



## 미량희석법을 이용한 항균제감수성검사

Microdilution Antimicrobial Susceptibility Test

---

저자 (Authors)	박종욱, 서성일, 전도기 Jong-Wook Park, Seong-II Suh, Doki Chun
출처 (Source)	<a href="#">The Journal of the Korean Society for Microbiology 23(2)</a> , 1988.6, 195-205 (11 pages)
발행처 (Publisher)	<a href="#">대한미생물학회</a> The Korean Society For Microbiology
URL	<a href="http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01486070">http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01486070</a>
APA Style	박종욱, 서성일, 전도기 (1988). 미량희석법을 이용한 항균제감수성검사. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 23(2), 195-205.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/11 10:34 (KST)

---

### 저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

### Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

## 미량희석법을 이용한 항균제감수성검사

계명대학교 의과대학 미생물학교실

박종욱 · 서성일 · 전도기

=Abstract=

### Microdilution Antimicrobial Susceptibility Test

Jong-Wook Park, Seong-Il Suh and Doki Chun

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Microdilution broth system has been increasingly applied for quantitative antimicrobial susceptibility in recent years, and known as a convenient, inexpensive, and reliable method. This study was carried out to evaluate the applicability of microdilution susceptibility test on strains of staphylococci, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Pseudomonas aeruginosa*, etc. isolated from various pathological specimens, and the results were evaluated in correlation with the reference agar dilution method by the agreement of minimal inhibitory concentrations(MICs) obtained by two methods.

Mueller-Hinton broth with 0.3% dextrose and 0.004% phenol red(MHDP) was used to test the susceptibility of *E. coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, and *Serratia*, etc. Oxidation-Fermentation basal medium was filtered out the agar and added with dextrose(1%) for *P. aeruginosa*, and MHDP with yeast extract(0.3%) was used for staphylococci.

Comparing the results obtained by microdilution broth system and agar dilution method, the agreement of MICs of both methods were highly satisfactory. The agreement of MICs of drugs tested were more than 90% in staphylococci except penicillin(70.7%) and ampicillin(78.3%); in *E. coli* except streptomycin(Sm, 85.1%), sulfisomidine(Su, 78.9%), and cefamandole(77.7%); in *Shigella* except Sm(87.1%), trimethoprim(87.1%), and nalidixic acid(83.9%); in *Klebsiella* except tetracycline(87.5%), Su(62.5%), and kanamycin(87.5%). The results of all drugs tested in *P. aeruginosa* showed more than 90% of agreement, but *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, and *Enterobacter*, agreement of 7 among 16 drugs were over 90% and 8 drugs over 81%. MICs of staphylococci against methicillin(Mt) were found to be in agreement with the reference agar dilution method in 96.2% of strains.

Therefore, the microdilution broth system was fairly satisfactory for antimicrobial susceptibility test, and it is reasonable to suggest that the addition of 0.3% yeast extract in the MHDP will be a suitable media to test the susceptibility of staphylococci to Mt.

**Key Words** : Microdilution, 0.3% yeast extract.

### 서론

항균제의 발달로 인하여 감염증의 치료와 예방에 큰 진전을 보게 되었으나 무분별한 항균제

의 남용과 필요이상의 장기간 투여 등으로 다약제 내성균이 점점 증가하는 추세에 있어 감염증 환자의 치료에 큰 어려움을 겪는 경우를 많이 볼 수 있다<sup>3,4,22,24,28</sup>. 따라서 이러한 다약제내성균에 의한 감염증을 효과적으로 치료하고 다약제

내성균의 출현빈도를 억제하기 위해서는 그 원인균의 항균제에 대한 내성양상을 추구하고<sup>1)</sup> 적절한 항균제를 선택투여하여야 하며, 이렇게 하기 위해서는 신속하고 정확한 항균제 감수성 검사가 요구된다.

현재 실험실에서 실시되고 있는 항균제감수성 검사법에는 시험관희석법, 한천희석법, 원판확산법 및 미량희석법(microdilution 법) 등이 있으며 검사법마다 각각 그 특징이 있으니 실험실의 사정에 따라 적당한 방법을 선택하여 검사하여야 한다. 항균제를 적당한 배지에 순차적으로 희석하여 감염증의 원인균을 점종배양한 다음, 균에 대한 항균제의 최소발육저지농도(MIC)를 측정하는 항균제감수성검사법이 가장 정확한 방법으로 알려져 있는데<sup>8,12,27,34)</sup>, 시험관희석법, 한천희석법, 미량희석법 등이 여기에 속한다. 현재 시험관희석법 및 한천희석법이 주로 표준법으로 인정받고 있으며<sup>32)</sup>, 임상검사실 등에서는 검사수기가 간편한 원판확산법이 많이 이용되고 있다<sup>20,21,26)</sup>. 그러나 이 방법은 정량적인 감수성검사를 하는데 난점이 있을 뿐 아니라<sup>23)</sup>, 성장이 느린 균이나 확산성이 낮은 항균제에 대한 감수성 검사에는 어려움이 있어<sup>20,23)</sup> 이 방법에 의한 성적판정에는 신중을 기하여야 한다. 시험관희석법 및 한천희석법은 정량적인 항균제감수성 검사에 있어서 재현성 및 정확성이 높다는 장점이 있으나<sup>21,23)</sup>, 검사를 위한 준비과정이 복잡하며, 배지 및 항균제의 소모가 많아 비경제적인 점등이 단점으로 지적되고 있다<sup>12,15,26,27)</sup>. 미량희석법을 이용한 감수성검사법은 현재 실험실에서 그 응용빈도가 늘고 있는데, 소량의 배지와 항균제를 사용하기 때문에 결과의 정확성에 문제점이 있으나, 종래의 감수성검사법보다 간편하고 경제적이며 신빙성이 있다는 보고가 많이 나오고 있다<sup>6,7,11,13,17~19,23,25~27,31)</sup>.

