

Coagglutination에 의한 β -용혈성 연쇄구균의 혈청군 동정

연세대학교 의과대학 임상병리과¹ 미생물학교실²

정윤섭¹ · 윤양숙¹ · 김윤정¹ · 이삼열¹ · 김성광² · 이병수² · 김주택²

=Abstract=

Serological grouping of β -hemolytic streptococci by a coagglutination technique

Yunsep Chong,¹ Yang Sook Yoon,¹ Yoon Chung Kim,¹ Samuel Y. Lee,¹
Sung Kwang Kim,² Byung Soo Lee,² and Joo-Deuk Kim²

Department of Clinical Pathology¹ and Microbiology², Yonsei University College of Medicine

Identification of group A β -hemolytic streptococci is very important to provide an appropriate preventive measure of possible rheumatic fever and acute glomerulonephritis. For such purpose bacitracin susceptibility of streptococci because of its simplicity has been most widely used despite of its occasional faulty results. Recently, a coagglutination technique was advocated using streptococcal group specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. This study was conducted to evaluate the coagglutination technique using reagents prepared by ourselves. The specificity, reproducibility and stability were ascertained and the following results were obtained.

1. The identification by coagglutination technique using our own reagent gave the same results compared with the Lancefield precipitation technique. The result also agreed with the Phadebact grouping.

2. There were no variation in group A and B identification due to lot difference. However, there were a few discrepant results in group C and G identification which was conducted in different days with different lots of our reagent.

3. The stability of our reagents was less satisfactory compared to the commercial product. An effort to improve the stability was considered necessary.

4. For coagglutination, it was found convenient to use supernatant of Todd-Hewitt broth incubated for 24 hours. Both parafin-ringed slide glass and RPR card gave comparable results and the former could be used when the latter is not available.

서 론

β -용혈성 연쇄구균 감염증 특히 A군에 의한 것은 그 속발증으로 류마티 열이나 급성 사구체신염 같은

심각한 상태를 유발할 수 있기에 매우 중대한 임상적 의의를 가진다. 따라서 감염을 일으킨 연쇄구균의 군별을 혈청학적으로 동정하는 것은 환자의 치료 방침 결정에 절대 필요한 요건이 된다.

연쇄구균의 군 동정은 원법인 Lancefield의 침강반

공 이외에도 형광항체법 등이 있으나 그 술식이 복잡하여 임상검사에는 부적당하여 간편한 bacitracin 감수성 검사가 널리 이용되어 왔다¹⁾. 그러나 이 방법은 비특이적 검사이므로 그 결과가 반듯이 Lancefield법과 일치하지 않는 흠이 있다²⁾.

Christensen 등³⁾은 *Staphylococcus aureus*의 세포벽에 있는 protein A에 연쇄구균 균 항혈청을 결합시킨 것을 이용하여 coagglutination으로 쉽게 군 동정을 할 수 있는 방법을 발표하였다. 이 원리에 의한 "Phadebact Streptococcus test"라는 상품이 이미 시판되고 있다(Pharmacia diagnostics, Uppsala, Sweden). 그러나 이 제품은 가격이 비싸고 유효기간이 짧아서 우리가 이것을 임상 검사에 이용하기에는 애로가 있다. 이에 저자들은 이러한 난점을 해결하고자 이 시약의 자가 제조를 시도하였으리 그 특이성과 재현성에 만족스런 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약 제조와 coagglutination 술식은 Lelend 등⁴⁾의 방법을 다소 변경하여 사용하였다.

S. aureus 부유액

S. aureus Cowan I 주(ATCC 12598)을 Tryptic soy broth (Difco)에 접종하여 35°C에 하루밤 배양한 후 phosphate-buffered saline (PBS; FTA-ABS용을 사용)으로 5회 세척하고 packed cell을 만든후 9배의 0.5% formaldehyde 함유 PBS에 부유시켰다. 실온에 3시간 두었다가 PBS로 3회 세척하고, 다시 1:10의 비가 되게 PBS에 부유시켰다. 이것을 80°C의 수욕조내에서 때때로 흔들면서 1시간 처리한 후 다시 PBS로 3회 씻은후 PBS로 1:10의 부유액을 만들었다. 이 부유액은 냉장고에 보존하였다.

