

소변 검체에서 분리된 Cysteine 요구성 *Escherichia coli* 1예

서울대학교병원 진단검사의학과¹, 서울대학교 의과대학 검사의학교실²

강 지 상¹ · 주 세 익¹ · 김 의 종^{1,2}

A Case of Cysteine-Requiring *Escherichia coli* Isolated from Urine Specimen

Ji-Sang Kang¹, Sae-Ick Joo¹, and Eui-Chong Kim^{1,2}

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul 110-744, Korea¹

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University, College of Medicine, Seoul 110-744, Korea²

A case of recurrent urinary tract infection by cysteine-requiring *Escherichia coli* in a 5-years-old child with congenital vesicoureteral reflux is described. This bacterium was not grown on MacConkey agar plate for overnight culture, and after 48hrs, tiny colonies were observed. These colonies were not identified by VITEK2 and Walkaway 96i without cysteine supplementation. The isolate was susceptible for cefotetan, ciprofloxacin and imipenem, and resistant for piperacillin/tazobactam, cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, amikacin, gentamicin, and tobramycin.

Received 4 May 2009/Returned for modification 3 June 2009/Accepted 25 June 2009

Key words : Cysteine-requiring *Escherichia coli*, Recurrent urinary tract infection

I. 서 론

균이 성장하는 데 cysteine이 요구되는 *Escherichia coli* 가 1952년 Gillespie에 의해 처음 보고된 이후 장내세균군의 일부 중에서는 여러 가지 영양소에 의존적으로 성장하는 영양요구성 혹은 영양의존성 세균이 임상검체로부터 드물지 않게 분리되고 있으며(Mclver와 Tapsall, 1990), 지속성 요로이상을 가진 노인환자에서는 cysteine 요구성 *E. coli*가, 장기간 trimethoprim/sulfamethoxazole을 투여받은 환자의 소변에서는 thymine 요구성 *E. coli*가 보다 빈번하게 분리된다고 하였다(Tapsall 등, 1974). 요로

감염의 *E. coli*와 *Klebsiella* spp. 중 1.5%가 cysteine 요구성이라는 보고도 있다(Tapsall와 Mclver, 1986; Mclver와 Tapsall, 1990). 드물기는 하지만 이들 영양요구성 *E. coli*에 의한 패혈증이 보고되기도 하였다(Tapsall와 Mclver, 1986; Yuen 등, 1990).

이들은 소위 “미세 집락(dwarf colony, 직경 0.5 mm 이하)”을 형성하거나 잘 성장하지 않는다(Mclver와 Tapsall, 1990). 이들은 cysteine 합성과정에서 황산염 동화작용이 결핍되거나, 아미노산의 최종 산화산물인 cystine이 결핍됨으로써, 환경으로부터 직접 cysteine을 흡수하지 않고는 단백질 합성을 하지 못하는 돌연변이종으로 알려져 있다(Mclver와 Tapsall, 1987; Mclver와 Tapsall, 1993).

국내에서도 여러 검사실에서 미세 집락 *E. coli*에 대한 경험이 있을 것으로 생각되지만, 이러한 영양요구성 장내세균에 대한 문헌 보고는 없었다. 저자들은 소변검체로부터

교신저자 : 강지상, (우)110-744, 서울시 종로구 대학로 101번지, 서울대학교병원 진단검사의학과
TEL : 02-2072-2795, 017-751-4336
E-Mail : integra800@naver.com

터 cysteine 요구성 *E. coli*를 경험하였기에 균의 분리, 동정 및 항생제감수성 시험과정에 대하여 보고한다.

II. 증 례

1. 대상환자

환자는 만 5세 여아로 태어날 때부터 선천성 방광 요로 역류증을 갖고 태어나 소아 비뇨기과로 내원하였으며, 18개월부터 지금까지 비뇨기과 수술적 교정치료를 수차례 진행하였음에도 불구하고 재발성 요관 감염으로 판단되었다.

2. 검사소견

요검사서 백혈구수가 100/HPF 이상, 세균이 2+이었고, 말초혈액검사는 백혈구 수는 $6.9 \times 10^9/L$ 이였으며, 혈색소와 적혈구용적은 9.8 g/dL와 29.8%, 혈소판은 $344 \times 10^9/L$ 이었다. 혈중 전해질은 sodium이 139 mmol/L, potassium이 4.4 mmol/L, chloride 107 mmol/L, TCO₂ 24 mmol/L이었다. Ca과 P는 10.0 mg/dL과 4.5 mg/dL이었으며, BUN과 creatinine은 9 mg/dL과 0.4 mg/dL이었다.

