

抗菌性物質 感受性試驗의 時間短縮과 臨床的應用

金敎準 · 許敏道

忠南大學校 農科大學

李明煥

忠南家畜衛生試驗所

緒 論

獸醫臨床에서 抗菌性 治療劑를 選擇하기 위하여 藥劑 感受性 試驗을 採擇하여 應用하고 있는 것은 너무나 一般화된 일이다. (7,8,13,14,17~19)

乳牛의 乳房炎을 爲始하여 病原性 微生物에 의한 各種 感染症에 있어 細菌의 藥劑感受性에 關한 疫學的研究로서 抗菌劑의 濫用과 誤用에 따른 耐性 및 抗菌性藥劑의 2,5,16,21,22) 精確한 發育抑制能力을 究明하기 위하여는 最少發育抑制濃度(MIC)²³⁾를 測定하여야 한다. 여기서는 現在까지 disc法이 常用되고 있으나 現行하고 있는 標準法으로서의 判定時間이 너무 많이 所要되고 이 方法은 대부분 單一製劑에 한하여 응용하고 있으며, 市販되고 있는 複合處方된 치료제에 直接 응용할 수 없어 臨床應用上 實際로 크게 有用하지 못하며 반면에 簡易法은 신속한 治療와 豫防을 要하는 急性疾患이나 集團의 疾病이 발생하였을때는 直接法이 매우 有效하지만 出現度가 낮아 빈번히 誤診할 수 있다고 지적한 學者가 많다. (1,3,4,6,11,25,29)

筆者들은 이 점에 着眼하여 簡易法(變法)의 缺陷인 낮은 出現度를 上昇시키고 許容하는 限度內에서 判定時間을 短縮시키며²⁷⁾ 精確한 判定成績을 얻으므로 臨床的 應用價値를 높인 目的으로 簡易法을 實施한 結果 多少의 興味있는 知見을 얻었기에 報告코져 한다.

材料 및 方法

供試菌株 : 家畜衛生研究所와 國立保健研究院에서 分讓받은 포도상 구균속세균 3株와 대장균 속세균 3株를 供試하였다.

培地 : Disc用 培地와 增菌培地는 Table 2에서와 같이 使用하였다.

感受性 Disc : paper disc(Toyo Roshi Co.,Ltd)는 抗生物質 試驗用으로서 直徑 8mm 두께 1.2mm를 使用하였다.

抗菌性 藥劑

a. 乳房炎 治療劑 : (市販되고 있는 乳房炎 연고제는 處方된 複合製劑이므로 disc의 用量을 結定하지않고 직접 使用하여 實施한 結果) *Staphylococcus aureus*에 感受性이 銳敏한 藥劑 5種을 表 3과 같이 選定하여 供試하였다.

b. 抗菌劑 : 表 4에서 表示한 바와 같이 使用頻도가 높고 各系에서 代表로 1種씩을 選定하여 供試하였다.

感受性 檢査法 : 標準法은 (1,2,15,20,26,28) 慣行法에 따라 實施하였으며 여기서는 簡易法에 對하여만 記述한다.²⁵⁾

a. 接種菌液의 準備 : 供試菌株를 增菌培地(No.1)에 接種하여 35~37°C의 배양기에서 (16~18時間 동안) 培養한 菌液을 滅菌生理的食鹽水로 稀釋(0.03ml:10ml)하여 使用하였다.

b. 菌의 接種과 發育 : 滅菌된 spreader에 菌液을 充分히 적시고 고르게 塗抹接種하고 35~37°C에서 5~6時間 동안 배양시켜 集落이 形成되는 것을 確認한 다음 다시 spreader로 再塗抹하였다.

