

항생제에 대한 세균학적 감수성시험방법에 관한 비교실험 (Tetracycline, Neomycin 및 Colistin)

가톨릭 의과대학 내과학교실

박 필 원

국립보건연구원 살모넬라센터

김 영 자

=Abstract=

A Comparative Experiment on the Methods for Antibiotic Sensitivity Test In Vitro

P.W. Pak and Y.J. Kim.

*Department of Internal Medicine, Catholic Medical College
and National Salmonella Center, National Institute of Health, Korea.*

A comparative study was performed with 176 cultures of Salmonella organisms on tetracycline, neomycin and colistin in order to find out the relationship between the results obtained from the Ericsson's single disk method and the tube dilution method of antibiotic sensitivity tests which may be carried out in many hospital laboratories.

With tetracycline, thirty-three out of 163 cultures of Salmonella typhi were found to be either sensitive or moderate sensitive by means of the disk method and thirty one (ca 94%) out of the thirty three cultures showed less than 1.0 μ g of the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) in the tube-dilution tests, which mean that there were a quite good agreement between the two methods. With neomycin, a hundred and five out of 163 S.typhi were appeared to be either sensitive or moderate sensitive by means of Ericsson's single disk method, among which 103 cultures showed less than 10.0 μ g MIC in the tubedilution method. And also there was a quite correlative patterns observed in the result of testing with 13 salmonella cultures other than S. typhi. With colistin, it was hard to observe any particular tendency in the distribution of plotting for 148 cultures showing less the 18 mm in the inhibiting zone diameters between MIC and disk sensitivity patterns except the fifteen, cultures out of 176 salmonella, which appeared to be sensitive in the single disk method and showed less than 1.0 μ g MIC in the tube dilution method.

머 리 말

1935년 Domagk 에 의하여 sulfa제의 발견이 이루어지고, 1929년에 Fleming 의하여, 관찰되었던 penicillin의 화학요법적 실용성이, 1940년 Chain과 Florey에 의하여 실증된 이래, 화학요법과 유효물질에 관한 활발한 연구와 개발이 진행되고 있다¹⁾. 오늘날 화학요법에 실용되는 대부분의 물질은, 미생물에 유래된 이른바 항생제이며, 이들의 분리와 농축, 정제 및 대량 생산에 관련된 발전은 눈부신 바가 있고 한편으로는 각종 감염기전과, 경과중에 치료의 목적으로 이러한 항균제들을 투여함에 필요한 용량, 흡수율, 혈중농도, 배설시간과 배설을 따위 기본적인 의학연구가 수없이 이루어지고 있음은 널리 알려진 사실이다.

항균요법의 성립이 각종 항균제의 선택적인 독성에 기초를 두고 있으므로, 숙주에게는 최소한도의 피해를 주면서 감염인자에 미치는 최대한의 발육증식 억제작용을 할 수 있는 항균제의 절대농도가, 감염소의 주변에 또는 감염인자의 환경에 유지되어야, 화학요법의 치료목적이 달성되는 것이다. 즉 숙주와 감염인자 및 항균제를 3자간의 복잡한 상호관계가 전제되어야 소기의 목적이 달성되게 되는 것이다. 이러한 연구들은 직접 생체내에서 수행되어야 할 내용이므로 일반적으로는 진료를 전달하고 있는 병원이나 그의 실험실에서 간단하게 수행되기 어려운 여건이 많음을 부인하기 어렵다. 특히 개개인의 감염소에서 분리된 감염인자별로 그 원인균들의 각종 항균제에 대한 감수성을 그때 측정하여 적시에 환자치료를 수행하여야 하는 병원실험실로서는 감당하기 어려운 사업이라고 할 수 있다. 따라서 일반적으로는 각종 감염인자의 감수성에 관하여 숙주의 각종 조건을 제외하고 직접 감염인자의 발육증식 환경에 일정농도의 항균제를 혼합하고 그 조건에서 감염인자의 발육과 증식이 계속되는지 또는 억제 혹은 저지되는지의 여부를 가려서 특정 항균제가 숙주인 인체에서 유지될 수 있는 혈중농도와와의 상관관계로서 간접적으로 특정 항균제에 대한 어떤 감염인자의 감수성 여부를 관찰하는 이른바 시험관내 실험방법이 일반적으로 진로기관인 병원실험실에서 사용되고 있는 또한 이에 관련된 많은 업적들이 발표되고 있다²⁾. 그중에서도 기술적인 간편성과 조작과 조작과정의 통상화를 위한 용이성 및 표준제품의 보관용이성 때문에 근자에 와서는 disk를 사용하는 방법이 성행되고 있다³⁻⁵⁾.

