

## 원유시료에서 분리된 반코마이신 저항성 Coagulase-Negative Staphylococcus 균주의 특성

하남주\* · 최성숙#

\*삼육대학교 약학과, #삼육의명대학 식품과학과

(Received September 7, 2001; Revised September 18, 2001)

### Characterization of a Coagulase-Negative Staphylococcus sp. Isolated from Raw-Milk having Reduced Susceptibility to Vancomycin

Nam-Joo Ha\* and Sung-Sook Choi#

\*Department of Pharmacy, Sahmyook University and

#Department of Food Science, Sahmyook College, Chungryang P. O. Box 118, Seoul, Korea

**Abstract** — Coagulase-negative Staphylococcus sp #39, isolated from raw-milk showed reduced susceptibility to vancomycin. The minimum inhibitory concentration (MIC) for strain #39 was at 8 µg of vancomycin per ml. Transmitting electron microscopy displayed that this strain had a 2.5~3.5 times thicker cell wall than a vancomycin sensitive strain of Staphylococcus sp. The strain #39 also had an increased cell volume. These data indicate that the reduced susceptibility may be due to the thickness of the cell wall of the test strain.

**Keywords** □ Coagulase-negative Staphylococcus sp., vancomycin, MIC, cell wall.

포도상구균속 세균은 대표적인 원내감염 및 지역사회 회로부터 감염 가능한 균으로 항생제 시대가 도래하기 전에는 이 균에 의한 감염이 매우 높은 치사율을 나타내었다.<sup>1)</sup> 이 균은 병원성뿐 아니라 각종 항생제에 대해 저항성을 쉽게 획득하는 경향이 있다. Glycopeptide 계 항생제인 vancomycin은 현재 각종 항생제에 저항성을 나타내고 있는 포도상구균속 세균에 의한 감염증 치료에 유일한 항생제로 대두되고 있다.<sup>2)</sup> 그러나 포도상구균속 세균의 다른 계열의 항생제에 대한 내성 발생 경향을 볼때 본 항생제에 대해서도 쉽게 내성을 획득할 것으로 예상된다.<sup>3)</sup> 또한 coagulase-negative Staphylococci(CNS)중 주로 *S. epidermidis*와 *S. haemolyticus*등의 균주는 저농도의 glycopeptide 계 항

생제에 저항성을 나타내는 사례가 보고되고 있으며<sup>4)</sup> Daum등은<sup>5)</sup> 실험실적으로 항생제 농도를 단계적으로 높이는 방법을 이용해 vancomycin과 teicoplanin에 대한 MIC값이 8 µg/ml인 53K 균주를 분리했다. 이 균주의 형태적 특징은 세포벽이 두꺼워지고 세포의 직경이 커졌으며 lysostaphin에 대한 감수성이 저하된 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이 균주는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 지표에 따라<sup>6)</sup> Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*(GISA)로 명명되었다. Vancomycin에 대한 장구균의 고도내성은 그 기전이 많이 밝혀져 있으며 그 내성은 유전자에 의하여 매개되는 것으로 알려져있다.<sup>7)</sup> Plasmid상에 위치한 *van* 유전자를 그 유전자가 없는 포도상구균에 전이했을 때 포도상구균안에서 *van* 유전자가 발현되는 것을 확인하였으나<sup>8)</sup> 지금까지 임상에서 분리된 GISA에서 *van* 유전

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 82-2-3399-1046 (팩스) 82-2-3399-1049