각종 항균제감수성검사법으로 MIC를 측정함에 있어 대체로 성장이 빠른 장내세균 등은 MIC 측정에 별 어려움이 없으나, 세균의 성장속도가 느린 경우에는 다소 어려움이 있어, 신빙성 있는 감수성검사를 위해서는 균종에 따라서 검사용배지의 성분을 달리하여야 할 필요를 느낀다<sup>7,16,23)</sup>.

미량희석법을 이용한 항균제감수성검사법이 소개된 이후, 그 사용빈도가 점점 증가 추세에 있는 것은 주지의 사실이다<sup>6,11,13,17~19,23,31)</sup>. 그러나 아직 우리나라에서는 여기에 대한 보고가 거의 없고, 보편화 되어 있지 않다. 저자는 이 방

법을 이용하여, 각종 세균의 항균제에 대한 감수성검사를 시행하여 그 결과를 한천희석법으로 얻은 결과와 비교검토 함으로써 미량희석법의 실용성을 알고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

공시균주 : 1985년 11월에서 1987년 5월 사이에 계명대학교 동산병원 임상검사실과 본 교실에 검사를 의뢰받은 각종 임상가검물에서 분리한 포도구균(포균) 157주와 *Shigella* 31주, 요로 감염증 환자로부터 분리동정한 *Escherichia coli* 121주, *Klebsiella* 32주, *Pseudomonas aeruginosa* 20주, *Serratia* 16주, *Proteus* 11주 및 *Citrobacter*와 *Enterobacter* 각 3주를 공시하였다. 포균의 분리를 위해서 가검물을 혈액한천배지에 점종하여 35°C에서 일주야 배양한 다음, 발육한 집락중 포균으로 의심되는 것을 취하여 우선 Gram 염색을 하여 Gram 양성구균임을 확인하고 균의 배열을 보아 포균임을 추정한 다음, 색소산생을 관찰하고 coagulase 산생 유무등을 실험하였다<sup>20,21)</sup>. 157주의 포균이 분리되었는데 이중 135주가 coagulase 양성인 *Staphylococcus aureus*였고, 나머지는 *S. epidermidis*였다.

*Shigella* 및 뇨에서 분리한 균은 Edwards 및 Ewings<sup>10)</sup>, Lennette등<sup>21)</sup>과 Koneman등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 생물학적 성상을 보아 동정하였다.

항균제 : Penicillin(Pc), ampicillin(Ap), carbenicillin(Cb), methicillin(Mt), oxacillin(Ox), norfloxacin(Nf), enoxacin(Ex), ciprofloxacin(Cp), nalidixic acid (Na), vancomycin (Vc), rifampin (Rf), gentamicin (Gm), kanamycin (Km), tobramycin(Yo), amikacin(Ak), streptomycin(Sm), erythromycin(Em), cephalothin (Ct), cefamandole(Cf), moxalactam(Mx), chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), trimethoprim(Tp), sulfisomidine(Su)등 24종의 항균제를 공시하였으며 균종에 따라 공시항균제를 달리하였다. 각 항균제는 적당한 용매에 용해시켜 고농도의 용액을 만들어 소분하여 냉동보존하면서 필요시 1개씩 취하여 필요농도로 희석사용하였다<sup>32)</sup>.

항균제감수성검사 : 두가지 방법에 의하였다.

한천희석법 : 검사용배지로는 순차적으로 희석한 소정농도의 항균제가 함유된 Mueller-Hinton (MH) agar배지를 조제하여 4°C 냉장실에 보관

하면서 조제후 7일 이내 사용하였다. 공시균을 Tryptic soy broth(TSB)에 접종하여 일주야 배양후 식염수에 100배 희석하여 Steers의 multiple inoculator<sup>29)</sup>로 항균제농도가 낮은 배지부터 접종하여 37°C에서 일주야 배양한 다음, 균발육 유무를 보아 MIC를 결정하였다. 정도관리를 위하여 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 함께 공시하였다.

**미량희석법** ; Conrath 및 Coupe<sup>3)</sup>와 박 및 전<sup>2)</sup>의 방법에 따라 검사하였다. *Shigella*와 뇨에서 분리한 *E. coli*를 비롯한 장내세균의 검사에는 MH broth에 0.3% dextrose와 0.004% phenol red를 첨가한 배지(MHDP)를, *P. aeruginosa*는 몇가지 예비실험을 거쳐 Oxidation-Fermentation(O/F) basal medium에서 한천을 제거한 뒤

1% dextrose를 첨가하여, 균의 성장에 따르는 dextrose의 분해에 의하여 산의 생성으로 배지의 색깔변화를 관찰함으로써 MIC판정에 도움이 되도록 하였으며, 포균의 검사에 사용된 배지는 박 및 전<sup>2)</sup>의 보고에 따라 MHDP에 0.3% yeast extract를 첨가하여 사용하였으며, 각 배지의 pH는 7.2로 수정하여 공시하였다.

사용한 기구는 Dynatech회사 제품인 Autodilutor II, Dynadrop MR 및 Microshaker III등이며 미량희석용 tray는 가로 12열(1~12) 및 세로 8열(A~H)의 U자형 well을 가진 Dynatech회사 또는 녹십자사 제품을 사용하였다.