그러나 disk 방법에서 얻어지는 결과는 여러가지 조건

으로 인하여 영향을 받을 수가 있는 요소들을 지니고 있음을 부인하기 어려운 것이다. 즉 disk 방법의 요점은 disk에 함유시킨 항균제가 시간의 경과와 더불어 주위의 매지속에 확산되는 시간과 율, 그리고 결과적으로 부위별로 얻어지는 항균제의 농도가 일정하다는 전제 하에 만이, 이루어질 수가 있는 실험이다. 그러나 사실은 확산기전은 어디까지나 계속적인 현상이므로, 부위별로 얻어지는 항균제의 농도가 계속적으로 일정할 수는 없는 것이다. 특히 시험용배지의 성상, 항균제의 확산성과 분자량 및 약제의 안정도들은 이 점에 심각한 영향을 주는 것이다. 따라서 이러한 시험결과로서 얻어진 발육억제 또는 발육저지대의 크기만으로 특정 감염인자의 약제에 대한 감수성을 결정함은 근본적으로 합당하다고 보기 어렵다. 따라서 같은 In vitro 방법이라면 그 조작이 복잡하고 많은 재료가 들고 또한 더욱 세밀한 수기가 필요하더라도 시험관내회석방법 (tube dilution)이 원칙적으로 이론상 타당성이 있음은 당연한 일이라고 하겠다. 그러나 이 방법에 있어서도 엄격한 뜻에서 pH, 배지의 구성성분, 약제의 안정성, 접종균의 분량, 배양시간 및 접종균의 신진대사능력들의 차이로 얼마든지 오차가 있을 수가 있음은 널리 알려진 사실이다⁶⁾.

저자들은 이번에 우리나라 각병원 실험실에서 상용되는 disk 방법과 이론상 아직도 타당성이 더욱 짙은 시험관내회석방법에서 얻어진 결과를 비교 검토하기 위하여, 우리나라에서 유행되었던 salmonella 균속을 사용하여 tetracycline, neomycin 및 colistin 들 세가지 항균제에 대한 감수성측정을 시행하여 약간의 의의있는 결과를 얻었으므로 그 결과를 다음과 같이 정리하여 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

균주는 1971년도에 우리나라 여러지역에서 분리되었던 salmonella typhi 163주와 그외의 salmonella 균속 13주를 국립보건연구원미생물부에서 동정확인된 것을 포함 176주 분양받아서 사용하였고 실험에 사용한 항균제 disk는 국립의료원 세균과에서 제조 사용중인 것을 분양받아서 사용하였다. 또한 시험관내 회석방법에 사용한 tetracycline, neomycin colistin은 국립보건연구원 약품부에서 정량 확인된 것을 분양받아서 실험하였으며 colistin은 12,800 I.U./g의 순도였었다.

Disk에 함유된 항균제량은 제 1표에 나타난 바와 같이 tetracycline 50 µg, neomycin 50 µg 및 colistin 900

Table 1. Antibiotic concentrations and inhibiting zone diameters (mm) of Ericsson's discs regarding to the sensitivity patterns

| Antibiotics | Patterns | Conc./disc | Sensitive | Moderate sensitive | Moderate resistant | Resistant |
|--------------|----------|------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|
| Tetracycline | | 50 μ g | ≥ 21 | ≥ 17 | ≥ 9 | < 9 |
| Neomycin | | 50 μ g | ≥ 17 | ≥ 15 | ≥ 13 | < 13 |
| Colistin | | 900 I.U.* | ≥ 18 | | | |

* I.U.: International Unit.