자가 확인된 경우는 아직 없다.<sup>9)</sup> 즉 이러한 사실로부터 GISA 내성은 돌연변이가 쌓여서 이루어진 내인성인 것이며 유전자 교환에 의한 것은 아닌 것으로 사료된다. 지금까지 알려진 GISA 균주의 공통적인 몇가지 특징은 세포벽이 두꺼워지고 자가용해 활성의 변화, 균주의 뭉치는 정도의 차이 등의 특징이 있으나 그 특징은 균주 마다 차이가 있는 것으로 알려졌다. GISA 및 Glycopeptide-intermediate coagulase-negative Staphylococci(GICNS)균주의 기원은 항생제 사용에 따른 선택적인 돌연변이의 결과로 사료된다. 즉 병원에서 glycopeptide계 항생제의 사용의 증가의 결과 이 항생제에 대한 저항성 균주가 증가하는 것은 지금까지의 다른 항생제의 경우에 견주어 보아 당연한 결과로 여겨진다.<sup>10)</sup> 항생제의 사용은 병원에서의 사용뿐 아니라 가축에게 치료목적이나 성장촉진제의 형태로 사료중에 항생제를 첨가물로 넣는데 glycopeptide 계 항생제인 avoparcin도 이 목적으로 사용되는 항생제로서 독일등 유럽에서는 glycopeptide 계 항생제의 사료첨가를 금지하고 있다.<sup>11)</sup> 즉 사료에 첨가되는 성장촉진제로 인한 내성균의 발생을 간과할 수 없다는 이유이다.

본 연구에서는 지난 6개월간(2000.3-8) 원유 시료로부터 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 및 methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci(MRCNS) 균주를 분리하고 분리된 균주의 vancomycin에 대한 감수성을 측정하여 vancomycin에 대한 감수성이 저하된 균주를 검색하였고 그 결과 분리된 균주의 내성의 특성을 확인하여 그 결과를 보

고 하고자 한다.

**내성 균주의 분리** - 삼육대학 우유처리장에서 정기적으로 원유 시료를 제공받아 oxacillin을 10 µg/ml 농도로 함유한 Staphylococcus Medium110(Difco)에 도말후 37°C에서 48시간 배양후 생성된 집락을 선택하여 사용하였다.

**감수성 검사 및 균주선택** - NCCLS 방법에 따라<sup>6)</sup> oxacillin(Sigma), vancomycin(한국틸리), teicoplanin(Hoechst Marion Roussel)에 대한 감수성 검사를 실시하였으며 배지는 Muller-Hinton broth(Difco) 및 Muller-Hinton agar(Difco)배지를 사용하였다. 감수성 검사 결과 vancomycin의 MIC값이 8 µg/ml인 균주 #39를 선택하여 본 실험에 사용하였다.

**균주의 동정** - 선택된 균주를 Vitek gram-positive identification(GPI, version R10-1)로 동정한 결과 *Staphylococcus epidermidis*(coagulase-negative)일 가능성이 93%로 확인되었다.

**전자현미경 관찰** - #39 균주의 세포벽 두께를 감수성 균주인 #33(*Staphylococcus epidermidis*)균주 및 ATCC 표준균주인 *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228과 비교하기 위하여 전자현미경 관찰을 실시하였다.<sup>9)</sup> 균주를 Brain Heart Infusion(BHI) broth에서 대수기까지 배양 후 수확하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)로 완충된 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde 혼합액에 담가 6시간 동안 4°C에서 고정하였으며 세척한 후 동일한 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 4°C에서 2시간 동안