c. 感受性用 disc의 接着과 培養^{25,28)} : 滅菌된 각자로 disc를 抗菌劑에 充分히 적신다음 餘分의 藥劑를 除去시키고 平板培地面위에 놓고 disc의 中央部를 가볍게 눌러 表面에 밀착시킨다음 즉시 배양기에 넣어 뚜껑이 밀으므로 되게 거꾸로 놓아 培養하면서 經時的으로 發育抑制輪의 直徑을 測定하였다.

d. 簡易法의 判定基準 : (一般的으로 感受性試驗의 判定基準은 國際標準을 따르는 것이 常例이지만 本試驗에 使用한 유방염 치료제는 處方된 複合劑이므로 國際的인 標準을 따를수 없어 本 實驗室에서 常用해온 基準을) 表 5와 같이 準用하였다.

e. 藥劑感受性 檢査法의 比較試驗 : CMT法에^{9,10)}의 하여 陽性(++以上)으로 判定된 乳牛의 30分房으로 부터 無菌의으로 採取한 시료를 즉시로 냉장고에 보관하면서 標準法 및 簡易法에 對하여 抑制輪의 發現時間과 出現度를 比較檢討하였다.

Table 1. Strains Used for Sensitivity Test

<i>Staph. aureus</i>	8160(A)	<i>E. coli</i>	112-274 (No.1)
<i>Staph. aureus</i>	ATCC-6538(AA)	<i>E. coli</i>	CDC 63-57(No.2)
<i>Staph. epidermidis</i>	ATCC-12228(E)	<i>E. coli</i>	G-7 (No.3)

Table 2. Composition of Media Used for Sensitivity Test

Enrichment medium (No.1)		Plate medium (No.2)	
Composition	Contents (g/liter)	Composition	Contents(g/liter)
Peptone	10.0	Peptone	10.0
Beef extract	5.0	Beef extract	3.0
NaCl	2.5	NaCl	2.5
		Ager	13-15
Final pH: 7.0±0.1		Final pH: 6.5 ± 0.1	

Table 3. Antibacterial Drug Used for Sensitivity Test

Number	Antibacterial agents (Ointment)	Ingredients and contents	Manufactories
1	Combisecc	(Each 10ml dose contains) Procain penicillin G 100,000 IU H ₂ SO ₄ Dihydrostreptomycin 100mg	Korea Pfizer Co.
2	Foaming udder mycin	(Each 10ml dose contains) Benzyl penicillin procain 300,000 IU Dihydrostreptomycin 100mg Sulfadimethoxin 500mg Nitrofadimethoxin 20mg Dexasone 2mg Vitamin A 10,000 IU Peanut oil Q.S	Riken Chemichal Co. (Japan)
3	Gentamicin	(Each 10g dose contains) Gentamycin 70.0mg Dexamethazone 2.5mg	Dae Sung Microorganism Co. (Korea)
4	Neo-masti	(Each 1g dose contains) Prednisolone 3mg Sulfamerazine 40mg Sulfathiazole 40mg Sulfathomizine 40mg Nitrofurazone 4mg Water soluble ointment base	Sam Sung New Medicine Co. (Korea)
5	Tardomyocel-L	(Each 7.5g dose contains) Benzthine penicillin G 100,000 IU Potassium penicillin G 100,000 IU Chloramphenicol 500mg	Bayer Vetchen Ltd. (Korea)

Table 4. Antibiotics Used for Sensitivity Test

Number	Antibiotic (Injection)	Ingredient and content	Manufactories
1	Chloramphenicol	250mg/ml	Dae Sung Microorganism Co. (Korea)
2	Kanamycin-100 inj.	100mg/ml	Nock Sipja Pharma. Co. (Korea)
3	Oxytetracycline	250mg/vial	Korea Pfizer Co. (Korea)
4	Penicillin aqu.	400.000 I.U/vial	Han Dock Pharma. Co. (Korea)
5	Spiramycin-100 inj.	100mg/titer	Han Kook Vet. Med. Co. (Korea)

Table 5. Criteria for Sensitivity

Reaction	Negative	Suspect	Positive
Diameter of inhibitory zone (mm)	0	8-9 10-15	16-25 26-
Degree	-	± +	++ +++

結果 및 考察

1. 發育抑制輪의 擴大像과 感受性的 時間的 變化: 簡易法에 의한 發育抑制輪의 擴大에 따른 時間的 變化는 Fig. 1과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 disc를 接着한 후 1時間 간격으로 관찰하면서 抑制輪의 直徑을 計測하여 24時間까지의 計測值을 100으로한 成績이다.