Coagglutination 시약 제조

냉동건조된 Lancefield군(A,B,C,G) 검사용 연쇄구균 항혈청(Difco)을 지시에 따라 용해시켜 사용하였다. *S. aureus* 부유액 1ml에 대해 항혈청 0.1 ml를 넣은 후 실온에서 3시간 방치중 매 30분마다 30초씩 흔들여 섞었다. PBS로 1회 세척한 후 PBS로 원래의 양이 되게 한 후 다시 PBS로 1:3으로 희석하였다. 이 시약 10 ml에 대해 0.1 ml의 그람염색용 crystal violet용액을 넣은 후 완성된 시약은 냉장고에 보존하였다.

Coagglutination 시험

시험대상 β -용혈성 연쇄구균을 2 ml의 Todd-Hewitt broth (Difco)에 접종하여 35°C의 CO₂ 배양기에 하루

밤 배양한 후 그 상청액을 시험에 사용하였다.

시험할 상청액 한방울씩을 RPR 시험용 Card(Hyonsen, Westcott and Dunning) 4개원에 놓고 A,B,C,G 시약 한방울씩을 넣은 후 wood stick으로 흔한 후에 90 rpm으로 5분간 회전하였다. 반응은 Lelend 등⁴⁾의 기준에 따랐다. 주 원의 중앙에 응집이 없고, 원 전체가 청색일 때는 음성으로, 원의 중앙에 응집이 있고, 원 주위에 청색이 별로 없을 때는 양성으로 판독하였다.

Lancefield 침강반응은 hot acid로 추출한 항원용액에서 capillary법으로 시험하였고⁵⁾, Phadebact 시험은 상청액법으로 시험하였다.

결 과

Lancefield시험에 의해 A,B,C 혹은 G군으로 동정된 22개 군주를 자가제조한 시약으로 coagglutination을 하였다. 군주에 따라서는, 특히 B,C,G군 사이에 다소의 교차반응이 있었으나 빠르고 강한 반응을 택하였을 때 그 결과는 모두 일치되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of the results of streptococci grouping by the precipitation and by the coagglutination with homemade reagent

Group by Precipitation	No. of strains positive by coagglutination			
	A	B	C	G
A	7	0	0	0
B	0	7	0	0
C	0	0	4	0
G	0	0	0	4
Total (22)	7	7	4	4

Table 2. Comparison of the results of streptococci grouping with the Phadebact reagent and with homemade reagent

Group by Phadebact test	No. of strains positive with home made reagent			
	A	B	C	G
A	3	0	0	0
B	0	5	0	0
C	0	0	9	0
G	0	0	0	12
Total (29)	3	5	9	12

Table 3. Reproducibility of grouping with different lots of homemade reagents

Group by Lot I (No. of strain)	No. of strains positive with Lot II				
	A	B	C	G	NG*
A 7	7	0	0	0	0
B 5	0	5	0	0	0
C 9	0	0	5	4	0
G 15	0	0	0	15	0
NG 4	0	0	0	0	4
Total 40	7	5	5	19	4

*NG, not groupable.

Table 4. Stability of the home-made reagents

Lot	Date produced	Stability(day)
I	Apr 13	24
II	May 22	17
III	Jun 29	10
Phadebact control	Mar 21*	20~42**

*Date of reconstitution.

**After 20 days the reaction became weaker, but could be used upto 42 days.

29개의 균주를 Phadebact 시약과 자가제조시약으로 coagglutination한 결과는 모두 일치하였다(Table 2). Phadebact의 C시약은 균주에 따라 상당히 강한 교차 반응을 보였다.

자가제조 시약의 제조 lot에 따른 차이가 있는지 보기 위해 40개의 균주를 다른 lot의 시약으로, 다른 시기에 반복 검사한 결과는 36개가 일치되었다. 4개 균주는 C로 혹은 G로 잘못 동정되었다(Table 3).

자가 제조 시약의 안정성을 보기 위하여 일상 쓰는 병장고에 보관해 두고 일상검사에 사용하면서 조사한 유효기간은 10~24일이었다(Table 4). Phadebact 시약은 완충액을 가해 녹인 뒤 20일간은 강한 반응을 보였고, 그 후 42일까지는 약한 반응을 보였다.

II 활

A군 연쇄구균 감염이 류마티 열이나 급성 사구체신염을 촉발하는 것은 잘 알려진 바이나 최근에는 B군 감염도 특히 신생아에서는 치명률이 높음이 보고되고 있다⁶⁾. 따라서 군 동정은 역학적인 이유에서 뿐만 아니라, 촉발증 예방을 위한 치료의 필요성 유무를 결정

하기 위하여도 반듯이 필요하다고 하겠다.