3. 임상경과

26개월째 외측방광절단 및 요관 방광 문합술을 실시한 후 입원 중엔 ceftazole 및 amikacin을 투여했으며 퇴원 시엔 cefixime과 trimethoprim/sulfamethoxazole을 집에서 복용하였다 32개월째 요관류 봉합술, 39개월째 요관 방광 문합술과 요관 개복술 후에도 요관 감염은 계속 진행되었으며, 40개월째 소변배양에서 균이 자라지 않아 ceftazole 및 amikacin은 중지하고 cefixime만 지속적으로 투여하고 있으며, 외래방문 시 수술 부위, 소변량 껌뇨, 단

백뇨 여부 및 소변배양검사를 하고 있었다.

4. 세균의 분리 및 동정

소변검체 10 μL를 표준 백금이로 접종하고 5% CO₂, 35°C 상태에서 24시간 배양하였다. 5% 면양혈액한천배지(5% sheep blood agar plate, BAP)에서는 미세 집락으로 자랐으나, MacConkey 배지에서는 성장하지 않았으며, 48시간 배양 후에는 MacConkey 배지에서도 무색의 미세 집락이 관찰되었다(Fig. 1).

Mclver와 Tapsall(1990)의 방법에 따라, 직경 6 mm의 디스크 흡습지(BD Company, USA)에 6.3 mM L-cysteine HCl을 10 μL 첨가 후 상기 균을 도말한 MacConkey 배지에 붙인 후 5% CO₂, 35°C 상태에서 24시간 배양하였더니 cysteine 디스크 주변에서 왕성한 분홍색 균 집락이 자란 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

세균의 동정은 MicroScan WalkAway 96SI(Dade Behring Inc, USA)과 VITEK2(BioMerieux Inc, Duham, USA) 자동화 장비, 그리고 API 20E(BioMerieux Inc, Duham, USA)를 사용하였다. Inoculum water(Dade Behring Inc, USA)와 멸균 half saline, 그리고 멸균 증류수에 각각 L-cysteine HCl을 최종 6.3 mM이 되도록 첨가한 후 cysteine 디스크 주변에서 자란 균 집락을 이용하여 각 키트의 사용법대로 균액을 맞추어 사용하였다. MicroScan WalkAway 96SI에는 Neg Combo Type 44를, VITEK2에는 GN 카드를 사용하였다. 3 가지 동정결과는 Table 1과 같다.

Triple sugar iron 사면배지에 접종한 결과는 배지 심부는 산성, 사면이 알칼리로 변화 되었으며, 요소분해효소 시험과, oxidase 시험은 음성이었다(Fig. 3). 확진동정을 위하여 16S rDNA 부위의 염기서열분석을 실시하였더니 *E. coli*와 100% 일치하였다.

Table 1. Identification results of the "dwarf colonis" by WalkAway96SI, VITEK2, and API afyer adding L-cysteine in inoculum media

Methods	Kit, used	Inoculum media	Results
WalkAway 96SI	NC44	Inoculum Water with L-cysteine	94.37% <i>Escherichia coli</i>
VITEK2	GN	0.45% saline with L-cysteine	99.0% <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
API 20E	20E	Distilled water with L-cysteine	57.7% <i>Yersinia kristensenii</i> 34.0% <i>Escherichia coli</i>

