

## 抗菌劑耐性的 檢査要領과 臨床的應用

金 敎 準

忠南大學校 農科大學 獸醫學科

### 緒 論

抗菌劑를 選擇하기 위하여 感受性和 耐性試驗을 必然的으로 實施하는 것은 常識化되어 있으며 매우 重要的 事이다.<sup>1,4,7)</sup>

乳房炎을 爲始하여 各種 細菌性疾病에 있어 抗生物質과 다른 抗菌製劑를 長期에 걸쳐 濫用함으로써 이것이 肉質과 乳汁內에 移行殘留하게 되고 治療의 失手로 慢性化를 助長하여 人畜의 保健衛生과 經濟的인 면에서 莫大한 被害를 주고 있다.<sup>1-3,11)</sup>

이에 대하여 여러 學者와 臨床家들은 많은 努力을 傾注하여 解決策을 模索하고 있으나 適切한 方案이 樹立되지 못하고 任意로 選擇 使用한 抗菌劑에 의하여 細菌의 藥劑耐性만 助長하고 있는 實情이다.<sup>5,10,17)</sup> 治療에 있어 感受性試驗을 通하여 가장 敏感한 藥劑를 選擇해야 함은 너무나 明白한 일이지만 그 術技가 普便化하기에는 無理한 점이 없지 않다.<sup>19-21)</sup>

지금까지의 報文에 의하면 抗菌劑에 대한 感受性和 耐性試驗法<sup>5,6,8,18)</sup>에 관해서는 많은 發表가 있으나 이는 단지 單劑에 대해 試驗한 것이 대부분이고 實際로 使用하고 있는 複合製劑에 대한 試驗이나 耐性檢査要領 등에 관한 報告는 거의 없는 것으로 알고 있다.<sup>9)</sup> Jacob 등<sup>7)</sup>은 episome, plasmid 및 R因子에 대해 論述하였고 藥劑에 대한 多劑耐性을 支配하는 것은 R因子라 하였다.

筆者는 이점에 着眼하여 이들 檢査에 관한 技術과 方法을 簡便化하는 한편 判定時間을 短縮하는데 努力해 왔었으나 이번에는 選定된 藥劑

에 대한 耐性을 早速히 把握하여 治療效率을 向上시킴으로써 耐性으로 因한 慢性化를 防止할 수 있는 일이라 생각하여 簡便法을 考案하고 乳牛의 乳房炎由來 *Staphylococcus aureus*를 分離하여 市販 抗菌劑에 대한 耐性試驗을 實施한 結果를 報告코져 한다.

### 材料 및 方法

供試菌株 : 大田市 近郊 牧場에서 CMT法<sup>16)</sup>에 의하여 乳房炎으로 判定된 乳汁에서 分離同定한 *Staphylococcus aureus*를 供試하였다.

供試抗菌劑 : 治療用 抗菌劑와 製劑는 Table 1 및 2에서 보는 바와 같다.

培地 : 增菌培地(No. 1)와 平板培地(No. 2)는 Table 3에서 보는 바와 같다.

Paper Disc : 直徑 8mm, 두께 1.2mm의 것을 使用하였다(Toyo Roshi Co., Ltd. Japan).

菌株의 分離同定 : 滅菌된 平板培地(No. 2)에 乳汁 0.2ml를 均等하게 塗抹한 다음 37°C에서 24時間 培養하여 나타난 colony의 色調와 形態를 觀察하여 黃色葡萄狀球菌임을 認定하는 한편 生物學的 特性을 調查하기 위하여 Wilson 및 Miles<sup>21)</sup>의 記述과 大塚 및 小林<sup>15)</sup>의 方法에 準하였으며(同定所見 省略함) 冷藏庫에 保管하면서 供試하였다.

藥劑耐性 檢査法 : 本 實驗室에서 考案한 要領에 의하여 實施하였다. Table 3에 의하여 Petri dish에 No. 2 培地를 ぬ여서 平板基礎培地를 만들었으며 增菌培地인 No. 1 培地에서 培養한 菌液을 0.2ml씩 加하여 잘 攪盪하고 平板基礎培地 위에 重層으로 平等하게 被覆한 다음 굳게 하였

