

Vancomycin 내성 장구균 검출을 위한 검색배지 및 접종방법의 비교

아주대학교 의과대학 임상병리학교실

백세연·이위교·곽연식

= Abstract =

Comparison of the Screening Media and Inoculation Methods in Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci

Sae Yun Baik, Wee Gyo Lee, and Yun Sik Kwak

*Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine,
Suwon, Korea*

Background : Vancomycin-resistant enterococci (VRE) became one of the clinically important causative organisms of the nosocomial infection lately, however, detection of VRE is still troublesome. This study was conducted to find the most effective screening media and inoculation method for detection of VRE.

Method : Twenty-nine strains of VRE (*vanA* : 5, *vanB* : 13, *vanC* : 11) that had been isolated in our laboratory and 19 strains of vancomycin-susceptible enterococci were used for this study. Vancomycin was added in concentrations of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each to brain heart infusion (BHI) agar and Mueller-Hinton (MH) agar. Each strain of organisms was inoculated as a drop using a cotton swab to each medium with the turbidity of McFarland 0.5 standard. Other inoculations were applied by micropipet, with the volume of 1 μL (10^5 CFU) and 10 μL (10^6 CFU), respectively. The growth was checked after 18, 24, and 48 hours of incubation at 35°C and the sensitivity and specificity were calculated.

Result : BHI agar appeared to be the better screening medium than MH agar. Be-

교신저자 : 백세연, (442-749)경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지 아주대학교 병원 임상병리과 의국(전화 : 0331-219-5782)

cause, the sensitivity of detecting vancomycin resistance on BHI and MH agar were 79.3% to 100%, and 62.1% to 96.5%, respectively. In case 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vancomycin was tested, use of micropipet inoculation with either 1 μL or 10 μL inoculum revealed 100% in both sensitivity and specificity. However, when using a cotton swab, the sensitivity fell to 96.5%. In case of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vancomycin, the sensitivity was 100%, the specificity was 94.7%.

Conclusion : This study indicated that the effective laboratory method for detecting VRE could be the inoculation with micropipet using BHI agar added 6 μg of vancomycin per ml.

Key Words : Vancomycin-resistant enterococci, Media, Inoculation methods

서 론

Vancomycin 내성 장구균(VRE)은 최근 증가 추세에 있고 의료기구나 의료인의 손을 통해서도 전파됨이 증명된 바 있어 원내 감염의 심각한 문제로 대두되고 있다[1]. VRE 감염시는 효과적인 치료 약제가 없으므로 감염 예방과 조기 검출이 최우선 과제이다. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 VRE 검출을 위해 vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 함유된 검색 배지를 이용하여 선별검사를 하도록 권장하고 있으나[2] 검색 배지와 접종 방법에 대해서는 아직 논란이 많다. 이에 저자 등은 효과적인 검색 배지 및 접종 방법을 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상균주

1996년 4월부터 1997년 4월까지 아주대학교 병원 임상병리과에 세균 배양 검사를 위하여 의뢰되었던 임상검체로부터 분리된 VRE 29균주와 대조균인 vancomycin 감수성 장구균 19균주를 대상으로 하였다. VRE 균주 중 *vanA*형은 5균주, *vanB*형은 13균주, *vanC*형은 11균주였다.

2. 검색배지

Brain heart infusion (BHI) 한천 배지와 Mueller-Hinton (MH) 한천 배지에 vancomycin을 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 섞어 각각 제조하였다.

3. 접종 방법

대상 균주를 McFarland 0.5관의 탁도로 맞추어 다음 세 가지 방법으로 각각의 배지에 접종하였다. ① 탁도를 맞춘 균액내에 면봉을 담궜다가 꺼내어 한 방울씩 접종하였고, ② 균액 1 μL (10^5 CFU), ③ 균액 10 μL (10^6 CFU)를 마이크로파이펫을 이용하여 접종하였다.

4. 배양 및 판독

35°C 배양기(Forma scientific Inc, Ohio, USA)에서 48 시간동안 배양 하였으며 18 시간, 24 시간, 48 시간 후에 집락의 유무를 관찰하였고 집락수가 1개 이상이면 vancomycin 내성으로 간주하였다.