乳房炎 治療劑(연고제)에 대한 成績은 combisec을爲 始하여 4時間에는 各各 80%이상으로 나타났으며 6時間 이후는 모두 100%에 도달하였다.

注射用 抗生劑에 대한 成績은 chloramphenicol을爲 始하여 2時間에서 90%이상 이 나타났고 6時間 이후에는 모두 100%에 도달하였다. (臨床에서 일반적으로 感受性試驗의 判定基準는 國際標準을 따르는 것이 常例이겠으나 本 試驗에서는 乳房炎治療劑의 處方된 複合劑이므로 本 實驗室에서 계속常用해온 判定基準에 따라) 表 5와 같이 적용하였다.

感受性의 時間的 變化에 있어서는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 乳房炎 治療劑인 연고제에 있어서는 *Staphylococci*와 *E.coli* 등 6株 모두가 2時間부터 直徑이 10~20mm 範圍內에서 始作하여 24時間까지의 成績은 *E.coli* No.2, No.3와 *Staph.aereus*, *Staph.epidermidis*. 가 26mm以上(卅)으로서 本 基準值보다 강한 感受性을 나타내었으며 *Staph.aureus*와 *E.coli* No.1은 15mm以

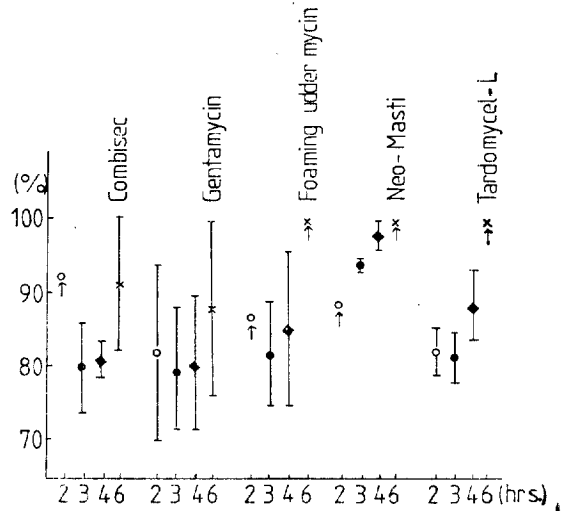


Fig. 1. Enlargement of inhibitory zone in the 6 strains of *Staphylococcus* and *E.coli* (Ointment).

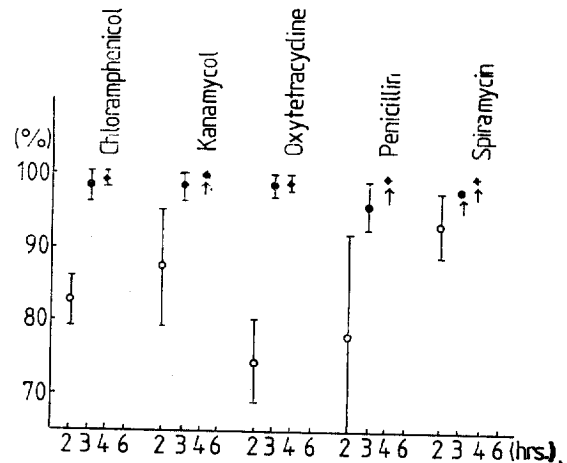


Fig. 2. Enlargement of inhibitory zone in the 6 strains of *Staphylococcus* and *E.coli* (Injection).