미량희석용 tray의 가로 또는 세로 첫열(1열 또는 A열)에만 항균제를 소요농도의 4배가 되도록 배지에 희석하여 micropipette으로 5 µl씩 분주하고 Dynadrop MR을 이용하여 전 well에

**Table 1.** Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Staphylococcus* sp. (157 strains)

Drug <sup>a</sup>	Difference of MICs <sup>b</sup>									Agreement <sup>c</sup> (%)
	< -3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	> +3	
Pc	4	1	5	20	41	50	23	9	4	70.7
Ap	6	2	8	20	58	45	12	3	3	78.3
Mt	.	.	2	7	94	50	3	.	1	96.2
Ox	.	.	.	12	65	70	9	.	1	93.6
Nf	.	.	.	21	114	21	.	.	1	99.4
Ex	.	2	3	39	80	28	5	.	.	93.6
Cp	.	.	5	37	97	16	1	1	.	95.5
Na	.	1	5	19	92	35	5	.	.	93.0
Vc	.	.	.	16	107	34	.	.	.	100.0
Rf	.	.	.	8	146	2	.	.	1	99.4
Gm	1	1	5	29	108	13	.	.	.	95.5
Km	1	.	.	19	108	23	4	.	2	95.5
Ak	.	.	8	46	64	34	3	.	2	91.7
Em	2	1	3	5	129	9	2	1	5	91.1
Ct	.	.	.	4	145	4	2	.	2	97.5
Cf	.	.	.	.	145	11	.	.	1	99.4
Mx	.	.	5	14	107	22	7	1	1	91.1
Cm	.	.	.	23	100	30	2	1	1	97.5
Tc	.	.	2	62	74	10	3	1	5	93.0
Tp	.	2	1	16	89	42	7	.	.	93.6

<sup>a</sup> Abbreviation ; see text.

<sup>b</sup> S, same MICs by two methods.

- indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilutions.

+ indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>c</sup> Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

공시배지를 50  $\mu$ l씩 넣은 다음 Autodilutor II로 1열 또는 A열의 항균제를 순차적으로 7단계(A~G) 또는 11단계(1~11)희석시킨 후 TSB에서 일주야 배양한 균을 배지에, 포균은 1 ml당  $10^6$  CFU, 그외 공시균은  $5 \times 10^6$  CFU가 되도록 희석하여 Dynadrop MR로 50  $\mu$ l씩 전 well에 분주하였다. 마지막 단계로 Microshaker II로 항균제와 공시균을 잘 혼합하여 35°C 가습한 부란기에서 18~21시간 배양후, 균의 발육유무와 배지의 혼탁 및 색깔변화 등을 관찰하여 항균제의 MIC를 판정하였다. 항균제 희석시 미량희석용 tray의 마지막 열(H열 또는 12열)은 희석시키지 않고 대조군으로 두어 균의 발육정도를 관찰하였으며, 일주야 배양하는 동안 배지의 증발을 막기위해 sealing tape등으로 tray를 밀봉하였다. 한천희석법과 마찬가지로 정도관리를 위해 항균제감수성 검사용 표준균주를 함께 공시하였다.

## 성 적

Table 1은 포균 157주에 대한 20종의 항균제의 MIC를 한천희석법과 미량희석법에 의하여 검사하여 그 분포양상을 비교정리한 것이며 두 방법의 MIC가 일치하는 경우는 물론, 한단계희석정도의 차이는 실험오차에 기인한 것으로 생각되어 MIC가 같은 것으로 보고<sup>8)</sup> 일치율을 계산하였다. Vc에서는 100%의 일치율을 보였으며, Nf, Rf, 그리고 Cf에서는 각 1주만이 미량희석법의 MIC가 한천희석법보다 3단계 이상 높았으나 전체적으로 99.4%의 일치율을 나타내었다. Ct 및 Cm은 97.5%, Mt은 96.2%, Cp, Gm, Km은 95.5%의 일치율을 보였으며 그 다음은 Ox, Ex, Tp, Na, Tc, Ak, Em 및 Mx 순으로 93.6%에서 91.1%의 일치율을 보였다. 그리고 Ap 및 Pc는 각 78.3%, 70.7%로 가장 낮은 일치율을 보였다. Pc와 Ox에서는 두 방법의 MIC가 일치하는 것보다 미량희석법의 MIC가 한천희석법에 비해서 한단계 높은 경우가 다소 많았고, Ap, Ak 및 Tc등에서도 한단계희석정도의 차이를 나타내는 경우가 상당수 있었다.

Table 2는 *E. coli* 121주의 16종 항균제에 대

**Table 2.** Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Escherichia coli* (121 strains)

Drug	Difference of MICs <sup>a</sup>									Agreement <sup>b</sup> (%)
	<-3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	>+3	
Cm	.	.	2	43	48	25	3	.	.	95.9
Tc	.	.	4	19	88	10	.	.	.	96.7
Sm	.	.	2	21	45	37	12	.	4	85.1
Su	16	3	7	6	83	4	.	2	.	76.9
Ap	.	1	2	6	103	6	3	.	.	95.0
Tp	.	.	2	12	104	3	.	.	.	98.3
Na	.	1	.	1	111	5	3	.	.	96.7
Rf	.	.	.	31	76	14	.	.	.	100.0
Km	2	4	2	8	97	4	4	.	.	90.1
Gm	.	.	3	10	95	12	1	.	.	96.7
Ak	.	.	.	2	114	4	1	.	.	99.2
To	1	.	2	24	89	4	.	.	1	96.7
Ct	.	.	3	13	63	37	4	.	1	93.4
Cf	.	.	1	1	80	13	20	6	.	77.7
Mx	.	.	.	.	120	1	.	.	.	100.0
Cb	.	.	.	.	47	69	5	.	.	95.9

<sup>a</sup>S, same MICs by two methods.

- indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilution.

+ indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>b</sup>Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

**Table 3.** Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Shigella* sp. (31 strains)

Drug	Difference of MICs <sup>a</sup>									Agreement <sup>b</sup> (%)
	< -3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	> +3	
Cm	.	.	1	2	21	6	1	.	.	93.5
Tc	.	.	.	.	15	15	1	.	.	96.8
Sm	.	.	3	7	15	5	1	.	.	87.1
Su	1	.	.	2	28	.	.	.	.	96.8
Ap	.	.	.	.	24	5	2	.	.	93.5
Tp	.	1	3	.	27	.	.	.	.	87.1
Na	.	.	2	.	24	2	3	.	.	83.9
Rf	.	.	.	17	11	2	1	.	.	96.8
Km	.	.	1	9	16	5	.	.	.	96.8
Gm	.	.	.	.	30	1	.	.	.	100.0
Ak	.	.	.	3	25	3	.	.	.	100.0
To	.	.	.	.	31	.	.	.	.	100.0
Ct	.	.	.	1	11	19	.	.	.	100.0
Cf	.	1	2	1	26	1	.	.	.	90.3
Mx	.	.	.	.	31	.	.	.	.	100.0
Cb	.	.	.	.	25	5	.	.	.	96.8

<sup>a</sup>S, same MICs by two methods.

- indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilution.

+ indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>b</sup>Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

한 성적으로 Rf 및 Mx는 100%의 일치율을 보였으며, Cf 및 Su는 각 77.7%, 76.9%로 가장 낮은 일치율을 보였다. Ak, Tp, Tc, Na, Gm, To, Cm, Cb, Ap, Ct 그리고 Km 순으로 99.2%에서 90.1%의 일치율을 보였고, Sm은 85.1%였다. 100%의 일치율을 보인 Mx에서는 120주에서 두 방법의 MIC가 일치하였고 1주만이 미량희석법의 MIC가 한천희석법에 비해 한단계 높았다. Cm 및 Sm에서는 두 방법의 MIC가 한단계희석정도의 차이를 보인 것이 다소 많았고, Cb에서는 두 방법의 MIC가 일치하는 경우보다 미량희석법의 MIC가 한단계 높은 경우가 더 많았다. Su에서는 한천희석법의 MIC가 미량희석법에 비해 희석 두단계 이상으로 높은 경우가 낮은 경우보다 더 많았으며, Cf에서는 이와는 반대양상으로 보였다.

Table 3은 *Shigella* 31주에 대한 성적으로 Gm, Ak, To, Ct 및 Mx등 5종의 항균제에서는 100%의 일치율을 보였고, Tc, Su, Rf, Km 및 Cb는 96.8%, Cm 및 Ap는 93.5%, Cf는 90.3%의 일치율을, Sm 및 Tp는 87.1% 그리고 Na는 83.9%의

일치율을 보였다. Rf에서는 미량희석법의 MIC가 한천희석법에 비해 한단계희석정도 낮은 경우가 일치하는 경우보다 더 많았고, Ct는 그 반대양상을 보였다. Tc에서는 두 방법의 MIC가 일치하는 경우와 미량희석법의 MIC가 한단계 높은 경우가 동수 있었고, 100%의 일치율을 보인 To 및 Mx에서는 두 방법의 MIC의 차이를 보인 경우는 없었고, Gm에서는 1주 있었다.

Table 4는 *Klebsiella* 32주에 대한 성적으로 *E. coli*에서와 같이 Rf 및 Mx에서 100%의 일치율을 보였으며 또한 Su도 62.5%로 가장 낮았다. Ap, Na, Ak에서는 96.9%의 일치율을 Sm, Tp, To, Ct등은 93.8%, Cm, Gm, Cf, Cb등은 90.3%, Tc 및 Km은 87.5%의 일치율을 보였다. Mx에서는 두 방법의 MIC가 전부 일치하여 한단계희석정도의 차이를 보인 경우는 없었고, Su, Tp, Gm, To등에서는 희석한단계 또는 그 이상의 차이를 보인 경우는 미량희석법의 MIC가 한천희석법에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

Table 5는 *P. aeruginosa* 20주에 대한 성적으로 Cm, Sm, Ap, Tp, Km, Ct 및 Cf 등 7종의

Table 4. Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Klebsiella* sp. (32 strains)

Drug	Difference of MICs <sup>a</sup>									Agreement <sup>b</sup> (%)
	< -3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	> +3	
Cm	.	.	3	7	19	3	.	.	.	90.6
Tc	1	.	3	6	19	3	.	.	.	87.5
Sm	.	.	2	9	18	3	.	.	.	93.8
Su	6	2	4	2	18	.	.	.	.	62.5
Ap	.	.	.	5	20	6	1	.	.	96.9
Tp	.	1	1	1	29	.	.	.	.	93.8
Na	.	.	.	.	30	1	.	.	1	96.9
Rf	.	.	.	8	21	3	.	.	.	100.0
Km	.	1	.	2	25	1	1	1	.	87.5
Gm	1	.	2	5	24	.	.	.	.	90.6
Ak	.	.	.	1	28	2	1	.	.	96.9
To	.	.	1	4	26	.	.	1	.	93.8
Ct	.	.	2	8	18	4	.	.	.	93.8
Cf	.	1	2	1	20	8	.	.	.	90.6
Mx	.	.	.	.	32	.	.	.	.	100.0
Cb	.	.	.	3	22	4	3	.	.	90.6

<sup>a</sup>S, same MICs by two methods.

- indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilution.

+ indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>b</sup>Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

항균제에서 100%의 일치율을, Na, Rf, Gm, Ak, To 및 Cb에서는 95%, Tc, Su 및 Mx에서는 90%의 일치율을 보였다. Tp 및 Na에서는 두 방법의 MIC가 일치하는 경우보다 한단계회석 정도의 차이를 보이는 경우가 더 많았고, Rf 및 Cb에서는 미량회석법의 MIC가 한단계 낮은 경우가 많이 있었고, 또한 MIC가 일치하는 경우와 그렇지 않은 경우가 동수 있었다.

Table 6은 *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter* 및 *Enterobacter* 등 총 33주에 대한 성적이다. 가장 높은 일치율을 나타낸 항균제는 Rf(100%)이었고, Tc는 75.8%로 가장 낮았다. 그리고 Cb, Cm, Mx, Gm, Ct 및 Cf 순으로 97.0%에서 90.9%의 일치율을 보였고 Sm, Su, Tp, Na 및 Km은 87.9%, Ap와 To는 84.8%, Ak는 81.1%의 일치율을 보였다. Cm, Tc, Su 및 Cb 등의 항균제에서는 미량회석법의 MIC가 한천회석법보다 한단계회석정도 이상으로 높은 경우는 없었고, Mx에서는 이와는 반대양상을 보였다. 특히 Cm에서는 미량회석법의 MIC가 한단계 낮은 경우가 다소 많았다.

## 고 찰

미량회석법을 이용한 항균제감수성검사법이 소개된 이래 그 사용빈도는 점점 증가추세에 있는데, 이는 항균제의 순차적 회석과 배지의 분주 및 균점종 등에 있어 반자동화기구의 개발 등에 의해 촉진되어 왔으며, 항균제 및 배지가 들어있는 상품화된 미량회석용 tray가 시판되면서 한층 더 사용빈도가 증가되었다<sup>6, 11, 13, 17~19, 31</sup>. 그러나 아직 우리나라에서는 이 방법을 이용한 항균제감수성검사법에 대한 보고가 거의 없을 뿐만 아니라 또한 보편화되어 있지 않아 안타까운 실정이다.

본 실험은 임상가검물에서 흔히 분리되는 포균, 장내세균, 녹농균 등에 적용할 수 있는 미량회석법에 의한 항균제감수성검사의 개선을 추구하여, 각 공시균 마다 공시배지를 달리하여 각종 항균제에 대해 MIC를 측정하여 표준법으로 알려진 한천회석법으로 얻은 MIC와 비교검토하였다. 포균에서는 18종, *E. coli*, *Shigella* 및 *Kleb-*

**Table 5.** Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Pseudomonas aeruginosa* (20 strains)

Drug	Difference of MICs <sup>a</sup>									Agreement <sup>b</sup> (%)
	<-3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	>+3	
Cm	.	.	.	1	19	.	.	.	.	100
Tc	.	2	.	5	13	.	.	.	.	90
Sm	.	.	.	1	18	1	.	.	.	100
Su	.	.	2	1	17	.	.	.	.	90
Ap	.	.	.	1	19	.	.	.	.	100
Tp	.	.	.	14	6	.	.	.	.	100
Na	.	.	1	4	4	11	.	.	.	95
Rf	.	.	1	7	10	2	.	.	.	95
Km	.	.	.	1	19	.	.	.	.	100
Gm	.	.	1	2	17	.	.	.	.	95
Ak	.	.	.	3	14	2	.	.	1	95
To	1	.	.	1	18	.	.	.	.	95
Ct	.	.	.	.	20	.	.	.	.	100
Cf	.	.	.	.	20	.	.	.	.	100
Mx	.	1	.	3	11	4	1	.	.	90
Cb	.	.	1	9	10	.	.	.	.	95

<sup>a</sup>S, same MICs by two methods.

- indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilution.

+ indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>b</sup>Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

*siella*는 13종, 녹농균은 16종의 항균제에서 한천회석법의 결과와 90% 이상의 일치율을 보였으며, *Serratia*를 비롯한 장내세균(Table 6)에서는 7종의 약제에서 90% 이상의 일치율을, 90% 이하의 일치율을 보인 항균제에서도 대부분에서 80%이상의 일치율을 보여 Marymount 및 Wentz<sup>27)</sup>, Harwick 등<sup>15)</sup> 그리고 Gavan 및 Town<sup>12)</sup> 등의 미량회석법에 의한 감수성검사가 신빙성이 있다는 보고와 일치한다고 하겠다. 일치율이 낮은 항균제에 대해서는 더 많은 추구실험이 필요할 것으로 생각된다.

MIC를 판정함에 있어 실험실 나름대로의 판정 기준의 설정이 요구된다. 즉, 판정기준이 모호한 경우에는 실험자에 따라 MIC가 달라질 수 있기 때문이다. 본 실험에서는 한천회석법은 Lennette 등<sup>21)</sup>과 Thornsberry 등<sup>32)</sup>의 기준에 따랐고, 미량회석법에서는 주로 Tilton 등<sup>34)</sup>과 Lennette 등<sup>21)</sup>의 기준에 따랐는데, 미량회석용 tray에 명확한 배지의 혼탁 또는 뿌러진 균침전이 있는 경우 등을, 그리고 몇가지 등의 균발육기준을 설정하여 균이 발육하지 못한 항균제의 최소농도를 MIC로

