

Methicillin에 내성을 나타낸 황색 포도상 구균의 분리와 성상의 특징

광주기독병원 정형외과

김 기 수 · 최 석 철

전남대학교 의과대학

안 태 휴

= Abstract =

A Survey for Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

Ki Soo Kim, M.D. and Suck Chul Choi, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Kwangju Chrisitan Hospital, Kwangju, Korea

Tai Hew Ahn, M.D.

Department of Microbiology, Medical School, Chunnam Univeristy

Nine strains (6%) were confirmed as resistant (MIC = 20ug/ml) to methicillin (MT) among 150 isolates of staphylococcus aureus. These MT-resistant staphylococcus aureus (MRSA) strains were also turned out to be more less resistant to other antibiotics tested, such as penicillin, chloramphenicol, tetracycline, and gentamicin except for cephaloridine.

It was noteworthy, however, that strain MRSA 5 showed a relatively susceptible attitude toward most of the antibiotics tested, while being extremely resistant to MT only.

Salt (NaCl) containing (5-3%) media did not have any significant effect on the degree of MT-resistance of MRSA strains. There was, however, such a tendency as that by the addition of salt the degree of MT-resistance was lowered in the highly MT-resistant strains while enhanced in MT-susceptible ones.

It was confirmed that penicillinase did not have any effect on the MT-resistance while most of the penicillin-resistant strains produced the enzyme.

Key Words : Staphylococcus aureus, Methicillin-resistant.

I. 서 론

20 여년 전에 methicillin 이 제조되어 환자 치료에 사용된 이래, 세계 각처에서 penicillinase-resistant penicillin에 대하여 내성을 나타낸 황색포도상구균의 분리와 성상에 대한 실험예가 많이 보고되어 왔다¹⁻⁶⁾. 1960 년대는 구라파 각국에서 그리고 근래에는 미국에서도 병원내 감염황색포도상 구균에 methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA)가 상당한 빈도를 차지하고 있

다고 보고되어 있다¹⁻⁶⁾. 우리나라에서는 항생제가 처방 전없이도 자유로히 팔리고있어, 남용의 원인이되고있다, 그 까닭으로 이균이 보다 널리 분포되어 있으리라고 생각되나 아직 국내에서는 보고예를 찾아볼 수 없다. 황색 포도상구균은 아직도 병원내 감염의 주역균의 자리를 차지하고 있는 만큼 이균의 출현에 비상한 관심은 안가질 수 없다. 저자들은 전남대학교 부속병원과 광주기독병원에서 1981 년 5월과 8월 사이에 병소에서 직접채취한 가검물에서 분리한 황색포도상구균중 methicillin에 대하여 내성을 나타낸 균을 분류하여 그 성상에 대한 몇

가지 실험 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1) 공시균 : 각종 가검물에서 분리한 황색포도상구균에서 coagulase 생산, mannitol 분해 및 용혈독생산시험에 양성으로 나온 150주를 선택하였다. 각종 항생제에 대한 감수성검사를 하여 이 중 methicillin에 내성을 나타낸 균주는 따로 분류하여 보다 세밀한 각종 성장구명 실험을 하였다.

2) Coagulase 검사 : 5배로 희석한 가토의 혈장 0.5ml에 20 시간 배양한 균액을 동량 가하여 37°C에 4시간 두었다가 이 혈장의 응고 여부를 보았다.

3) Mannitol 분해시험 : phenol red broth에 mannitol을 1%의 농도가 되도록 가하여 멸균한 다음, 여기에 20 시간 자란 균액을 접종하여 37°C에 20 시간 두었다가 배지의 색이 본래의 적색으로부터 황색으로 변했으면 양성으로 판정하였다.

4) 용혈독생산검사 : 채혈한 가토혈액을 멸균된 생리식염수로 8회 원심분리 한 후 멸균생리식염수를 가하여, 이것과 1 : 2의 비율로 부유시킨 것을 5% 한천배지에 주입 혼합하여 혈액평판배지를 만들었다. 이 배지에 균을 심어 37°C, 24 시간 배양한 다음 집락의 주위에 용혈된 투명대가 명확히 생긴 것을 용혈독양성이라고 하였다.