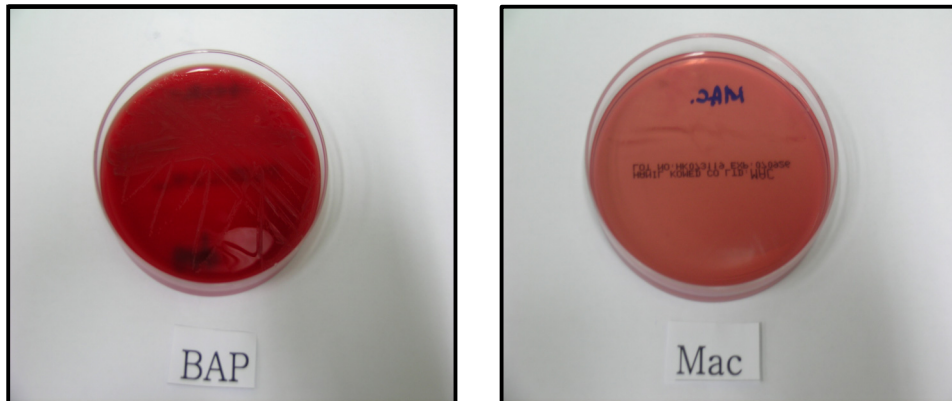


Fig. 1. Dwarf colonies of on blood agar plate and MacConkey agar after 48 hours incubation from primary culture of this case specimens.



Fig. 2. Pink colonies on MaConkey agar impregnated with L-cysteine hydrochloride (6.3 mM) after 24 hours culture in 5% CO₂, 35°C. Any colonies were not presented on regions so far from the cysteine disk.



Fig. 3. Growth of API 20E, TSI and urease test after 24 hours of incubation at 35-37°C

5. 항생제 감수성 검사

Mclver와 Tapsall(1990)의 방법에 따라 Muller-Hinton broth에 L-cysteine HCl을 6.3 mM이 되도록 첨가한 후 cysteine 디스크 주변에서 자란 균 집락을 이용하여 0.5 McFaland 탁도를 맞추어 디스크 확산법을 이용하여 항생제감

수성검사를 실시하였다. Piperacillin/tazobactam, cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, amikacin, gentamicin, tobramycin에는 내성이었으며, ciprofloxacin, imipenem, cefotetan에는 감수성이었다. ESBL 시험에서는 음성이었다.

III. 고 찰

최상의 성장을 위해 특별한 영양성분을 요구하는 세균은 임상적 검체에서 드물지 않게 분리된다. 영양요구성 장내세균은 필요한 영양성분이 부족한 배지에서는 전형적으로 작고 반투명한 집락을 형성하고 “small-colony forms” 또는 “deficient dwarf colony”라고 불린다. 보고된 대부분의 영양 부족은 황의 대사과정의 결손으로 인해 일어나고 cysteine 요구성 균주라고 명명 되었다(Mclver와 Tapsall, 1990).

장내세균과 중에 “small colony forms”이 증가하는 많은 대사 결손이 보고되었다. 이들 결손의 일반적인 성격은 cysteine에 포화된 디스크 흡습지를 이용한 간단한 영양요구성 시험에 의해 측정될 수 있다. 임상 실험실에서 cysteine 요구성 “small colony forms” *E. coli*는 cysteine이 포함된 세균학적 배지를 사용하면 잘 분리된다고 하였다(Mclver와 Tapsall, 1990). 그러나 Synyal(1987)은 일상적인 소변 배양에서 cysteine supplemented media의 사용 필요성에 대한 평가를 보고하였는데, 특별한 환자군이 아니라면 특별한 장점이 없다고 평가하였다.

Mclver와 Tapsall(1990)은 cysteine 요구성 *E. coli*가 trimethoprim/sulfamethoxazole을 오랜 기간 동안 치료하였거나 요관에 이상을 가진 나이든 환자에게 빈번하게 나타난다고 보고하였는데, 국내에서 이런 조건에 있는 환자군이 빈번하다면 cysteine이 보강된 배지의 일반적인 사용이 권장된다.

영양요구성 장내세균의 분리는 요로감염에서 주로 발견된다고 보고되었으나 Mclver와 Tapsall(1986), Yuen 등(1990)은 cysteine 요구성 *E. coli*에 의한 패혈증 증례를 보고하기도 하였다. 특히 혈액배양에서 이러한 영양요구성 균주의 분리는 종종 실패하기도 하기 때문에 주의가 필요하다고 판단된다.

국내의 영양요구성 세균의 분리는 드물게 보고되고 있으며, Shin 등(2008)이 nutritionally deficient streptococci인 *Granulicatella adiacens* 패혈증을 분리 보고하였으며 일반적인 배양 배지에서 분리하기 어렵기 때문에 혈액배양에서 *S. aureus* 희석을 추가적으로 실시하는 것을 제안하기도 하였다.