I.U.이었으며 실험방법은 Ericsson 들⁵⁾의 원법에 따라 pepton 이 들지 않은 감수성 측정용 한천배지에 면양철구를 5% 가하여 9 cm 직경의 평판에 약 4 mm 두께로 분주하여 굳혀서 사용하였으며 사용전에 부란기에서 약 30분간 배지표면을 건조시켰다. 접종균은 16시간 pepton 이 들지 않은 육수에 배양된 것을 1×10^8 /ml 되도록 희석하여 flooding 술식으로 식균하였으며 다시 표면의 수분을 건조시킨 다음 멸균된 핀셋으로 평판 끝에서 2 cm 정도 간격을 두어 발육저지대가 서로 겹쳐지지 않도록 서로 충분한 거리를 유지하면서 disk 를 배치하였다. 병장고에서 2시간정도 확산시킨 다음 16시간 37°C 부란기에서 배양한 후 평판 표면에 나타난 발육저지대의 직경을 콤파스로 측정기록하였다.

시험판내희석방법은 육수배지에 계산대로의 항균제를 첨가한 후 2배 계단희석법으로 육수배지로서 희석하여 1 ml 씩 멸균시험판에 분주한 후 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ /ml 가 되도록 희석한 균액을 1 ml 씩 추가한 다음 16시간

37°C에서 배양하여 육안으로 발육증식 여부를 관찰하여 최저억제농도(minimal inhibitory concentration)을 기록하였다.

Disk 방법에서 얻어진 발육저지대의 직경은 크기에 따라 Ericsson 의 제창대로 감수성구분을 sensitive, moderate sensitive, moderate resistant 및 resistant 4종으로 나누었으며 제 1 표에 나타난 바와 같다. 또한 colistin 의 경우 직경 18 mm 이하분에 대하여서는 그 이상의 구분이 제시되어 있지 않으므로 Sensitive pattern 만을 찾았다.

실험성적 및 고안

실험에 사용한 균주들의 tetracycline 에 대한 감수성 검사 결과는 그림 1-1에서 보는 바와 같이 salmonella typhi 163주중에서 29주(17.8%)가 disk 방법으로 21 mm 이상의 발육저지대를 나타내어 감수성균으로 관찰되었

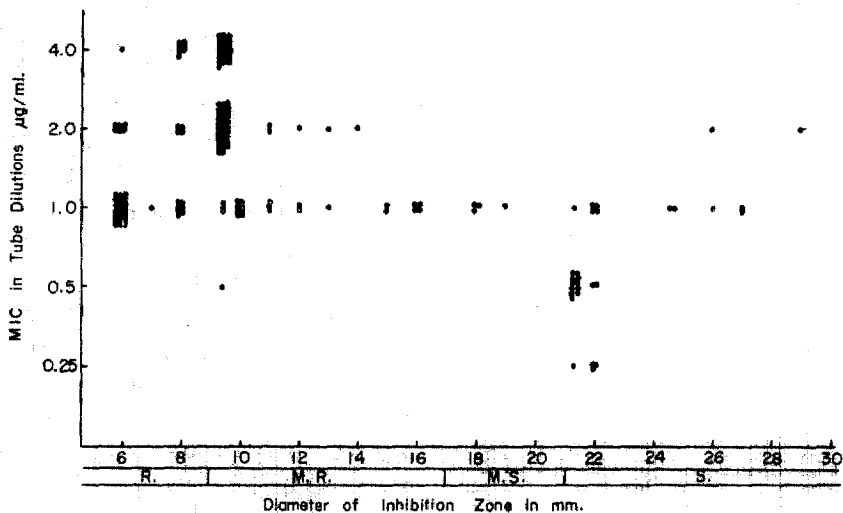


Figure 1-1. Correlation of the results from single disc and tube dilution sensitivities on 163 cultures of S. typhi tested with tetracycline.