5) 항생제감수성검사 : gentamycin(CM, 국제약품), tetracycline(TC, 종근당), cephaloridine(CP, 한일제약), penicillin(PC, 화스트), methicillin(MT, 선정), chloramphenicol(CM, 국제약품) 등 6종의 항생제를 공시하였으며 각 약제는 적당한 용액(phosphate buffer, ethanol, NaOH 또는 증류수)에 일정한 농도로 녹인 것을 원액으로 하였다. 각종실험에서는 이를 적당히 희석하여 일정한 비율이 되도록 Mueller-Hinton agar(Difco) 배지에 적

당량 가하여 잘 섞은 후 평판 배양기에 분주하였다. 공시균은 nutrient broth에 하룻밤 동안 배양한 것으로 약 1×10^6 의 균이 한 백금이에 묻도록 하여 접종하였다. 접종한 배지는 24시간 37°C에 배양하였다가 육안으로 집락형성의 유무를 관측하여 균이 전혀 자라지 않은 약제의 최소농도를 그 균에 대한 최소발육억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)라고 하였다. MT에 대하여 내성을 나타낸 균이란 MIC가 20 µg/ml 이상인 균으로 하였다⁷⁾.

6) penicillinase 생산검사 : Rapid iodometric method에 의하였다^{8,9,10)}. 이 방법은 대략 다음과 같다. Phosphate buffer (PH : 6.0)에 PC를 6,000mg/ml 농도로 용해시키고 전분은 증류수에 0.01 µg/ml 농도로 끓이면서 용해시켜둔다. 이외에 2.03gm의 iodine과 53.2gm의 potassium iodine을 증류수 100ml에 용해시켜 보관한다. 검사할 때는 소 시험관에 우선 0.1ml의 용액을 넣고 여기에 적량의 균을 접종하여 1시간 가량 방치한 후 전분용액을 두 방울 첨가하여 잘 섞은 다음 요오드용액 한 방울을 첨가한다. 이 시험관은 전분과의 작용으로 곧 청색으로 되나 1분간 흔들어서 청색이 소실 되면 penicillinase의 생산이 양성이다.

III. 성 적

임상가검물에서 분리배양된 황색포도상구균 중 coagulase검사, mannitol분해시험 그리고 용혈독생산검사에서 양성으로 나와 전형적인 황색포도상구균으로 분리되어 실험에 공시된 균은 150주 이었는데 이 균주에 대하여 PC, GM, CM, TC, MT, CP의 MIC를 측정해 본 결과는 Table 1에 표시된 바와 같다. 일반적으로 CP

Table 2. Inhibitory action of antibiotics against methicillin-resistant strains of *staphylococcus aureus*

Strain	Minimal inhibitory concentration (ug/ml)					
	MT	PC	CP	CM	TC	GM
MRSA 1	20	320	2.5	80	40	80
MRSA 2	20	0.6	2.5	80	40	80
MRSA 3	20	10	5	40	40	160
MRSA 4	20	2.5	0.3	40	40	10
MRSA 5	80	5	10	1.25	2.5	2.5
MRSA 6	40	160	0.04	40	20	10
MRSA 7	40	320	0.3	40	40	10
MRSA 8	20	80	0.6	40	0.3	80
MRSA 9	20	320	2.5	80	40	80

MRSA = methicillin-resistant *staphylococcus aureus*
See Table 1 for other abbreviations.

Table 1. Drug resistance frequency among 150 isolates of *staphylococcus aureus*

Antibiotics	No. of strains inhibited by (ug/ml)			
	1.25	10	20	80
GM	45 (30%)	75 (50%)	96 (64%)	144 (96%)
CM	3 (2)	30 (20)	60 (40)	135 (90)
TC	3 (2)	15 (10)	30 (20)	117 (78)
CP	105 (70)	150 (100)		
PC	39 (26)	81 (54)	108 (72)	132 (88)
MT	54 (36)	141 (94)	147 (98)	150 (100)

GM = gentamicin, CM = chloramphenicol,
TC = tetracycline, CP = cephaloridine,
PC = penicillin, MT = methicillin

에 대해서는 전 공시균이 예민하게 반응하여 MIC 10 μ g/ml 이상에서는 발육이 억제되지 않은 균주가 없었는데, 기타 약제에 있어서는 MT를 제외하고는 MIC 80 μ g/ml 이상에서도 발육되는 균주가 4%~22%에 달하는, 비교적 높은 내성을 나타냈다. MIC 20 μ g/ml를 기준으로 이 농도 및 이 농도 이상에서 발육억제되는 균을 MT내성균으로 규정하였는데, 이 내성균수는 9주였고 분포율은 6%이었다. 이 MT내성균 9주에 대하여 각 공시항생제에 대한 감수성검사를 실시한 결과는 Table 2에 표시된 바와 같다. 일반적으로 MT내성균은 CP를 제외한 다른 공시약제에도 내성을 나타낸 율이 높았으나 MRSA 5 균주에서는 MT에 대하여 공시균 중 최고의 내성을 나타내면서 CP를 제외한 다른 약제에 대해서는 가장 감수성이 높았다는 것이 흥미로웠다.