**Table 1.** Antibacterial Agents Used for Tolerance Test

Antibacterial Agents(Ointment)	Ingredients and Contents	Remarks	
A	(Each 1g Dose Contains)		
	Prednisolone	2mg	
	Sulfamerazine	40mg	
	Sulfathiazole	40mg	SF+NF
	Sulfathomizine	40mg	
	Nitrofurazone	4mg	
	Water Soluble Ointment Base		
B	(Each 7.5g Dose Contains)		
	Benzathine Penicillin G	100,000IU	
	Potassium Penicillin G	100,000IU	PC+CP
	Chloramphenicol	500mg	
C	(Each 10ml Dose Contains)		
	Oxycetracycline HCl	200mg	
	Oleandomycin	100mg	OTC+OM
	Neomycin H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100mg	
	Predisolore	5mg	
D	(Each 12ml Dose Contains)		
	Procaine Penicillin G	300,000IU	
	Neomycin Base	50mg	PC+NM
	Chlorobutanol	50mg	
E	(Each Syringe Contains)		
	Rifamycin SV Acid	0.050g	
	Rifamycin SB Sodium Salt	50mg	RM
	Excipients q. s.	8g	
F	(Each 10ml Dose Contains)		
	Nifuroquine	100mg	NF
	Vegetable Oil Base q. s.	100mg	
G	(Each 1ml Dose Contains)		
	Hydrocortisone Acetate	2mg	
	Hydrocortisone sodium succinate	10mg	
	Novobiocine	1.25mg	
	Dihydrostreptomycin Base	15mg	NV+SM+PC+PM
	Procaine Penicillin G	10,000IU	
	Polymyxin B Sulfate	5,000Units	
	Chlorobutanol Anhydrous	5mg	

다. 各藥劑別로 disc法の의 要領에 따라 感受性試驗을 實施하였으며 發育阻止輪의 周緣을 따라 一白金耳를 鉤取하여 No.1 培地에 接種하고 16~18時間 培養하였다. 이같은 要領을 累代에 걸

쳐 反覆하게 되면 同一한 藥劑에 대하여 耐性の 發現으로 阻止輪의 크기가 漸次로 縮少하게 되는 것을 볼 수 있었다.

判定法은 慣行法에 따라 直徑을 測定하였으며

**Table 2.** Antibacterial Agents Used for Tolerance Test

Antibacterial Agents(Solution)	Ingredients and Contents
Ampicillin	(Ampicillin Sodium 5g)
Chloramphenicol	(Chloramphenicol 250mg)
Erythromycin	(Erythromycin Lactobionate 50mg)
Penicillin	(Penicillin G 1,500,000IU)
	(Penicillin G Sodium 500,000IU)
Kanamycin	(Kanamycin Sulfate 100mg)
Streptomycin	(Dihydrostreptomycin Sulfate 250mg)
Oxytetracycline	(Oxytetracycline HCl 250mg)

**Table 3.** Composition of Media Used for Tolerance Test

Composition	Enrichment Medium(No. 1)	Plate Medium(No. 2)
	Contents(g/liter)	
Peptone	10.0	10.0
Beef Extract	5.0	5.0
NaCl	2.5	2.5
Agar		13-15
Final pH	7.0±0.1	6.5±0.1

**Table 4.** Detection Criteria of Tolerance Test

Reaction	Reaction of Tolerance Test				
	Strong (-)	Moderate (±)	Weak (+)	Suspect (++)	Non-resistance (+++)
Diameter of Inhibitory Zone(mm)	0	8-9	10-15	16-25	26<
Abbreviation of Degree	S. R.	M. R.	W. R.	S.	NON

Table 4에서 보는 바와 같이 본 實驗室에서 常用하는 判定基準에 의하였다.

**結果 및 考察**

本 試驗에 供試할 目的으로 乳房炎 由來의 *Staphylococcus aureus*를 分離同定하고 市販 中の 乳房炎 治療劑를 感受性試驗에 의하여 ++ 以上の 軟膏와 注射用 抗生劑를 各各 7種을 選擇하여 耐性檢査法을 究明하기 위하여 發育阻止輪의 周緣部에서 鉤菌하여 繼代增殖시켜 여기서 얻은 耐性獲得狀은 Table 5에서 보는 바와 같이 1回부터 6回까지 反復한 結果 D와 E-ointment는 強한 耐性を 나타냈으므로 4回부터는 調査할 수

없었다. 그의 5種의 軟膏劑는 程度의 差는 있었으나 6回까지 계속 耐성이 增大하는 傾向이었다. 그리고 注射用 抗生劑는 7種 中에서 強한 耐성을 나타낸 것은 없었으며 疑陽性的의 것이 4種(ampicillin, penicillin, kanamycin, streptomycin), 弱한 耐성의 것이 3種(chloramphenicol, erythromycin, oxytetracycline)을 볼 수 있었다.