5. 평가

민감도와 특이도를 계산하여 효과적인 검색배지와 접종방법에 대하여 평가하였다.

결 과

1. 민감도

BHI 한천 배지를 이용한 경우가 MH 한천 배지를 이용한 경우에 비하여 민감도가 높았다. 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지를 사용하였을 때 1 μL 와 10 μL 균액을 접종한 경우 민감도가 18, 24 및 48 시간에 모두 100%를 나타내었다. 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지 사용시는 1 μL 접종시 86.2%, 10 μL 접종시 93.1%로 민감도가 떨어졌다. MH 한천

Table 1. Sensitivity(%) of detecting vancomycin resistance on BHI and MH agar containing 4 μg , 6 μg & 8 μg of vancomycin per mL after 18, 24 & 48 hours incubation.

	18 hrs	24 hrs	48 hrs
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)			
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)			
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)			

BHI : Brain heart infusion agar, MH : Mueller-Hinton agar

(1),(10),(C) : Inoculation of 1 μL (10^5 CFU) & 10 μL (10^6 CFU) by micropipet and a drop of cotton swab (McFarland 0.5).

배지를 사용하였을 때는 62.2%에서 93.1%까지의 다양한 민감도를 나타냈다. 접종방법에 따른 민감도는 마이크로피펫으로 접종한 경우가 65.5%에서 100%로 62.1%에서 96.5%의 민감도를 보인 면봉을 사용했을 때보다 높았다. 배양 시간에 따른 차이에서는 48 시간 배양시 민감도가 가장 높았다 (Table 1).

2. 특이도

4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 포함한 BHI 한천 배지와 MH 한천 배지에 10 μL 의 균액을 접종한 경우 24 시간과 48 시간 후에 판독시 특이도가 94.7%로 나온 것을 제외하고는 모두 100%의 특이도를 보였다(Table 2).

고 찰

VRE에는 *vanA*, *vanB*, *vanC*의 3 가지 표현형이 있다[3]. *vanA*형은 고농도의 vancomycin과 teico-

planin에 내성을 보이고 유도성이며, *vanB*형은 *vanA*형과 달리 vancomycin에 대해서는 다양한 내성 정도를 보이고 teicoplanin에 대해서는 감수성을 보인다[4]. 그러나 일부 *vanB*형 장구균은 teicoplanin에 대한 내성도 나타내는 경우가 있어 표현형만으로는 *vanA*형과 감별이 불가능할 수도 있다. *vanC*형은 *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 및 *E. flavescence* 균종에만 표현되는 구성적 내성으로 vancomycin에 대해 저도 내성을 보이고 teicoplanin에는 감수성을 보인다[5]. VRE는 1989년 이후 미국과 유럽에서 빠른 속도로 증가되어 미국 National Nosocomial Infections Surveillance System에 따르면 그 빈도가 1989년의 0.3%에서 1993년에는 7.9%로 늘어났고 특히 집중치료실에서의 빈도는 0.4%에서 13.6%로 증가하였다[6]. VRE 감염의 문제점은 첫째, 치료약제로 이용할만한 항생제가 적다는 점, 특히 VRE는 장구균의 치료에 주로 사용되었던 암피실린이나 아미노글라이코사이드 등에도 고도내성을 보이는 다약제 내성 균주인 경우가 많

Table 2. Specificity(%) of detecting vancomycin resistance on BHI and MH agar containing 4 μg , 6 μg & 8 μg of vancomycin per mL after 18, 24 & 48 hours incubation.

	18 hrs	24 hrs	48 hrs
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	94.7	94.7
BHI 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	94.7	94.7
MH 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	100	100
BHI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	100	100
MH 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	100	100
BHI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)	100	100	100
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10)	100	100	100
MH 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	100	100	100

BHI : Brain heart infusion agar, MH : Mueller-Hinton agar

(1),(10),(C) : Inoculation of 1 μL (10^5 CFU) & 10 μL (10^6 CFU) by micropipet and a drop of cotton swab (McFarland 0.5).