판정하였다. 그러나 위의 기준만으로 MIC를 판정함에 있어 육안적 관찰이 잘 안되는 경우가 다소 있었는데, Goss 및 Cimijotti<sup>14)</sup>는 triphenyl tetrazolium chloride(TTC)를 배지에 첨가사용하여 균의 성장에 의해 TTC가 환원되어 빨간색의 불용성 formazin이 형성되어 MIC의 육안적 관찰이 용이하다고 하여, 또 Tippet 등<sup>35)</sup>과 Conrath 및 Coupe<sup>9)</sup>은 dextrose와 pH-지시약제를 배지에 첨가사용하면 균의 성장에 의해 dextrose가 분해되어 산이 생성됨으로 배지의 색깔변화가 일어나 MIC판정이 아주 용이하다고 하였기에, 본 실험에서는 포균 및 장내세균에서는 0.3% dextrose와 0.004%의 phenol red를 첨가한 배지를 공시하였고 녹농균에서는 포균 및 장내세균과는 달리 MHDP에서는 색깔변화가 잘 나타나지 않아 OF basal medium에서 한천을 제거한 다음, 1% dextrose를 첨가 사용한 결과 색깔변화관찰이 용이하였다. 그래서 앞에서 언급한 균의 발육기준과 아울러 배지의 색깔변화등을 보아 MIC를 판정하였다. 이렇게 함으로써 보다 정확한 MIC를 판정할 수 있었다고 사료된

**Table 6.** Comparative distribution of MICs by agar dilution method and microdilution broth system in *Serratia* sp.(16)<sup>a</sup>, *Proteus* sp.(11), *Citrobacter* sp.(3), and *Enterobacter* sp.(3)

Drug	Difference of MICs <sup>b</sup>									Agreement <sup>c</sup> (%)
	< -3	-3	-2	-1	S	+1	+2	+3	> +3	
Cm	.	.	2	15	16	.	.	.	.	93.9
Tc	2	1	5	7	18	.	.	.	.	75.8
Sm	.	.	2	3	21	5	2	.	.	87.9
Su	1	2	1	1	28	.	.	.	.	87.9
Ap	.	.	5	6	21	1	.	.	.	84.8
Tp	1	.	2	3	26	.	.	1	.	87.9
Na	.	.	.	1	26	2	3	.	1	87.9
Rf	.	.	.	9	20	4	.	.	.	100.0
Km	.	.	2	3	25	1	1	1	.	87.9
Gm	.	1	2	4	23	3	.	.	.	90.9
Ak	1	.	1	4	18	5	4	.	.	81.8
To	.	1	4	4	21	3	.	.	.	84.8
Ct	1	.	1	2	24	4	.	.	1	90.9
Cf	1	1	1	4	22	4	.	.	.	90.9
Mx	.	.	.	.	26	5	1	1	.	93.9
Cb	1	.	.	3	29	.	.	.	.	97.0

<sup>a</sup>Number of strains tested in parentheses.

<sup>b</sup>S, same MICs by two methods.

- Indicates lower MICs of microdilution broth system than agar dilution method by numbered doubling dilution.

+ Indicates lower MICs of agar dilution method.

<sup>c</sup>Difference of MICs in one doubling dilution was considered the same.

다.

포균에 있어 요즈음 문제가 되고 있는 것은 Mt에 대한 MIC를 정확히 측정하는 것인데, 특히 Mt내성포균중 이형내성인 균주는 Mt감수성포균과 이에 비해 성장속도가 느린 Mt내성포균이 함께 존재하여 MIC측정에 어려움이 많다<sup>16, 30, 33</sup>. 미량희석법의 MIC가 너무 낮아 Mt내성포균으로 확인된 포균조차도 Mt감수성균으로 판정되는 경우가 자주 있으며 이는 균의 발육이 지연되기 때문이며 이러한 원인을 제거하기 위하여 MH 배지에 식염을 첨가하는 등 Mt의 정확한 MIC를 얻기 위한 연구가 많이 보고 되고 있다<sup>5, 7, 33</sup>. 본 실험에서는 박 및 진<sup>2)</sup>의 보고에 따라 MHDP에 0.3% yeast extract를 첨가한 배지를 사용하였는데 한천희석법의 MIC와 비교하여 96.2%의 높은 일치율을 보여 만족할 만한 결과를 얻었으며 이 배지는 포균의 Mt에 대한 감수성검사에 적합한 배지로 사료되었다.

*E. coli* 및 *Klebsiella* 등에 있어 Su의 일치율이 타 항균제에 비해 낮았는데, 두 방법의 MIC

가 일치하지 않은 경우에는 거의 대부분에서 미량희석법의 MIC가 낮았는데 Su에 대한 감수성 판정에 난점이 많아 한천희석법에 의한 MIC판정이 높게 판정된 결과로 사료된다<sup>21)</sup>.

녹농균의 MIC검사에 사용된 배지는 타 공시 배지에 비해 dextrose농도가 3배 이상인데, 균의 성장에 따라 dextrose가 분해되어 산을 형성함으로써 배지의 pH가 산성으로 되기 때문에<sup>9, 23, 35)</sup>, 산성 pH에서 항균제의 활성이 저하되는 aminoglycoside계 등의 항균제의 활성이 낮아져 MIC가 한천희석법에 비해 다소 높아질 것으로 생각되었으나 Sm, Km, Gm, Ak 및 To 등 본 실험에 공시한 aminoglycoside계 항균제들에서는 두 방법의 MIC가 일치하는 경우가 더 많아 95% 이상의 높은 일치율을 보였다. 녹농균은 액체배지에서 배양시 주로 공기와 접촉이 많은 상층부에 성장함으로써 미량희석용 tray에 균침전 및 혼탁도를 육안적으로 관찰하기에 다소 어려움이 있는데 배지색갈변화를 동시에 관찰함으로써 MIC판정에 많은 도움이 되었다.