考察컨데 乳房炎菌으로서 現在까지 많은 것이 報告되고 있으나<sup>10,12,13)</sup> 이들은 모두 抗菌劑에 대하여 나름대로 感受性を 나타내고 있는가 하면 *Staphylococcus aureus*처럼 藥劑不活化酵素의 產生과 合成에 關係하는 plasmid에 의하여 投與한 藥劑에 대해 耐性獲得을 가지는 傾向이 있어

**Table 5.** Tolerance Test of *Staphylococcus aureus* for Antibacterial Agents

Antibacterial Agents	No. of Passage	Diameter of Inhibitory Zone in Tolerance(mm)						Remarks (Ingredients)
		I	II	III	IV	V	VI	
<b>(Ointment)</b>								
	A	30	19	17	18	19	18	SF+NF
	B	34	40	34	34	32	31	PC+CP
	C	28	29	27	22	20	19	OTC+OM
	D	39	16	10	8	—	—	PC+NM
	E	28	14	9	8	—	—	RM
	F	29	18	18	16	15	15	NF
	G	41	40	39	36	22	22	NV+SM+PC+PM
<b>(Solution)</b>								
	Ampicillin	30	24	22	22	22	22	A-S
	Chloramphenicol	37	38	37	36	35	34	CP
	Erythromycin	26	24	24	24	26	26	EM+Lac
	Penicillin	33	25	25	23	22	22	PC-G+PC-G-S
	Kanamycin	30	24	24	23	22	23	K-S
	Streptomycin	34	23	22	22	23	22	D-SM-S
	Oxytetracycline	35	31	31	30	29	31	OTC

**Table 6.** Strong Tolerance in *Staphylococcus aureus* for Antibacterial Agents(Ointment)

Antibacterial Agents	No. of passage	Results of Tolerance Reaction						Remarks
		I	II	III	IV	V	VI	
	D	NON	S	WR	SR	—	—	PC+NM
	E	NON	WR	MR	SR	—	—	RM

問題로 擡頭되고 있다. <sup>5,8,12)</sup>

筆者는 이점에 着眼하여 本菌을 供試菌으로 택한 理由라 하겠다. 여기서 耐性이라 하면 同一한 藥劑를 長期間 投與하게 되면 菌體는 그 藥劑에 대한 抵抗力이 생겨 結局에는 藥劑의 影響을 덜 받거나 거의 받지 않게 되는 것을 말한다. 現在 市販되는 여러 抗菌性製劑와 抗生劑가 많이 있으나 Table 6에서와 같이 D와 E-ointment는 主劑成分이 penicillin이고 後者는 rifamycin이었는데 從來부터 penicillin系에 대하여는 耐性獲得이 쉽다고 알려져 있으나 rifamycin도 容易하게 耐性을 얻게 된 것으로 생각된다.

그리고 疑陽性的 耐性을 나타낸 A와 F-ointment는 Table 7에서와 같이 主劑成分이 nifuroquine과, sulfa劑에 nifuroquine을 加味한 差異이지만 單劑보다 더 弱한 耐性을 나타낸 것이라

생각된다. 그리고 注射用 抗生劑인 4種도 다 같이 1回부터 6回까지 弱한 耐性이 認定되었다. Table 8에서 보는 바와 같이 菌體가 가장 弱한 耐性을 나타낸 藥劑는 B, C, 와 G-ointment였는데 이중 B劑의 경우 耐性이 거의 나타나지 않았다. 이는 主劑成分이 penicillin系와 chloramphenicol였는데 penicillin만일 경우와는 다르게 耐性獲得이 쉽지 않다는 것을 알 수 있으며 中村<sup>14)</sup>가 말한 2種 以上을 混合處方하는 경우는 藥劑成分 사이에 效果上昇作用이 있다고 하였으며 金 등<sup>8)</sup>이 말한 耐性이 弱한 chloramphenicol의 影響이라고 생각되나 G-ointment는 7種의 成分으로 處方되었고 抗生劑만도 4種이 複合된 藥劑이지만 B劑에 비해 다소의 耐性을 나타내었다. 그리고 注射劑에서도 3種이 모두 耐性이 認定되지 않았으며 主劑들이 chloramphenicol, erythr-