식염의 부가가 MT에 대한 반응도에 영향을 주었다는 보고가 있어⁸, MT내성균 중 4균주와 대조로 MT감수성균 SA 32를 골라 배지에 5%, 3%씩 함유시킨 후 전술한 바 MT 내성검사를 실시한 결과는 Table 3에 표시한 바와 같다.

일반적으로 MT에 대하여 MRSA 균과 같이 내성이 높은 균일수록 식염첨가가 이 내성을 저하시키는 경향이 있었고 SA32균에서와 같이 MT감수성균에서는 식

Table 3. Effects of NaCl concentration in media on the inhibitory activity of methicillin against *staphylococcus aureus*

Strain	NaCl in media (%)	Concentration of methicillin (ug/ml)					
		2.5	5	10	20	40	80
MRSA 1	5	+	*	+	+	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	0	+	+	+	-	-	-
MRSA 3	5	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	0	+	+	+	-	-	-
MRSA 5	5	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	-
MRSA 7	5	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	-
SA 32	5	+	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
	0	+	-	-	-	-	-

* +: Bacterial growth; -: Growth inhibited.

염 첨가가 오히려 약간 감수성을 감소시켜주는 경향이 있었다.

Penicillinase 생산은 MRSA 1, 6, 7, 8, 9 등 5균주에서 관찰되었고 MRSA 2, 3, 4, 5 등 4균주에서는 음성으로 나왔다. 이 결과는 Table 2에 표시된 바 PC의 MIC가 80 μ g/ml 이상인 균주에서만 한결같이 양성으로 나왔음을 알 수 있다.

IV. 고 찰

1945년 penicillin이 개발된 이래 한때 주춤했던 황색 포도상구균감염이 penicillinase를 생산하는 Plasmid 소유균이 출현하게 되므로서 황색 포도상구균에 의한 nosocomial infection이 문제시 되어왔다³⁰. MT는 이 penicillinase의 작용을 받지 않는 methoxyl group가 삽입되어 있으므로 PC 내성균을 극복하는데는 MT가 어느정도 효과적이라고 볼 수 있으나 근래는 이 MT에 대한 내성균의 출현이 급속도로 증가하는 경향이 보이고 있다. Dyke 등에³⁰ 의하면 포도상구균 중 MT 내성균의 분리율은 1960년에 0.06%, 1961년에 0.37%, 1962년에 0.65%, 1964년에 0.97%로 증가하였다고 하였으며, 최근 영국 등 구주에서는 분리포도상균의 20%주에서 MT 내성을 나타냈다고 보고하고 있다⁴. 미국에서는 아직 MT 내성포도상균의 분리가 종종 있어 왔으나 많이 보고 되지는 않은 것 같다^{1,3,4}). Bran 등은³⁰ Philadelphia 병원에서 320주의 포도상균을 분리하여 5% 식염첨가배지에 배양하여 검사해 보아도 MT에 대하여 내성을 나타낸 균은 한 주도 발견하지 못하였다고 보고한 예가 있을 정도다. 그러나 최근에 와서는 비단 MT 내성포도상균의 분리뿐만 아니라 이 균에 대한 억제약제의 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 학자들도 있다.

Thompson 등¹⁰은 43주의 MT내성포도상구균에 대하여 여러 종류의 β -lactam계 항생제를 비교실험한 결과 N-formimidothienamycin이 8 μ g/ml 또는 그 이하의 농도에서 90%를 발육억제하였다고 하며 polypeptide 항생제인 vancomycin은 1 μ g/ml에서 93%를 억제하였다고 했다. 또 Carlson 등¹⁰은 100주의 MT 내성포도상구균에 대해 다수의 각종 항생제를 Abbott MS-2 system에 의하여 검사 해본 결과 CM만이 유난히 고도의 억제작용을 나타 냈다고 하였으며, Kanawati 등⁷은 40주의 MT 내성 포도구균에 대한 4종의 cephalosporine의 억제작용에 배양온도가 주는 영향을 검사해본 결과 35°C에서 보다는 30°C에서 항생제 cephalotin, cefamandol, cefotaxime, moxalactam에 대한 내성이 보다 뚜렷하게 나타났다고 하였다.

MT에 대하여 내성을 나타낸 균을 보다 쉽게 알아볼 수 하기 위하여 이와 같이 여러 학자들은 온도를 낮춰 배양해보기도 하고 또 5% 식염을 배지에 가해 비교검 사해 보기도 하였다. 그러나 본 실험에서는 온도의 영향은 실험하지 않았으나 식염을 첨가한 실험성적은 MT 고내성균에 있어서는 내성도를 저하시키고 MT 감수성 균에 있어서는 오히려 MIC를 올려주는 경향을 나타냈다. 즉 식염첨가가 MT 내성균분리에는 도움을 주지 못했다.