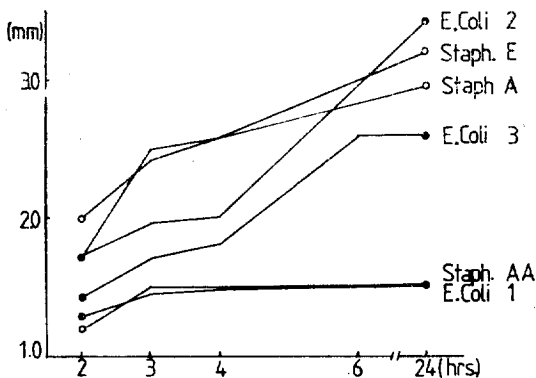


Fig. 3. Changes of inhibitory zone in the sensitivity with times (Ointment).

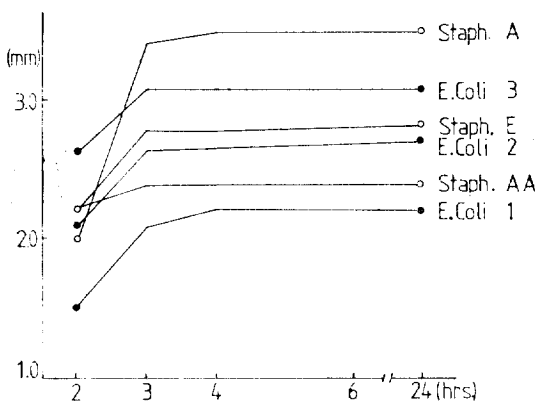


Fig. 4. Changes of inhibitory zone in the sensitivity with times (Injection).

下(+))로서 多少耐性임을 알 수 있었다.

注射劑로 사용한 抗射劑에 대하여는 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 6株중 5株가 2時間에서 20mm 이상으로 始作하여 4~6時間에는 發育抑制輪의 擴大가 종료되고 24時間까지의 擴大像에는 變化가 없었으나 *E. coli* No. 1 1株만은 15mm에서 始作하여 4時間 이후에 擴大가 거의 종료되어 24時間까지의 擴大像에는 變化가 없었고 *Staph. aureus.*, *Staph. epidermidis*와 *E. coli* No. 2 No. 3는 25mm 이상이었고 *Staph. AA*와 *E. coli* No. 1은 25mm 이하로 나타났으나 이들은 모두 卍~卍의 강한 感受性을 보였다.

Paul 등²¹⁾과 金澤²³⁾은 細菌量이 增加하게 되면 最少 發育阻止濃도가 上昇하고 菌量이 減少하게 되면 MIC가 하강한다고 하였으며 또 培養時間이 길어지면 MIC가 上昇하여 8~16時間에서 가장 變化가 크다가 그후 점차로 완화된다고 하였다.

本 試驗에서는 一定한 細菌數를 가지고 同一한 條件下에서 調整하여 실시한 것이다. 再塗抹후 빠른것은 2時間 多少 느린것이더라도 6時間 前後에서 抑制輪의 形成이 完了되었으며 表 6에서와 같이 接種後 적어도 7~12時間內에는 判定이 可能하다고 할 수 있었다.

2. 感受性檢査法에 대한 比較試驗: 現在까지 應用되고 있는 標準法은 基本法으로서 完璧한 方法이라고 할 수 있으나 (判定까지는 많은 所要時間을 必要로 하는 短點이 있어서 이를 補充하기 위하여 簡易法을 考案하여 時間短縮과 出現度의 상승을에 대하여 檢討하였다.) 出現度에 對하여는 標準法이 24時間에서 93%였으며 簡易法이 86%였다. 所要時間에 있어서는 標準法이 50~88時間, 簡易法이 7~12時間이 所要되었다.

이를 考察컨데 標準法은 菌을 分離培養하여 增菌시키는 등 前 處理過程이 必要하므로 時急을 要하는 早速한 判定에는 不適當하며 (簡易法은 判定時間은 신속하나 出現도가 다소 낮은감이 있다.)