Table 7. Suspect Tolerance in *Staphylococcus aureus* for Antibacterial Agents

Antibacterial agents	No. of passage	Results of Tolerance Reaction						Remarks
		I	II	III	IV	V	VI	
(Ointment)								
	A	NON	S	S	S	S	S	SF+NF
	F	NON	S	S	S	W, R	W, R	NF
(Solution)								
	Ampicillin	NON	S	S	S	S	S	A-S
	Penicillin	NON	S	S	S	S	S	PC-G+PC-G-S
	Kanamycin	NON	S	S	S	S	S	K-S
	Streptomycin	NON	S	S	S	S	S	D-SM-S

Table 8. Rare Tolerance in *Staphylococcus aureus* for Antibacterial Agents

Antibacterial Agents	No. of passage	Results of Tolerance Reaction						Remarks
		I	II	III	IV	V	VI	
(Ointment)								
	B	NON	NON	NON	NON	NON	NON	PC+CP
	C	NON	NON	NON	S	S	S	OTC+OM
	G	NON	NON	NON	NON	S	S	NV+SM+PC+PM
(Solution)								
	Chloramphenicol	NON	NON	NON	NON	NON	NON	CP
	Erythromycin	NON	S	S	S	NON	S	EM+Lac
	Oxytetracyclin	NON	NON	NON	NON	NON	NON	OTC

omycin과 oxytetracycline系였다. 堂本<sup>5)</sup>은 耐性獲得에 있어서 同一한 菌種이라 하여도 環境條件에 따라 顯著한 差異가 생긴다고 하였으며 Lacey<sup>12)</sup>에 의하면 耐性の 獲得에 있어 菌의 細胞質內에서 抵抗性因子(resistance factor)인 R因子가 傳達되며 penicillinase와 같은 酵素에 의한 抗菌劑의 不活化, tetracycline과 같이 細胞膜의 性狀이 바뀌어 藥劑의 吸着性이나 透過性的 減少에 의하여 耐性이 생긴다는 것을 指摘하였다. 그리고 金 등<sup>8)</sup>과 孫 등<sup>18,19)</sup>은 乳汁에서 分離한 乳房炎菌들이 점차로 多劑耐性化한다고 하였다.

Jacob와 Wollman<sup>7)</sup>은 細菌의 染色體외에 細胞質內에도 特殊한 遺傳物質이 存在하며 이 物質이 DNA 分子로 構成되어 있어 外來性인 것이 染色體와는 關係 없이 獨立的으로 增殖하는 것을 plasmid라 하였고 染色體와 相關 없이 複製

하는 自律的狀態와 染色體에 附着해서 染色體와 함께 複製하는 附着狀態가 存在한다고 하였으며 性因子(F factor), colicin產生因子(Col. factor) 및 藥劑耐性因子(R factor) 등이 있다고 하였다. 위에서와 같은 理由들을 考察컨데 治療劑를 選擇할 경우에는 感受性試驗은 勿論이고 耐性試驗을 通하여 抗菌性이 強하고 耐性이 弱한 藥劑를 選擇하는 것은 常識이지만 本 耐性檢査要領도 感受性檢査法만 熟達되어 있으면 어려운 術技는 아니므로 耐性檢査를 忌避할 理由는 없다고 본다.

要컨데 臨床應用에 있어 感受性的 強度順으로 約 3日 間隔으로 交替使用하는 것이 有益할 것으로 思料된다.

結 論

大田市 近郊의 牧場에서 搾乳 중인 乳牛를 對

象으로 CMT法에 의하여 乳房炎으로 診斷된 乳汁으로부터 分離한 *Staphylococcus aureus*를 供試하여 乳房炎治療에 있어 보다 改善된 方法을 模索하기 위하여 市販되고 있는 複合抗菌劑인 軟膏劑와 注射用 抗生劑를 感受性試驗에서 ++ 以上の 藥劑를 各各 7種씩을 選擇하여 耐性檢査法을 開發할 目的으로 實驗한 結果 臨床적으로 應用價値가 있다고 생각되어 다음과 같이 要約한다.

1. 治療用 抗菌劑들을 反復使用하면 各已 다른 耐性의 差異를 나타내었다.
2. 강한 耐性を 나타내게 한 藥劑는 D와 E-ointment이었다.
3. 疑陽性의 耐性を 나타내게 한 藥劑는 A와 F-ointment 그리고 ampicillin, penicillin, kanamycin 및 streptomycin이었다.
4. 耐성이 없거나 거의 認定되지 않는 藥劑는 B, C 및 F-ointment 그리고 chloramphenicol, erythromycin 및 oxytetracycline이었다.
5. 耐性檢査를 거쳐서 選擇된 藥劑를 3日間隔으로 交替使用하는 것이 有益한 것으로 思料된다.