순차적으로 희석된 항균제가 들어있는 미량희석용 tray에 공시균을 접종한후 일주야 배양하게 된다. 일주야 배양하는 동안 배지의 증발로 인하여 MIC가 달라질 수 있기 때문에 sealing tape 등으로 미량희석용 tray를 잘 밀봉하여야 한다. 그러나 sealing tape가 아니더라도 단순히 증발을 막을 정도로 밀봉하여 가슴부란기에 배양해 보아도 MIC의 큰 차이는 관찰할 수 없었다. 한편 *Klebsiella*의 경우, sealing tape로 잘 밀봉한 경우에는 배지의 색깔변화관찰이 용이하였으나, 그렇지 않은 경우에는 색깔변화가 이루어지지 않았고 또 sealing tape를 제거한 뒤 30분 정도 후에는, 다른 공시균주와는 달리 원래의 배지색으로 환원되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 *Klebsiella* 자체의 어떤 대사과정에서 배지가 공기와 접촉함으로써 생성된 산이 분해되거나, 알카리성대산산물에 의하여 중화되는 것으로 생각된다. 그러므로 *Klebsiella*의 감수성검사에는 sealing tape 등으로 tray를 잘 밀봉할 필요가 있겠다.

미량희석법은 검사에 필요한 시간, 경비, 인력 그리고 검사수기 등이 간편할 뿐 아니라 경제적이라는 보고가 많이 있는데<sup>8,9,12,19,35</sup>, 특히 Harwick 등<sup>15</sup>은 시험관희석법에 비해 소요되는 비용이 1/3정도로 절약되어 경제성이 높다고 하였으며, McLowry 등<sup>25</sup>은 검사시간이 시험관희석법에 비해 10배정도 빠르다고 하였고, 또 항균제 병용효과실험도 쉽게 행할 수 있다고 하였다<sup>2,26</sup>. 본 실험에서도 한천희석법에 비해 검사수기가 간편했을 뿐만 아니라 검사에 소요되는 항균제 및 배지의 양에 현저한 차이가 있어 널리 이용되어야 할 것으로 생각된다.

앞으로 미량희석법을 이용한 항균제감수성검사법에 영향을 미칠 수 있는 여러 다른 인자에 대해서도 추가하여야 하겠으며, 본 연구에서 실험하지 않은 다른 균종에 대해서도 추후 추가하여야 하겠다.

## 결 론

각종세균에 대하여 미량희석법에 의한 항균제 감수성검사법의 실용성을 알고자 포도구균(포균)은 20종, 그외 균주는 16종의 항균제에 대한 감수성검사를 시행하여 최소발육저지농도(MIC)를 측정하고, 한천희석법으로 얻은 MIC와 비교하여 두 방법의 MIC의 일치율을 보았다.

포균 (157주)에는 Mueller-Hinton broth에 dextrose 0.3%, phenol red 0.004%를 가하고 (MHDP), 여기에 0.3%의 yeast extract를 첨가한 배지를 사용하였다. 한천희석법과 비교해 볼 때 vancomycin에서는 100%의 일치율을, norfloxacin, rifampin(Rf), cefamandole(Cf) 등에서는 99.4%, 그리고 cephalothin(Ct)를 비롯한 14종의 항균제에서는 90%이상의 일치율을 보였으며, penicillin과 ampicillin(Ap)에서는 각 70.7%, 78.3%로 가장 낮았다. 특히 methicillin(Mt)에서는 96.2%의 일치율을 보여 MHDP에 yeast extract를 첨가한 배지가 Mt에 대한 포균의 감수성검사에 적합한 배지로 생각되었다.

*Escherichia coli*를 비롯한 장내세균의 감수성 검사에는 MHDP를 사용하였다. *E. coli*(121주)에서는 Rf (100%), moxalactam (Mx, 100%), amikacin(Af, 99.2%), Ap(98.4%)등 13종 항균제에서 90% 이상의 일치율을 보였고, streptomycin (Sm), Cf, sulfisomidine (Su)은 85.1%, 77.7%, 76.9%로 낮았다. *Shigella*(31주)에서는 gentamicin, Ak, tobramycin(To), Ct, Mx등에서 100%의 일치율을, tetracycline(Tc)등 8종의 항균제에서 90% 이상의 일치율을, Sm과 trimethoprim(Tp)은 87.1% 그리고 nalidixic acid는 83.9%의 일치율을 보였다. *Klebsiella*(32주)에서는 Rf(100%), Mx(100%)등 13종 항균제에서 90%이상의 일치율을, Tc와 kanamycin(Km)은 87.5% 그리고 가장 낮은 일치율을 보인 항균제는 Su(62.5%)였다. *Serratia*를 비롯한 *Proteus*, *Citrobacter* 및 *Enterobacter*등 총 33주에서는 90%이상의 일치율을 보인 항균제는 Rf (100%)를 비롯한 7종 있었고, 8종의 항균제에서 80% 이상의 일치율을, Tc는 75.8%로 가장 낮은 일치율을 보였다.

녹농균(20주)에는 Oxidation-Fermentation basal medium에서 한천을 제거한 뒤 1% dextrose를 첨가한 배지를 사용하였는데, 공시항균제 전부에서 90%이상의 일치율을 보였고, chloramphenicol, Sm, Ap, Tp, Km, Ct, Cf등 7종의 항균제에서는 100%의 일치율을 보였다.

이상의 성적으로 미량희석법에 의한 항균제감수성검사법은 적당한 배지를 사용하면 포균, 장내세균, 녹농균 등의 감수성검사에 이용할 수 있는 좋은 방법으로 생각되었다.