으며 그중 4주는 MIC 0.25 μg 이하이었고 13주는 MIC 0.5 μg 이하이었고 다시 10주는 MIC 1.0 μg 이하이었으나 2주는 MIC 2.0 μg 이하로 나타났다. 그리고 발육저지대 17 mm 이상 21 mm 미만으로 나타나서 moderate sensitive pattern 을 나타낸 4주(2.5%)는 모두 MIC 1.0 μg 이하이었다. 발육저지대가 9 mm 이상 17 mm 미만을 나타내어 moderate resistant pattern 을 나타낸 83 주(50.9%)에 관하여서는 23주가 MIC 1.0 μg 이하, 37주가 MIC 2.0 μg 이하 22주가 MIC 4.0 μg 이하로 나타났으나 1주는 MIC 0.5 μg 이하로서 감수성균에 해당하는 MIC가 관찰되었다. 발육저지대의 직경이 9 mm 미만으로서 내성균의 양상을 나타내었던 47주(28.8%)중에서 29주는 MIC 1.0 μg 이하이었고, 10주는 MIC 2.0 μg 이하, 8주는 MIC 4.0 μg 이하로 나타났다. 즉 disk 방법으로서 감수성균으로 나타났던 29주중에서 12주는 MIC 1.0 μg 이하 또는 2.0 μg 이하로 관측되어 사실상 moderate sensitive pattern 으로 나타났던 4주와 비슷한 MIC 를 나타내었고, moderate resistant 83주중 MIC 1.0 μg 이하이었던 23주와 MIC 0.5 μg 이하이었던 1주는 시험관내회석법의 결과로 볼때, 적어도 moderate sensitive pattern 으로 볼 수도 있었으나 59주는 MIC 2.0 μg 이하 또는 MIC 4.0 μg 이하로 나타났으므로 disk 법의 결과와 시험관내회석법에 의한 결과가 비교적 부합되는 현상으로 관찰되었다. 다시 *S. typhi* 를 제외한 다른 salmonella 균 13주에 대한 tetracycline 에 대한 감수성 검사결과는 그림 1-2에서 보는 바와 같이 1주가 발육저지대 21 mm 로서 감수성균으로 나타났으며 MIC 1.0 μg 이하이었던, MIC 가 같은 1.0 μg 이하이면서 발육

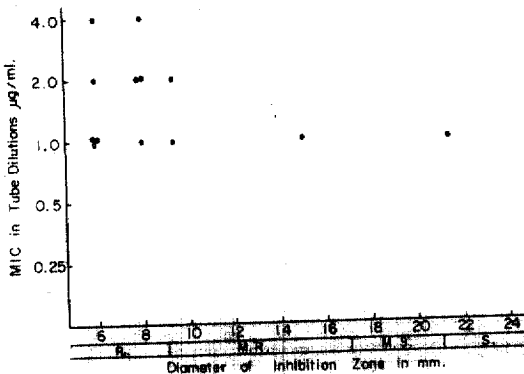


Figure 1-2. Correlation of the results from single disc and tube dilution sensitivities on 13 cultures of salmonella tested with tetracycline.

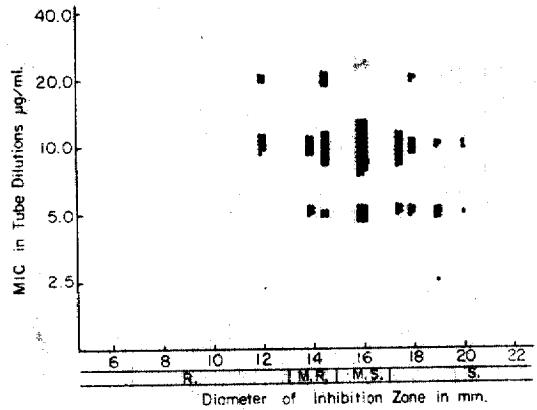


Figure 2-1. Correlation of the results from single disc and tube dilution sensitivities on 163 cultures of *S. typhi* tested with Neomycin.

저지대는 moderate resistant 를 나타낸 2주가 있었던 반면, resistant pattern 으로 나타났던 9주중에서 4주는 MIC 1.0 이하이었던, 3주는 MIC 2.0 μg 이하이었고 2주는 MIC 4.0 μg 이하를 나타내어 두가지 방법에서 얻어진 결과는 완전한 일치라고는 하기 어려우나 비례적인 관계가 있는 어떤 경향을 관찰할 수 있는 것으로 판단되었다.

