치율을 보였다. 그러나 48시간 배양하였을 때에는 *mecA* 음성 균주들 중 균생장이 관찰되었던 경우가 늘어나 결과적으로 특이도가 감소하였다. 48시간 배양시 OSA-0.6이 OSA-6보다 민감도가 높지만, 특이도가 모든 검사 중 가장 낮아졌다. York 등[7]도 143균주의 CNS를 대상으로 한 연구에서 OSA-6을 사용하여 24시간 배양하였을 때에는 70%의 민감도를 보였지만 48시간 배양으로 민감도가 100%까지 올라갔다고 하였다. 또한 NCCLS의 CNS에 대한 MR 판독기준에 맞추어 OSA의 oxacillin 농도를 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮추어서 민감도를 높여려는 시도가 있었는데, 58균주의 CNS를 대상으로 한 연

구에서 OSA-0.6을 사용하여 24시간 배양하였을 때는 민감도가 93.1%로, OSA-6의 민감도 51.8%보다 훨씬 높아졌고, 48시간으로 배양시간을 연장하면 OSA-0.6은 민감도 100%, 특이도 92.6%, OSA-6은 민감도 96.3%, 특이도 100%으로 배양시간을 늘리면 둘 다 민감도가 향상되는데 OSA-0.6은 특이도가 감소하는 경향을 보였다[11]. 따라서 선별검사로서는 민감도가 높은 OSA-0.6이 더 적합하다고 하였지만, 24시간 배양시는 민감도가 낮고, 본 연구결과로는 OSA-0.6은 48시간 배양하면 특이도가 73.7%로 상당히 떨어지는 데다 48시간 배양해야 하는 것 자체가 임상 미생물 검사로 사용하기에 부적합한 점이다.

MRSA-Screen은 80.8%라는 낮은 일치율과 76.3%의 낮은 민감도를 보였다. MRSA에서는 이 검사가 상당히 좋은 민감도와 특이도를 보이지만[13-16], MRCNS를 검출하는데는 MRSA보다 성능이 떨어진다[17,18]. 이는 배양 조건에 따라 PBP2a 생성에 차이가 있기 때문이다. 따라서 민감도를 높이기 위해 먼저 oxacillin 1 μ g 디스크 주위에서 계대배양한 집락을 사용하여 PBP2a 합성을 유도하거나[18]. 응집 반응시간을 늘리고, 약양성이 나온 검체는 재검하여 만약에 다시 약양성이 나오면 양성으로 판정하는 방안이 제시되었는데[18,20], 이 경우는 위양성율이 증가할 수 있다는 단점이 있다[19]. 본 연구에서도 반응시간을 10분으로 늘리고 약양성이 나온 균주는 재검해서 판정하여 1건의 위양성 결과가 나왔다. NCCLS에서는 2002년 지침서에서 PBP2a를 검사하는 MRSA-Screen을 *S. epidermidis*를 제외한 CNS에서의 MR을 판정하는 방법으로 권장하였지만 본 연구에서는 매우 낮은 민감도를 보였고, 더욱이 *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* 등에서는 MRSA-Screen 양성인 균주의 33~100%에서 10분 후 판독시에도 응집반응이 매우 약해서 양성 여부를 판정하기 어려웠던 점을 감안하면, MRCNS 검출을 위한 임상검사로 사용하기에는 문제가 있었다.

본 연구에 포함된 *S. saprophyticus* 2주는 *mecA* 음성인데도 불구하고 ODD 양성, 48시간 배양한 두 종류의 OSA 검사에서 모두 양성이 나왔다. *S. lugdunensis*는 *mecA* 양성, MicroScan MIC 2 μ g/mL이었으나 ODD는 32 mm였다. 이와 같이 일부 CNS에서는 감수성 검사만으로는 *mecA* 양성균과 음성균을 감별하기 힘든 경우가 있다. 그 기전으로는 β -lactamase의 과형성, *mecA*에 의해 유도되는 PBP2a가 아닌 다른 PBP의 생성으로 methicillin과의 친화성 감소, methicillin을 불활화시키는 효소 생성, 또는 아직 확인되지 않은 기전 등이 제시되었다[11]. 따라서 NCCLS 지침서[10]에는 *S. saprophyticus*와 *S. lugdunensis*는 oxacillin 감수성 검사대신 MRSA-Screen이나 *mecA* PCR을 권장하고 있는데 이들 균주들이 임상적으로 심각한 감염을 일으켰을 때는 *mecA* PCR을 해야 할 것이다. 결론적으로 CNS에서의 *mecA* 유전자 양성률은 75.6%이었고, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*가 각각 95.0%, 88.9%, 85.0%로 높은 양성률을 보였다. *mecA* PCR

과는 MicroScan MIC 검사와 OSA-0.6으로 48시간 배양하여 판독하였을 때 민감도가 높았지만 OSA-0.6은 특이도가 떨어졌다. 반면 ODD 검사와 MRSA-Screen LA 검사는 민감도가 낮아서 MRCNS 검출에는 부적절하였다. 임상 미생물 검사실에서 일상적으로 *mecA* PCR을 못 할 경우 MRCNS를 검출하는데는 MIC 법을 사용하는 것이 현실적인 대안으로 생각되며, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* 등은 oxacillin 감수성 검사를 신뢰할 수 없으므로 임상적으로 심각한 감염을 일으켰을 때는 *mecA* PCR을 시행해야 할 것이다.