Penicillinase는 MT를 파괴시킬 수 있으나 그 속도가 너무 느려 20시간 내외가 걸리니¹³⁾ 실험적으로는 MT는 Penicillinase에 내성이 있다고 봐도 무방할 것이다.

Sutherland 등¹⁴⁾과 Benner 등²⁾은 MT에 대한 내성은 Penicillinase 등과 같은 효소에는 무관하고 본래 지닌 저항(intrinsic resistance) 및 균의 heterogeneity에 기인한다고 하였다. 본 실험에서는 Penicillinase는 PC에 대하여 내성이 있는 균에서는 양성으로 나왔으나 PC에, 감수성이 있는 균에서는 음성으로 나왔으며, 이 penicillinase 유무가 MT 내성유무와는 전연 상관성이 없었다.

V. 결 론

1) 분리한 포도상구균 150주 중 MT에 내성을 나타낸 균주는 9주 (6%)이었다. 이 MT 내성균에 대하여 PC, CP, CM, TC, GM의 MIC를 측정해본 결과는, 일반적으로 CP에 대해서는 대단히 감수성이 높았으나 다른 약제에 대해서는 강한 내성을 나타낸 경향이 있었다. 그런데 PC에 대해서는 고도의 내성을 나타낸 균주와 상당한 감수성을 나타낸 균주가 반반으로 분포하고 있는 것이 흥미를 끌었다.

2) MRSA 5균은 MT에 최고의 내성을 나타내면서 다른 공식약제에는 CP를 제외하고는 고도의 감수성을 나타냈다는 것이 크게 주목을 끌었다.

3) 식염을 배지에 3%와 5%로 가하여 MT내성에 미치는 영향은 내성이 강하면 이를 낮춰주고 감수성이 있으면 이를 둔화시켜 주는 경향이 있었고 Penicillinase 생산은 MT 내성균의 MT 내성도와는 무관하고 오직 PC에 대한 내성도에 따라 좌우되었다.

REFERENCES

- 1) Aeilts, G.D., Sapico, H.L. and Malik, G.M.: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and infection in a rehabilitation facility. J. Clin. Microbiol.*, 16:218, 1982.
- 2) Brenner, E.J. and Kayser, F.H.: *Growing clinical*

significance of methicillin-resistant staphylococcus aureus.

- 3) Barrett, F.F., McGehee, R.F. Jr. and Finland, M.: *Methicillin-resistant staphylococcus aureus at Boston City Hospital. N. Eng. J. Med.*, 279:442, 1968.
- 4) O'Toole, R.D., Drew, W.L., Dahlgren, B.J. and Beaty, H.N.: *An outbreak of methicillin-resistant staphylococcus aureus infection. J. Amer. Med. Ass.*, 213:257, 1970.
- 5) Bran, J.L., Levison, M.E. and Kaye, D.: *Survey for methicillin-resistant Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother.*, 1:235, 1972.
- 6) Klimek, J.J., Marsik, F.J. and Bartlett, R.C.: *Clinical, epidemiological and bacteriological observation of an out-break of methicillin-resistant staphylococcus aureus at a Large Community Hospital. Amer. J. Med.* 61:340, 1976.
- 7) Canawati, H.N., Witte J.L. and Sapico, F.L.: *Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant staphylococcus aureus to four different cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother.*, 21:173, 1982.
- 8) Foley, J.M. and Perret, C.J.: *Screening bacterial colonies for penicillinase production. Nature*, 195:287, 1962.
- 9) Novick, R.P.: *Microiodometric assay for penicillinase. Biochem. J.*, 3:236, 1962.
- 10) Dyke, K.R., Jevons, M.P. and Parker, M.Y.: *Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in staphylococcus aureus. Lancet*, 1:835, 1966.
- 11) Thomason, R.L., Fisher, K.A. and Wenzel, R.P.: *In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin and other betalactam antibiotic against methicillin-resistant staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother.*, 21:341, 1982.
- 12) Carlson, J.R., Comley, F.E. and Cahall, D.L.: *Methicillin resistant staphylococcus aureus susceptibility testing with the Abbott MS-2 system. ibid.*, 21:676, 1982.
- 13) Seligman, S.J.: *Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Nature*, 209:994, 1966.
- 14) Sutherland, R. and Rolinson, G.N.: *Characteristics of methicillin-resistant staphylococcus aureus. J. Bacteriol.*, 87:887, 1964.