#### 參 考 文 獻

1. Aronson, A.R. : The use, misuse and abuse of antibacterial agents. M. V. P. (1975) 56: 385.
2. Biberstein, E. L., Frant, C. E., Jang, S. S., and Ruely, A. : Antimicrobial sensitivity patterns staphylococcus aureus from animals. J. A. V. M. A. (1974) 164:1183.
3. Buxton, A. and Fraser, G. : Animal microbiology. Black Well Scientific Publication, Oxford, London. (1977).
4. Cheate, E. L. : The single disk sensitivity test using a zone chart. Am. J. Clin. Path. (1967) 48:603.
5. 堂本憲司, 濱田義雄, 久米常夫 : 乳牛의 乳房炎乳汁由來 *Staphylococcus aureus*의 藥劑耐性. 家畜衛生試驗場研究報告(1976) 73:14.
6. 久米常夫 : Enterobacteriaceaeによる牛의 乳房炎, 畜産の研究(1977) 31:15.

7. Jacob, F. and Wollman, E.L. : Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press. N. Y. (1961).
8. 金鍾冕, 宋憲鍾, 郭澤勳 : 生乳에서 分離된 葡萄球菌의 藥劑耐性. 大韓獸醫師會誌 (1979) 15:143.
9. 金敎準, 李洙基 : 젖소 乳房炎 由來 *Staphylococcus*群의 藥劑耐性. 大韓獸醫師會誌(1982) 8(4):9.
10. 金敎準, 許敏道, 李明煥 : 抗菌性物質感受性試驗의 時間短縮과 臨床的 應用. 大韓獸醫學會誌(1983) 23(1):123.
11. Kowalski, J. J. : Microbial agents and bovine mastitis. J. A. V. M. A. (1979) 170:1175.
12. Lacey, R. W. : Antibiotics resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bact. Rev. (1975) 39:11.
13. Low, P., Betty, R., and Adrienne, S. D. : Practical clinical microbiology and mycology, N. Y. (1975)
14. 中村良一 : 臨床家畜內科治療學. 養賢堂, 東京(1975).
15. 大塚義一, 小林嘉一 : 葡萄球菌의 生乳からの 分離頻度とその 藥劑耐性(1977).
16. Schneider, K. and Jasper, D. E. : Standardization of the California mastitis test. Am. J. Vet. Res. (1964) 25:1635.
17. 清水龜平次, 小野齊 : 乳牛의 乳房炎. 明文堂, 東京(1974).
18. 孫奉煥, 김호민, 정승환, 김수장 : 京畿道 地域의 乳牛乳房炎에 관한 調査, : 大韓獸醫學會誌(1974) 14:99.
19. 孫奉煥 : 治療劑의 試驗管內外 生體內感受性의 比較와 試驗. 大韓獸醫學會誌(1976) 15: 109.
20. 石瑚峰, 李鉉洙. : Lancefield grouping에 의한 乳房炎由來 *Staphylococcus*의 同定과 抗生物質에 관한 感受性調査. 大韓獸醫學會誌(1975) 15:69.
21. Wilson, G. S. and Miles, A. : Principles of bacteriology, virology and immunity. 6ed. Edward Annold Co., London (1975) p. 764—801.

# Technique of Drug Tolerance Test for Selection of Antibacterial Agents and It's Clinical Value

Kyo-Joon Kim, DVM, PhD.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National Univesity

## Abstract

The author carried out bovine mastitis test by California Mastitis test(CMT) for the milk from dairy cows in the surburbs of Taejeon. In order to select proper commercial therapeutic antibacterial agents for mastitis treatment, *Staphylococcus aureus* were isolated from the CMT positive milk and the strains were tested for the tolerance test to the agents.

The results obtained were summarized as follows:

1. The tolerance test appeared graduate tolerance in cases with continuously repeat of therapeutic agents.
2. The antibacterial agents revealed strong tolerance were D-and E-ointments.
3. The antibacterial agents revealed suspect tolerance were A-and F-ointments and ampicillin, penicillin, kanamycin and streptomycin.
4. The antibacterial agents revealed non or rare tolerance were B-and G-ointments and chloramphenicol, erythromycin and oxytetracycline.
5. It is concluded that the use of 3-day-interval in turn with antibacterial agents selected by tolerance test may be beneficial.