본 증례에서는 소변배양 배지로부터 균 성장이 되지

않았으나 검체의 그람염색 슬라이드에서 분명한 그람 음성 간균의 염색상을 관찰하여, chocolate agar, Brucella blood agar를 추가 접종 배양하였다. 모든 배지에서 비슷한 정도의 느리거나 관찰하기 어려운 균 집락의 성장을 보여 영양요구성 시험을 실시하게 되었다. 소변배양은 16~18시간 배양한 배지로부터 집락판독을 거쳐 균의 분리 유무를 결정하는 것이 일반적이기 때문에 본 증례와 같이 검체의 그람염색에서 균이 관찰되지 않았다면 분리하기 어려웠을 것으로 판단된다.

자동 미생물 분석기들을 이용한 cysteine 요구성 장내세균의 동정은 균 성장이 안 되거나 매우 느린 이유로 동정이 되지 않거나 잘못된 결과를 도출하게 된다. MicroScan WalkAway 96SI으로 cysteine 첨가 없이는, 세균동정이나 항생제감수성검사가 반응을 일으키지 않았으며, VITEK2도 충분치 못한 균 성장을 보고하였다. Mclver와 Tapsall(1990)의 보고에서도 VITEC, API, Microbact 등의 키트에서 일부 cysteine 요구성 *E. coli*와 *Klebsiella spp.*에서 잘못 동정되거나 동정이 되지 않은 경우가 약 25% 정도였다.

Cysteine 요구성 *E. coli*의 항생제 감수성에 대한 기존의 연구는 영양요구성 특성이 항생제 감수성 특성에 영향을 미치는 것은 아닌 것으로 보고하였다(Tapsall와 Mclver, 1986; Mclver와 Tapsall, 1991). 이들 연구의 총 47균종에서 aminoglycosides 항생제에 감수성을 보인 반면에 본 증례의 균종은 내성을 보인 것이 특징이었다. 이 결과는 국내에서 분리되는 cysteine 요구성 *E. coli*의 항생제 특성 조사에 대한 필요성을 제시한다.

결론적으로 그람 염색에서 확실한 세균의 염색상이 관찰되나 여러 가지 배지 및 배양 환경에서 집락형성이 더디거나 자라지 않는 경우에는 영양요구성 세균의 여부를 확인해 보아야 할 것으로 사료된다. 결핍된 영양소는 실제적으로 다양할 수 있으나 황 대사과정의 결핍이 대부분이라 알려져 있으므로 cysteine 디스크의 위성현상으로 선별할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Gillespie WA. Biochemical mutants of coliform bacilli in infections of the urinary tract. *J Pathol*

- Bacteriol* 64(3):551-557, 1952.
2. McIver CJ, Tapsall JW. Cysteine requirements of naturally occurring cysteine auxotrophs of *Escherichia coli*. *J Pathol* 4:361-363, 1987.
 3. McIver CJ, Tapsall JW. Assessment of conventional and commercial methods for identification of clinical isolates of cysteine-requiring strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *J Clin Microbiol* 28(9):1947-1951, 1990.
 4. McIver CJ, Tapsall JW. In vitro susceptibilities of clinical isolates of cysteine-requiring *Escherichia coli* to 12 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 35(5):995-997, 1991.
 5. McIver CJ, Tapsall JW. Further studies of clinical isolates of cysteine-requiring strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* and possible mechanisms for their selection in vivo. *J Microbiol* 5:382-387, 1993.
 6. Shin KS, Son BR, Jeong HW. A Case of *Granulicatella adiacens* septicemia identified by 16S rRNA sequencing analysis. *Korean J Clin Microbiol* 11(1); 63-65, 2008.
 7. Synyal D. Incidence of cysteine dependent *Escherichia coli* in a general practice population. *J Clin Pathol* 40:930, 1987.
 8. Tapsall JW, McIver CJ. Septicaemia caused by cysteine-requiring isolates of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 22(4):379-382, 1986.
 9. Tapsall JW, Wilson E, Harper J. Thymine dependent strains of *Escherichia coli* selected by trimethoprim-sulphamethoxazole therapy. *Pathology* 6(2):161-167, 1974.
 10. Yuen KY, Seto WH, Tsui KH, Hui WT. Septicemia caused by cysteine-dependent *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 28(5):1047-1048, 1990.