연쇄구균의 군 동정법에는 원법인 침강반응 등 여러 가지가 있으나 술식이 복잡하고, 장시간이 소요되며, 값이 비싸게 치이므로 일상검사에 널리 이용되지 못하고 bacitracin 감수성 시험으로 A군인지 아닌지만을 감별하여 왔다¹⁾. 그러나 bacitracin법은 0.5%의 위음성과 군에 따라서는 8%의 위양성이 있고²⁾ disk의 제조회사에 따라서도 그 성적에 차이가 크다고 보고되어 있다¹⁾. 실제로 저자들도 같은 disk라도 그 사용 경과 중 역가가 떨어져 그 성적이 잘못되는 일이 있음을 흔히 경험하고 있다.

Protein A는 *S. aureus*의 세포벽에 있는 성분으로³⁾ 항체의 Fc와 결합하는 성상을 가지고 있다⁶⁾. 포도구균과 결합한 항체의 Fab는 유리상태로 있기 때문에 이것이 특이항원과 만나면 coagglutination을 이르게 된다.

Christensen 등³⁾은 Protein A를 많이 가진 *S. aureus* Cowan I주에 연쇄구균 군 항혈청을 흡착시키고 이것으로 slide 응집반응을 하여 군 동정을 하는 방법을 보고하였다. 이 방법은 술식이 간단하면서 그 성적은 침강반응과 일치율이 높음이 확인되었다³⁻¹¹⁾.

저자 등의 예비실험 결과로 coagglutination의 여러 방법중^{3,4,12-15)}, Todd-Hewitt 배지에 24시간 배양하고 그 상청액을 사용하는 법을 택하였다. 이 법에는 균부 유액을 쓸때의 saline agglutination 문제가 없다. Lelend 등⁴⁾은 RPR시험용 card에서 응집을 하나, Parafin ring을 만든 slide glass에서도 같은 결과를 보였으므로 통상검사에 이 방법을 쓰기로 하였다.

침강반응으로 혈청군이 동정된 22주의 coagglutination 결과는 모두 일치되었고(Table 2) Phadebact 시약으로 시험된 29주도 그 결과가 모두 일치되어서(Table 2) 사용된 재료와 술식으로 특이성 높은 시약을 만들 수 있음을 알았다. 그러나 자가제조시약이나 Phadebact 시약이나 교차반응을 보이는 일이 있었는데 특히 C군 시약이 그러하였다. 이러한 현상은 Hahn과 Nyberg¹⁶⁾도 보고하였고, 더 빠르고 강한 반응을 양성으로 판독하되 균을 알고 있는 세균으로 시약의 정도관리를 해야 할 것으로 생각되었다.

제조 lot에 따른 성적의 차이 유무를 검토한 결과에서, 4개 균주는 C군으로도 G군으로도 양성반응이 나와서 어려운 점이 있었다(Table 3).

자가제조시약은 그 유효기간이 10~24일밖에 되지 않았다. 이것은 Phadebact의 것보다 짧았으며, 개선되어야 할 점이었다. 유효기간이 가장 짧았던 lot는 6월에 만든 것이었는데 높은 기온의 영향도 생각할 수 있

졌다. 이 짧은 유효기간의 문제가 해결될 때까지는, *S. aureus* 부유액을 제조해서 냉장해 두고 필요시에 항혈청을 흡착시켜 사용하는 것이 편리할 것으로 생각되었다.

제조한 시약으로 임상분리주를 시험했을 때 대부분이 A, B, C 혹은 G군으로 반응되었으나 이들중 상당수가 침강반응에서는 음성이었다. 이것은 coagglutination 시험이 위양성이었기 보다는 그 감도가 높기 때문으로 생각된다. 즉 Hryniewicz 등¹⁷⁾은 예가 낮은 항혈청으로는 침강반응에서 위음성인 예가 많고 coagglutination은 강도가 높아서 양성 반응율이 더 높음을 보고한 바 있다. 이 높은 감도에 곁들여 또 한가지 장점은 항혈청이 극히 소량 필요한 점이다.

제조시약의 정도관리를 위하여는 시험하고 남은 Todd-Hewitt 배양 상청액을 장기간 사용할 수 있었다.