고[7] 둘째, VRE의 vancomycin 내성유전자가 황색포도상구균등의 다른 그람양성균에 전파될 수 있다는 점이고[5] 셋째, 최근에는 의료기구, 환경 및 의료인의 손에 의하여 전파가 가능함이 증명되어[1] 병원 감염의 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 미국 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)에서 VRE의 전파를 방지하기 위하여 많은 권고안[8]을 제시하고 있고 무엇보다도 신속하고 정확한 검출이 중요하나 기존의 디스크 확산법[9]이나 자동 항균제 감수성 검사 방법으로는 VRE를 검출하지 못하는 경우가 있다[10]. NCCLS에서 vancomycin 한천배지를 이용한 검사를 권장하고 있지만[2] VRE 검출을 위한 검색배지 및 접종방법은 보고자[10-13]마다 다르며 각 기관마다 권장하는 것도 다른 실정이다. Jorgensen 등[11]은 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 차가운 BHI 한천 배지에 섞어 검사를 하였는데 접종을 하는 방법을 마이크로파이펫을 이용한 방법과 면봉을 이용한 방법을 사용하였고 두 경우 모두 같은 결

과가 나왔으므로 면봉을 사용하는 것이 간편하고 경제적이라고 보고하고 있다. 하지만 본 저자의 연구에서는 면봉을 이용한 경우 특이도는 변화가 없었으나 민감도가 다른 두가지 검사방법에 비해 떨어졌다. 그 이유는 면봉을 한천배지에 접종할 때 숙련치 못한 기술로 시행하여 균이 배지에 덜 접종되었을 것으로 추측된다. 즉 검사자가 바뀌거나 익숙하지 못한 경우에는 VRE 검출에 실패할 수도 있다고 생각된다. 배지 종류에 따른 민감도를 살펴보면 BHI 한천 배지는 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞어 1 μL 와 10 μL 의 균액을 마이크로파이펫으로 접종한 경우 100%의 높은 민감도를 나타낸 반면 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 경우 79.3%에서 93.1%까지 낮은 민감도를 나타냈다. Vancomycin을 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 섞은 BHI 한천 배지에 면봉으로 접종한 경우 총 6 균주가 자라지 않았는데 이중 2 균주가 *vanB*형이었고 나머지 4 균주는 *vanC*형이었다. 균이 자라지 않았던 *vanB*형 2 균주의 vancomycin에 대한 최소발육저지농도(min-

imum inhibitory concentration, MIC)는 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였기 때문에 검색배지에서 자라지 않은 이유는 접종방법의 문제로 균수가 적게 접종되었을 것으로 추정되며, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지에 10 μL 의 균액을 자동파이펫으로 접종한 경우 2 균주가 자라지 않았는데 2 균주 모두가 *vanC*형이었다. MH 한천 배지는 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 MH 한천 배지에 10 μL 의 마이크로파이펫으로 접종한 경우 24 시간과 48 시간에서 100%의 민감도를 보인 것을 제외하고 모두 62.1%에서 96.5%까지 낮은 민감도를 보였다. Vancomycin을 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 섞은 MH 한천 배지에 면봉으로 접종한 경우 총 11 균주가 자라지 않았는데 이중 1 균주가 *vanB*형 이었고 나머지 10 균주는 *vanC*형 이었다. Vancomycin을 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 섞은 MH 한천 배지에 1 μL 의 균액을 마이크로파이펫으로 접종을 한 경우 1 균주가 자라지 않았는데 *vanC*형 이었다. *VanC*형 균주가 낮은 민감도를 보이는 이유는 *vanC*형이 vancomycin에 저도내성을 보이기 때문으로 생각되며 이 결과는 Swenson 등[10], Jorgensen 등[11], 및 Edberg 등[13]의 연구와도 일치하였다. 특이도는 BHI 한천 배지와 MH 한천 배지에 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 경우 24 시간과 48 시간 후에 94.7%로 나온 것을 제외하고 100%의 높은 특이도를 보였는데 이러한 결과는 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지에서 특이도가 71%에서 96%까지로 다양하고 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 함유한 BHI 한천 배지에서는 특이도가 92%에서 100%까지인 Swenson 등[10]의 연구와도 일치하였다. 배양시간을 18, 24 및 48 시간 동안 비교했을 경우 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지에 면봉을 이용한 경우와 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 MH 한천 배지에 면봉이나 10 μL 의 균액을 마이크로파이펫으로 접종한 경우 24 시간까지 관찰되지 않던 균이 48 시간에 관찰이 되었던 것 이외의 경우에는 24 시간에 관찰한 것과 48 시간에 관찰한 것이 동일 하였으므로 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 BHI 한천 배지를 이용한다면 24 시간 관찰만으로 검출에 문제가 없을 것으로 생각되었다. 24 시간까지 관찰되지 않던 균이 48 시간에 관찰이 되었던 경우는 2 균주였는데 모두가 *vanC*형이었다. 상기 결과로 볼 때 VRE 검출을