Neomycin 에 대한 감수성검사결과는 그림 2-1에서 보는 바와 같이 *S. typhi* 163주중에서 50주(30.7%)가 발육저지대 직경 17 mm 이상으로서 감수성균으로 나타났으며 그중 1주는 MIC 2.5 μg 이하이었고 17주는 MIC 5.0 μg 이었으나 29주는 MIC 10.0 μg 이하를 나타내었을 뿐만 아니라 3주는 MIC 20.0 μg 이하라는 결과로 관찰되었다. 그러나 disk 법에서 moderate sensitive 로 나타난 55주(33.7%)중에서는 12주만이 MIC 5.0 이하로 나타났을뿐 나머지 43주는 모두가 MIC 10.0 μg 이하로 나타났다. disk 방법으로 moderate resistant pattern 을 나타낸 45주(27.6%)중 9주는 MIC 5.0 μg 이하이었고 28주는 MIC 10.0 μg 이하이었던 나머지 8주는 MIC 20.0 μg 이하라는 높은 수치에 해당되었었다. 다시 resistant pattern 의 13주(8.0%)중 9주는 MIC 10.0 μg 이하이었던 4주는 역시 MIC 20.0 μg 이하라는 높은 수치에 해당되었었다. 한편 *S. typhi* 를 제외한 그외의 salmonella 균속 13주에 있어서는 그림 2-2에 나타난 바와 같이 disk 법에서 감수성을 나타낸 2주중 1주는 MIC 5.0 이하로 또 1주는 MIC 10.0 μg 이하로 나타났다. moderate sensitive pattern 의 6주중 1주는 MIC 10.0 μg 이하이었던 4주는 MIC 20.0 이하이었던 나머지 1주

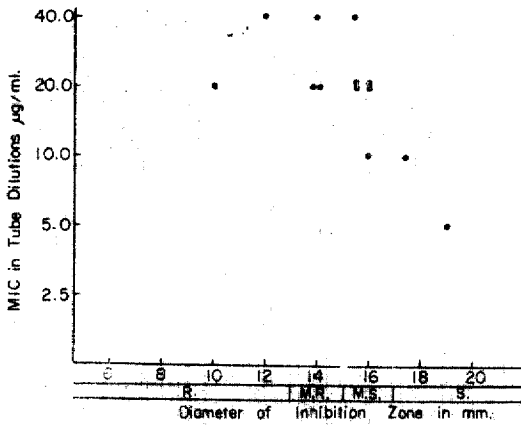


Figure 2-2. Correlation of the results from sing disc and tube dilution sensitivities on 13 cultures of salmonella tested with Neomycin.

는 MIC 40.0 µg 이하로 관찰되었다. moderate resistant 3주중 2주는 MIC 20.0 µg 이하이었으나 1주는 MIC 40.0 µg 이하이었다. 발육저지대 직경이 13 mm 이하로서 내성균으로 나타났던 2주는 그중 1주가 MIC 20.0 이하이었고 또 한주는 MIC 40.0 µg 이하이었다. 즉 Ericsson 이 분류한 resistant, moderate resistant, moderate sensitive 및 sensitive pattern 상호간에 명확한 구별이 MIC와 발육저지대 직경간에 그려진 것은 아니나

전체도표에서 일단의 비례적인 상관관계를 관찰할 수가 있었다.

Colistin 을 사용한 감수성검사 성적은 S. typhi 163 주의 경우 그림 3-1에서 보는 바와 같이 15주(9.2%)가 disk 방법으로서 발육저지대 18 mm 이상을 나타내어 감수성균으로 판단되었으나 그중 6주는 MIC 0.5 µg 이하이었고 9주는 MIC 1.0 µg 이하이었다. 그러나 발육저지대 직경 18 mm 미만을 나타낸 148株(90.8%)중에서는 MIC 0.25 µg 이하가 29주, 0.5 µg 이하가 38주, 1.0 µg 이하가 34주, 2.0 µg 이하가 30주, 4 µg 이하가 16주 및 8 µg 이하가 1주 있었다. 즉 발육저지대 6 mm 를 나타내었던 9주만을 다시 살펴보면 MIC 0.5 µg 이하가 1주, 1.0 µg 이하가 2주, 2.0 µg 이하가 4주, 4.0 µg 이하가 1주 있었던 외에 MIC 8 µg 이하로 나타난 것도 1주 있었다. 그리고 S. typhi 이외의 salmonella 균속 13주에 대한 검사성적은 그림 3-2에 나타난 바와 같이 발육저지대 직경 18 mm 이상을 나타낸 감수성균은 1주도 없었고 모두가 발육저지대 직경이 11 mm 내지는 15 mm 범위내에 있었던바 시험관내회색법에 의한 MIC는 0.5 µg 이하가 2주, 1.0 µg 이하가 1주, 2.0 µg 이하가 7주, 4.0 µg 이하가 3주 들의 결과로 관찰되었다. 사실상 Ericsson 분류의 원법에서 감수성균의 발육저지대 직경을 18 mm 이상으로 규정하였을뿐 resistant, moderate resistant 또는 moderate sensitive 들의 pattern 을 disk 법에 의한 발육저지대의 직경의 크기로 세분하지 못하였던 결과 부합될 수 있을 것으로 관찰되었다.