## REFERENCES

- 1) 문충열 · 이유철 · 설성용 : 농유래 Gram 음성균의 항균제내성. 대한화학요법학회지, 2 : 134, 1984.
- 2) 박종욱 · 전도기 : Methicillin 내성 포도구균에 미치는 항균제 병용효과. 계명의대논문집, 5 : 165, 1986.
- 3) 설성용 · 조성만 · 전도기 : 가축 유래 대장균의 항균제내성 및 R-plasmid. 대한화학요법학회지, 2 : 144, 1984.
- 4) 임영수 · 이유철 · 서민호 · 설성용 · 조동택 · 전도기 : *Pseudomonas aeruginosa*의 Pyocin형 및 항균제내성. 대한화학요법학회지, 1 : 270, 1983.
- 5) Barry AL and Badal RE : Reliability of the microdilution technique for detection of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Pathol.* 67 : 489, 1977.
- 6) Barry AL, Jones RN and Gavan TL : Evaluation of the micro-media system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing : A collaborative study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13 : 61, 1978.
- 7) Boyce JM, Lytle LS and Walsh DA : Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by microdilution and disk elution susceptibility systems. *J. Clin. Microbiol.* 20 : 1068, 1984.
- 8) Chitwood LA : Tube dilution antimicrobial susceptibility testing : Efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories. *Appl. Microbiol.* 17 : 707, 1969.
- 9) Conrath TB and Coupe NB : Handbook of manual microtiter procedures. 2nd ed. Whitefriars press Ltd., London and Tonbridge, 1978.
- 10) Edwards PR and Ewing WH : Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Burgess Pub., Minneapolis, 1972.
- 11) Gavan TL, Jones RN and Barry AL : Evaluation of the sensititre system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing : A collaborative study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17 : 464, 1980.
- 12) Gavan TL and Town MA : A microdilution method for antibiotic susceptibility testing : An evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.* 53 : 880, 1970.
- 13) Gerlach EH, Jones RN and Barry AL : Collaborative evaluation of the microbial profile system for quantitative antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 17 : 436, 1983.
- 14) Goss WA and Cimijotti EB : Evaluation of an automatic diluting device for microbiological applications. *Appl. Microbiol.* 16 : 1414, 1968.
- 15) Harwick HJ, Weiss P and Fekety FR Jr : Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing. *J. Lab. Clin. Med.* 72 : 511, 1968.
- 16) Hindler JA and Inderlied CB : Effect of source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on detection methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 21 : 205, 1985.
- 17) Jones RN, Barry AL, Bigelow J, Gavan TL and Thornsberry C : Evaluation of the MICUR system for quantitative antimicrobial susceptibility testing : A multiphasic comparison with reference methods. *J. Clin. Microbiol.* 16 : 153, 1982.
- 18) Jones RN, Gavan TL and Barry AL : Evaluation of the sensititre microdilution antibiotic susceptibility system against recent clinical isolates : Three-laboratory collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 11 : 426, 1980.
- 19) Jones RN, Thornsberry C, Barry AL and Gavan TL : Evaluation of the sceptor microdilution antibiotic susceptibility testing system : A collaborative investigation. *J. Clin. Microbiol.* 13 : 184, 1981.
- 20) Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr and Sommer HM : Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 2nd ed. Lippincott JB Co., Philadelphia, 1983.
- 21) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ : Manual of clinical microbiology. 4th ed. American society for

- Microbiology. Washington DC, 1985.
- 22) Levy SB, Clowes RC and Koenig EL : Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids. Plenum Press, New York, 1981.
  - 23) Lorian V : Antibiotics in laboratory medicine. 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1986.
  - 24) Ma MY, Goldstein EJC, Friedman MH, Anderson MS and Mulligan ME : Resistance of gram-negative bacilli as related to hospital use of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24** : 347, 1983.
  - 25) MacLowery JD, Jaqua MJ and Selepak ST : Detailed methodology and implementation of a semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl. Microbiol.* **20** : 46, 1970.
  - 26) MacLowery JD and Marsh HH : Semiautomatic microtechnique for serial dilution antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory. *J. Lab. Clin. Med.* **72** : 865, 1968.
  - 27) Marymont JH Jr and Wentz RM : Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtiterator system. *Am. J. Clin. Pathol.* **45** : 548, 1968.
  - 28) Murry BE and Mollering RC Jr : Patterns and mechanisms of antibiotic. *Med. Clin. North Am.* **62** : 899, 1978.
  - 29) Steers E, Flotz EL and Graves BS : Inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* **9** : 307, 1959.
  - 30) Sutherland R and Rolinson GN : Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* **87** : 887, 1964.
  - 31) Sutter VL, Emmerman J, Randall E, Zabransky RJ and Birk RJ : Establishment of MICs of moxalactam for control and reference anaerobic organisms in agar dilution and microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** : 424, 1985.
  - 32) Thornsberry C, Anhalt J, Barry AL, Gerlach EH, Hossom J, Jones RN, Matsen JM, Mollering RC and Norton R : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova Pa, 1983.
  - 33) Thornsberry C and McDougal LK : Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **18** : 1084, 1983.
  - 34) Tilton RC, Lieberman L and Gerlach EH : Microdilution antibiotic susceptibility test : examination of certain variables. *Appl. Microbiol.* **26** : 658, 1973.
  - 35) Tippet LO, Zeleznick LD and Robb CA : Modification of the microtechnique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. *Appl. Microbiol.* **20** : 342, 1970.
  - 36) Woolfery BF, Ramadei WA and Quall CO : Evaluation of semiautomated micro-broth dilution system for determining minimal inhibitory concentrations of antimicrobics. *Am. J. Clin. Pathol.* **73** : 374, 1980.