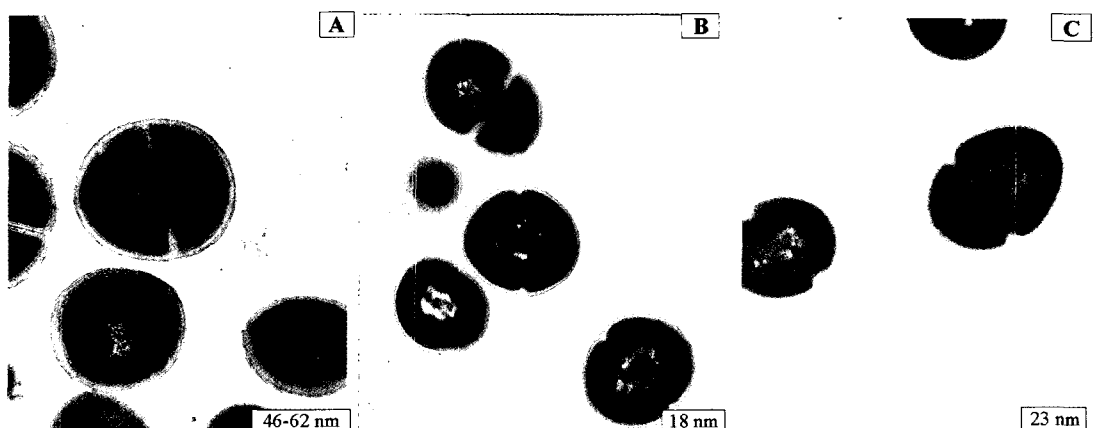


Fig. 1 - Comparison of cell wall-thickness of the test *Staphylococcus* isolates after cultivation in Brain Heart Infusion (BHI) broth. Magnification, X40,000. A. strain #39 B. strain #33 C. *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, Note; The values under each panel indicate thicknesses of the cell wall in nanometer.

후고정 하였다. 고정된 균체는 통상적인 방법에 의하여 상층농도의 에탄올을 사용하여 탈수하고 propylene oxide로 치환후 Poly/bed 812(Polyscience, Inc)에 포매하여 절편을 제작하였고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 시행한후 TEM(Hitachi, H-600)으로 관찰하였다.

그 결과 저항성 균주인 #39는 세포벽의 두께가 46~62 nm인데 비해 감수성 균주인 #33은 18 nm~23 nm로 확인되었다. 즉 vancomycin에 저항성인 #39 균주는 감수성균주인 #33균주에 비해 세포벽이 2.5-3.5배 정도 두꺼워 졌으며 세포벽내의 density도 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

본 실험결과 원내 감염균이 아닌 원유 시료에서 분리된 CNS 균주도 vancomycin에 대한 감수성이 저하된 사례를 확인하였으며 이는 사료에 성장촉진제의 형태로나 동물의 치료 목적의 형태로 glycopeptide계 항생제의 사용 가능성이 있음을 시사하고 있다. 본 실험을 통해 분리된 저항성 균주 #39균주의 내성 기전은 기존에 알려진 GISA 균주와 동일하게 세포벽 비후에 기인한 내성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

### 감사의 말씀

본 연구의 일부는 삼육대학교 및 삼육의명대학 2000년도 교비 연구비의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Wenzel, R. P., Nettleman, R. N. and Pfaller, M. A. : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; implication for the 1990s and effective control measures. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 3B), 2215 (1991).
- 2) Paulsen, I. T., Firth, N. and Skurray, R. A. : Resistance to antimicrobial agents other than  $\beta$ -lactamase. In K. B. Crossley, and G. L. Archer(ed), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, N. Y. p. 175 (1997).
- 3) Centers for Disease Control. : *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-Japan. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **46**, 624 (1997).
- 4) Schwalbe, R. S., Stapleton, J. T. and Gilligan, P. H. : Vancomycin-resistant staphylococcus. *N. Eng. J. Med.* **317**, 766 (1987).
- 5) Centers for Disease Control. : *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **46**, 813 (1997).
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards : *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 2nd ed. Approved standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. (1997).
- 7) Hiramatsu, K. : Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Res. Updates* **1**, 135 (1998).
- 8) Noble, W. C., Virani, Z. and Cree, R. G. A. : Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, 195 (1992).
- 9) Manin, N., Baddour, L. M., Offutt, D. Q., Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M. J. and Jayaswal, R. K. : Autolysis-defective mutant of *Staphylococcus aureus* : pathogenical considerations, genetic mapping, and electron microscopic studies. *Infect. Immun.* **62**, 1406 (1994).
- 10) Uttley, A. H. C., Collins, C. H., Naidoo, J. and George, R. C. : Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* **35**, 57 (1988).
- 11) Bates, J., Jordens, J. Z. and Griffith, D. T. : Farm animal as putative reservoir for vancomycin-resistant enterococci infection in man. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**, 507 (1994).