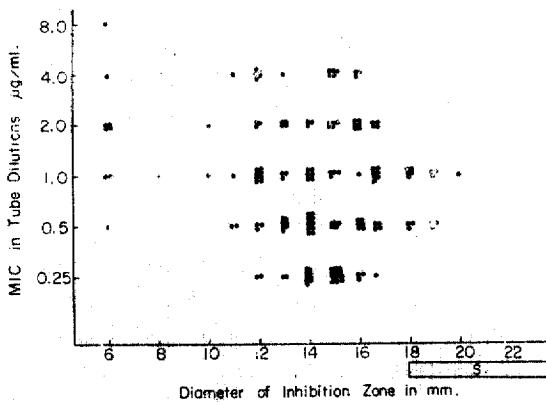


Figure 3-1. Correlation of the results from single disc and tube dilution sensitivities on 163 cultures of S. typhi tested with colistin.

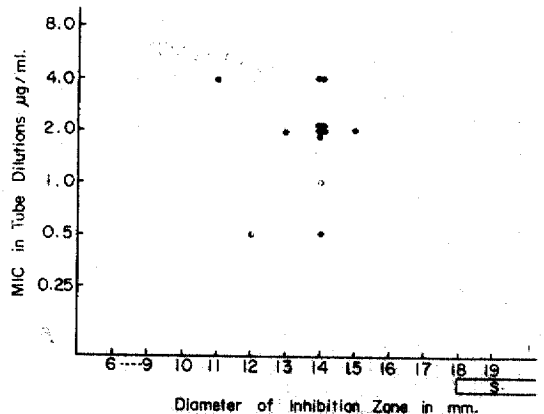


Figure 3-2. Correlation of the results from single disc and tube dilution sensitivities on 13 cultures of salmonella tested with Colistin.

위에 나타난 실험성적들을 요약하여보면 tetracycline의 경우 시험관내 회석방법에서 얻어진 MIC 값이 반드시 disk 법에서 관찰되었던 발육저지대 직경의 크기와 하나하나가 구체적으로 비례되지는 않았으나, 즉 상호간에 약간의 시험치의 중복부분이 없지는 않았으나 대다수의 균주에 있어서 일단은 Ericsson의 sensitive, moderate sensitive, moderate resistant 및 resistant의 구분에 따른 일정한 경향을 관찰할 수가 있었다.

Neomycin의 경우도 역시 시험관회석법에서 얻어진 MIC 값이 disk 법에서 얻어진 발육저지대의 직경의 크기와 말바로 비례된 것은 아니었으나, 사실상 MIC의 값이 작은 균주들이 대체로 발육저지대의 직경이 크게 관찰되는 경향으로 파악되기는 하였으나, tetracycline의 경우와 마찬가지로 비슷한 발육저지대의 직경크기를 나타낸 균주들중에는 MIC 값이 서로 틀리는 수도 상당수 관찰되었다. 이런점은 일부분 시험관회석법에서의 항균제 농도를 2배 희석으로 너무 간격이 넓게 실험하므로써 얻어진 결과임도 부인할 수가 없다. colistin의 경우는 MIC 1.0 μg 이하로 나타났던 균주중 15주만이 Ericsson 분류에 의한 감수성 pattern을 나타내는 18 mm 이상의 발육저지대 직경을 보였을 뿐, 18 mm 미만의 발육저지대 직경을 나타내었던 균주들은 MIC 값으로 볼때 0.25 μg 이하로부터 8.0 μg 이하에 이르기 까지 넓은 폭에 분포되어 있었으며 Ericsson 분류가 제대로 이루어지기 어려웠던 일련의 결과와 부합되는 것으로 관찰되었다.