위해 BHI 한천 배지에 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞어 1 μL 나 10 μL 의 균액을 마이크로파이펫으로 접종하고 24 시간이후에 판독하는 것이 이상적이라 사료된다.

요 약

배 경 : Vancomycin 내성 장구균 (VRE)은 최근 증가 추세에 있어 원내 감염의 심각한 문제로 대두되고 있으나 이를 검출하는데는 아직 표준화된 방법이 없다. 이에 저자들은 VRE를 검출하기 위한 적절한 검색 배지 및 접종 방법을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 : 본원에서 분리된 VRE (*vanA*:5, *vanB*:13, *vanC*:11) 29 균주와 대조균인 vancomycin 감수성 장구균 19 균주를 대상으로 하였으며 검색배지로는 brain heart infusion (BHI) 한천 배지와 Mueller-Hinton (MH) 한천 배지에 vancomycin을 각각 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 섞어 제조하였고, 각 균주를 McFarland 0.5관의 탁도로 맞추어 각각의 배지에 면봉을 이용하여 한 방울씩 접종하고, 또한 1 μL (10^5 CFU)와 10 μL (10^6 CFU)씩 마이크로파이펫을 이용하여 접종한 후 35°C에서 18 시간, 24 시간, 48 시간 후 집락의 유무를 관찰하고 민감도와 특이도를 구하였다.

결 과 : BHI 한천 배지가 MH 한천 배지보다 민감도가 높았으며, 접종배지는 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞은 경우 1 μL 혹은 10 μL 로 접종하였을 때 민감도와 특이도가 모두 100%였지만 면봉을 사용한 경우에는 민감도가 96.5%로 떨어졌다. Vancomycin을 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 섞은 경우 민감도는 높았지만 특이도가 떨어졌다.

결 론 : VRE 검출을 위해 BHI 한천 배지에 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 vancomycin을 섞어 마이크로파이펫으로 접종하는 것이 가장 이상적이라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Livornese LL, Dias S, Samuel C, Romanowski B, Taylor S, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, Levison ME, Johnson CC. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by

- electronic thermometer. *Ann Intern Med* 1992;117:112-6.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifth information supplement M100-S5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
 3. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1992;91(suppl 3B):72S-5S.
 4. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of 4 ug/ml의 glycopeptide resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1563-71.
 5. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:10-5.
 6. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States, 1989–1993. *MMWR* 1993; 42:597-9.
 7. Low DE, Willey BM, McGeer AJ. Multi-resistant enterococci : A threat to the surgical patient. *Am J Surgery* 1995;169: (Suppl 5A): 8S-12S.
 8. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee(HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16:105-13.
 9. Swenson JM, Ferraro MJ, Sham DF, Charache P. New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. *J Clin Microbiol* 1992;30: 2525-8.
 10. Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahn DF, Doern G, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, Zabransky RJ, Tenover FC. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:1700-4.
 11. Jorgensen JH, McElmeel ML, Trippy CW. Comparison of inoculation methods for testing enterococci by using vancomycin screening agar. *J Clin Microbiol* 1996;34:2841-2.
 12. Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, Williams G, Scriver SR, Phillips A, Low DE. Detection of vancomycin resistance in enterococcus species. *J Clin Microbiol* 1992;30:1621-4.
 13. Edberg SC, Hardalo CJ, Kontrickn C, Campbell S. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994;32: 2182-4.