요 약

배 경 : Coagulase 음성 포도구균(coagulase-negative staphylococci, CNS)는 최근 병원감염의 주요 원인균으로 대두되고 있다. 따라서 임상미생물 검사실에서는 포도구균에서의 methicillin 내성(methicillin resistance, MR)을 정확하고 신속하게 검출해 주어야 한다. 본 연구는 다양한 균종의 CNS에서 MR을 검출하기 위한 여러 항균제 감수성 검사들을 평가하는 데 있다.

방법 : 1999년 4월부터 2001년 7월까지 혈액배양에서 분리된 CNS 78균주와 세계보건기구에서 보낸 정도관리 균주인 *Staphylococcus saprophyticus* (SAP) 1주를 대상으로 하였다. 균종별 분포는 *S. epidermidis* 20주, *S. hominis* (SHO) 20주, *S. capitis* 19주, *S. haemolyticus* 9주, *S. saccharolyticus* 3주, *S. saprophyticus* 2주, *S. warneri* (SWA) 2주, *S. xylosus* 2주, *S. lugdunensis*와 *S. auricularis* 각각 1주였다. MicroScan PosCombo 12, 6 μ g/mL의 oxacillin이 함유된 oxacillin 선별 평판배지(OSA-6), 0.6 μ g/mL의 oxacillin이 함유된 oxacillin 선별 평판배지(OSA-0.6), oxacillin 디스크 확산법(ODD), penicillin 결합 단백질 2a를 검출하는 MRSA-Screen 라텍스응집 검사(LA) 등의 결과를 *mecA* 유전자 PCR과 비교하였다.

결 과 : PCR 증폭에 실패한 SWA 1주를 제외하고 *mecA* 유전자 양성률은 75.6%(59/78)이었다. 각 감수성 검사들의 전체적인 일치율, 민감도, 특이도는 다음과 같다: MicroScan, 97.3%, 98.2%, 88.9%; OSA-6, 24시간 배양, 79.5%, 74.6%, 94.7%; OSA-0.6, 24시간 배양, 79.5%, 72.9%, 100%; OSA-6, 48시간 배양, 91.0%, 91.5%, 89.5%; OSA-0.6, 48시간 배양, 91.0%, 96.6%, 73.7%; ODD, 84.6%, 84.7%, 84.2%; LA, 80.8%, 76.3%, 94.7%. *mecA* 음성인 SHO와 SAP 1균주씩은 MicroScan, ODD, OSA 검사에서 모두 내성을 보였다.

결 론 : MicroScan은 SAP와 SHO를 제외한 모든 CNS에서 MR을 검출하는데 신뢰할 수 있는 방법이었다. ODD와 LA 검사는 민감도가 낮기 때문에 MRCNS를 검출하는데 부적합하였다. OSA-0.6으로 48시간 동안 배양하면 민감도는 매우 높지만 특이도가 낮아 임상검사로 사용하기에는 제한점이 있다.

참 고 문 헌

1. Marshal SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from bloodstream infections: frequency of occurrence of antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:205-14.
2. 우희연, 이장호, 이남용. 미국 NCCLS의 새 기준(1999년)에 의한 Coagulase Negative Staphylococcus 균종의 항생제 감수성 검사와 mecA 유전자 검출의 비교. 대한임상미생물학회지. 2000;3:57-61.
3. Brakstad OG and M land JA. *Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. APMIS* 1997;105:264-76.
4. Hackbart C and Chambers H. *Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanism of resistance. Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:991-9.
5. Gradelski E, Valera L, Aleksunes L, Bonner D, Fung-Tomc J. *Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. J Clin Microbiol* 2001;39:2961-3.
6. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, Sayed SE, et al. *Correlation of oxacillin MIC with mecA gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol* 2000;38:752-54.
7. York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF. *Comparison of PCR detection of mecA standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol* 1996;34:249-53.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa., 2000.*
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa., 2001.*
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa., 2002.*
11. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill 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.
12. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH. *Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. J Clin Microbiol* 1999;37:4051-8.
13. Nakatomi Y and Sugiyama J. *A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. Microbiol Immunol* 1998;42:739-43.
14. Cavassini M, Wenger A, Jatton K, Blanc DS, Bille J. *Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol* 1999;37:1591-4.
15. Marriott DJ, Karagiannis T, Harkness JL, Kearney P. *Further evaluation of MRSA-Screen kit for rapid detection of methicillin resistance. J Clin Microbiol* 1999;37:3783-4.
16. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. *Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol* 2000;38:2170-3.
17. Udo EE, Mokadas EM, Al-Haddad A, Mathew B, Jacob LE, Sanyal SC. *Rapid detection of methicillin resistance in Staphylococci using a slide latex agglutination kit. Int J Antimicrob Agents* 2000;15:19-24.
18. Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R. *Rapid detection of mecA-positive and mecA-negative coagulase-negative Staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. J Clin Microbiol* 2000;38:2051-4.
19. Zbinden R, Ritzler M, Ritzler E, Berger-Bachi B. *Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol* 2001;39:412.
20. Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H, Mack D. *Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative Staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. J Clin Microbiol* 2001;39:3700-2.
21. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. *Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. J Clin Microbiol* 1995;33:2864-7.
22. Chambers HF. *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev* 1997;10:781-91.
23. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Marino L, Kayser FH, et al. *Sequence*

comparison of mecA genes isolated from methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus

epidermidis. Gene 1990;94:137-8.