맺 음 말

각급 병원시험실에서 화학요법제의 선택을 위하여 흔히 항균제가 함유된 disk를 사용한 확산법을 이용하여, 분리된 감염인자(병원체)의 약제에 대한 감수성검사를 시행하고 있다. 그러나 이론적으로는 직접 감염인자가 발육증식되는 환경에 함유한 항균제의 농도를 직접 측정할 수 있는 시험관내회석방법이 같은 in vitro 시험이면서도 타당성이 더 짙은 것으로 알려져 있다. 그러므로 저자들은 tetracycline, neomycin 및 colistin들의 세가지 항균제를 사용하며, 우리나라에서 분리동정된 salmonella typhi 163주와 S. typhi 아닌 13주의 salmonella 균속을 이용하여, 시험관내회석방법에서 얻어지는 minimal inhibitory concentration과 disk 법에서 기준하는 Ericsson 분류에 따르는 감수성 pattern의 결과를 비교 실험하였다. tetracycline의 경우 disk 법에 의하여 sensitive 또는 moderate sensitive pattern

으로 나타난 균주가 S. typhi 163주중 33주 있었던 바 그중 31주가 MIC 1.0 μg 이하를 나타내어 양방법에서 약 94%의 부합을 이루었으며, moderate resistant 및 resistant pattern으로 나타난 130주의 S. typhi 중에서 53주가 MIC 1.0 μg 이었던 반면, 77주는 MIC 2.0 μg 이하 또는 4.0 μg 이하로 나타나, 결과적으로 53주의 MIC 값이 sensitive 또는 moderate sensitive pattern에서 보는 14주의 MIC 1.0 μg 와 같은 값으로 나타났다고는 하나, 77주는 분명히 2배내지 4배의 MIC 값을 나타내어 disk 법에서 얻어지는 감수성결과가 시험관내회석법에 의한 MIC 값과 비례적인 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

neomycin의 경우 disk 법에 의한 sensitive 및 moderate sensitive pattern을 나타내었던 S. typhi 105주중 29주가 MIC 5.0 μg 이하이었고 73주는 MIC 10.0 μg 이하이었으며 3株는 MIC 20.0 μg 이하이었다. 거기에 비하여 Ericsson의 disk 법에서 moderate resistant 또는 resistant pattern을 나타내었던 58주중 9주가 MIC 5.0 μg 이하로 나타났으며 46주는 MIC 10.0 μg 이하로 나타났고 12주는 MIC 20.0 μg 이하로 나타났다.

S. typhi 아닌 13주 salmonella 균속에 있어서도 disk 법에서 얻어진 발육저지대(阻止帶) 직경이 클수록 MIC 값이 낮고 저지대 직경이 작을수록 MIC 값이 높은 경향을 보여 비록 두가지 방법에서 얻어진 결과가 각 균주마다 개별적으로 일치 되지는 않았다하더라도 대다수의 분포경향은 disk 법에서 얻어진 성적으로 MIC 값을 추정할 수 있었음을 관찰할 수 있었다. colistin에 있어서는 disk 법에서 감수성 결과를 보인 균주들이 MIC 1.0 μg 이하로 나타났으나 18 mm 이하의 발육저지대 직경을 보였던 균주들의 MIC는 광범위하게 분포되어 있어서 disk 법으로서는 18 mm 이하의 저지대 직경에 관하여 그 이상의 추정을 하기 어려운 것으로 판단되었다.

References

- 1) Jawetz E., Melnick J. and E. Adelberg.: *Review of medical microbiology, 10th Ed., 1972.*
- 2) WHO.: *Second report of the expert committee on antibiotics standardization of methods for conducting microbial sensitivity tests. Technical Report Series No. 210, Geneva, 1961.*
- 3) Bauer, A.W., Perry, M.M. and Kirby: W.M.M. *Single disk antibiotic sensitive testing of stap-*

- hylococci. Arch. Intern. med. 104: 208, 1959.*
- 4) Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck: M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45: 493-496, 1966.*
- 5) Ericsson H.M. and Sherris: J.C. *Antibiotic sensitivity testing: Acta pathologica et microbiologia. Scandinavia, 13:65, 1971.*
- 6) Margment, J.H. and Wentz: R.M. *Serial dilution antibiotic sensitivity testing with microtiterate system. Am. J. Clin. Path., 45:548, 1966.*