결 론

β -용혈성 연쇄구균의 혈청 군 동정을 위한 coagglutination 시약을 시험제조하여 그 특이성, 재현성 및 안정성을 검토한 바 다음 결론을 얻었다.

1. 제조 시약에 의한 군파 침강법에 의한 군은 일치하였고, Phadebact 시약에 의한 군파도 일치하였다. 그러나 제조 lot에 따라서는 일부 균주가 C군으로도 G군으로도 잘못 동정되는 일이 있었다.

2. 시약의 안정성은 Phadebact 시약에 비하여 좀 낮았고 따라서 앞으로 개량이 필요하였다.

3. coagglutination 방법은 Todd-Hewitt에 24시간 배양한 상청액을 쓰는 것이 편리하였고, RPR 시험용 카드 대신에 parafin ring이 된 slide glass를 사용할 수 있다고 판단되었다.

S. aureus Cowan I 주를 분양하여 준 東京慈惠會 醫科大學 益田昭吾教授께 감사드립니다.

References

- 1) Chitwood L.A., Jennings, M.B., Riley, Jr. H.D.: Time, cost, and efficiency study of identifying group A *Streptococcus* with commercially available reagents. *Appl. Microbiol.*, **18**:193, 1969.
- 2) Pollock, H.M., and Dahlgren, B.J.: Distribution of *Streptococcal* groups in clinical specimens with evaluation of Bacitracin screening. *Appl. Microbiol.*, **27**:111, 1974.
- 3) Christensen, P., Kahlmoter, G., Jossion, S.,

and Kronvall, G.: New method for the serological grouping of *Streptococcus* with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. *Infect. Immunity*, **7**:881, 1973.

- 4) Lelend, D.S., Lachapelle, R.C., and Wlodarski, F.M.: Method for rapid detection of group B streptococci by coagglutination. *J. Clin. Microbiol.*, **7**:323, 1978.
- 5) Lennette, E.H., Spaulding, E.H., and Truant, J.P.: *Manual of clinical microbiology*. 2nd ed., Am. Soc. Microbiol., Washington, 1974. p. 102.
- 6) Horn, K., Meyer, W.T., Wyrick, B.C. and Zimmerman, R.A.: Group B streptococcal neonatal infection. *JAMA*, **230**: 1165, 1974.
- 7) Kronvall, G., Quite, P.G., and Williams, R.C.: Quantitation of staphylococcal protein A: Determination of equilibrium constant and number of protein A residues on bacteria. *J. Immunol.*, **104**:273, 1970.
- 8) Forsgren, A., and Sjöquist, J.: "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. *J. Immunol.*, **97**: 822, 1966.
- 9) Arvilommi, H.: Grouping of β -hemolytic streptococcus by using coagglutination, precipitation or bacitracin sensitivity. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, **84**:79, 1976.
- 10) Arvilommi, H., Uurasmaa, O., and Nurkkala, A.: Rapid identification of group A, B, C, and G β -haemolytic streptococci by a modification of the coagglutination technique. Comparison of results obtained by coagglutination, fluorescent antibody test, counter-immunoelectrophoresis, and precipitin technique. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, **86**:107, 1978.
- 11) Stoner, R.A.: Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, **7**:463, 1978.
- 12) Edwards, E. A., and Larson, G. L.: New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by

- coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci. Appl. Microbiol.*, **28**:972, 1974.
- 13) Rosner, R.: *Clinical evaluation of a rapid four hour serological grouping of groups A,B,C and G beta streptococci using the Phadebact streptococcus test. J. Clin. Microbiol.*, **6**:23, 1977.
- 14) Kirkegaard, M.K., and Field, C.R.: *Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B streptococci. J. Clin. Microbiol.*, **6**:266, 1977.
- 15) Slifkin, M., Engwall, C., and Pouchet, G.R.: *Direct-plate serological grouping of β -hemolytic streptococci from primary isolation plates with the Phadebact streptococcus test. J. Clin. Microbiol.*, **7**:356, 1978.
- 16) Hahn, G., and Nyberg, I.: *Identification of streptococcal groups A,B,C and G by slide co-agglutination of antibody sensitized protein A-containing staphylococci. J. Clin. Microbiol.*, **4**:99, 1976.
- 17) Hryniewicz, W., Heczko, P.B., Luttkick, R., and Wannamaker, L.W.: *Comparison of three methods for grouping streptococci. J. Clin. Microbiol.*, **4**:28, 1976.