小酒井²⁴⁾에 의하면 膿汁이나 分泌物 등의 檢體를 가지고 실시한 試驗에서 相當히 많은 菌數가 있어야 可能하다고 하였고, Schalm 등²⁵⁾은 CMT로서 臨牀型乳房炎 乳牛 773頭의 乳汁에서 細菌數를 調査한 結果 無菌의 例가 12.3%나 있었다고 하였으며 佐藤 등²⁷⁾은 牛乳 每 ml 당 無菌의 例가 14%, 250個 이하가 50%나 된다고 하였다. 따라서 迅速하고 確實한 判定을 얻기 위하여 簡易法에 의하면 檢體를 塗抹한 후 5時間을 發育시킨 다음 指挾의 形成을 確認하고 培地表面을 고르게 再塗抹하게 되면 抑制輪의 形成이 迅速하여지는 것을 볼 수 있었다. Paul 등²¹⁾도 標準法에서 disc를 定置한 후 6~8時間이면 抑制輪이 形成된다고 하였으나 本 試驗에서는 8~18時間이 所要되었고 簡易法으로는 2~6時間에서 判定이 可能하였다. 그 理由에 關하여 考察컨데 培地表面의 再塗抹에 의한 刺戟으로 菌의 發育이 促進되고 指挾을 均等하게 分散시켜 줌으로써 菌數를 高르게 擴散시켜주는 效果가 있었던 것으로 推定된다.

本 簡易法에서는 7~12時間에서 判定이 可能하였으나 檢出率은 多少 낮은 理由로서 乳汁中の 菌數가 적었기 때문에 抗菌劑의 擴散이 빨라 細菌의 發育이 이에 따르지 못하고 殺菌力속이 앞서 作用하여 死滅되었을 可能性이 있을 것으로 생각된다.

끝으로 실제로 試驗에 應用할 경우에는 한 檢體당 2個의 培地를 準備하여 그중 한 培地에만 disc를 놓고 나머지 한個는 培養하면서 관찰하다가 可能性을 보아 必要에 따라 補充하게 되면 出理率은 훨씬 더 上昇할 것으로 생각되며 더욱 더 完璧한 方法이 되는 同時에 臨牀的 應用價値는 높아질 것이다.

Table 6. Comparison on Sensitivity Tests for the Antibacterial Drugs

Methods	Time of appearance			Duration of treat					
	2~8hrs.		~24hrs.	Results	Pre-treat	Post-treat	Total		
	case	%	case	%	case	%	hrs.	hrs.	hrs.
Standard	23	76	5	17	28	93	42-66	8-18	50-88
Modified	22	73	4	13	26	86	5-6	2-6	7-12

結 論

乳房炎을 爲始하여 各種 細菌性 感染病에서 由來하는 原因菌의 抗菌性藥劑에 대한 感受性檢査의 判定時間을 短縮시키고 臨床的應用價値를 確立할 目的으로 實施한 結果를 다음과 같이 結論한다.

1. *Staphylococcus*와 *E.coli* 6株를 供試하여 抗菌性藥劑에 對한 感受性檢査를 실시한 바 發育抑制輪의 擴大像은 2時間에서 始作하여 6時間까지는 모두 100%에 도달하였다.

2. 乳房炎 治療劑(연고제)에 對한 *Staph.A*와 *Staph.E*株 그리고 *E. coli* No.2, No.3株는 6時間에서 卅(26mm 이상)의 強한 感受性을 나타냈으며 *Staph.AA*와 *E. coli* No.1 株는 卍(15mm 이하)로서 多少 耐性을 나타내었다.

3. 注射用抗生劑의 感受性은 *Staph.A*와 *Staph.E* 그리고 *E. coli* No.2, No.3株는 6時間에서 卅를 나타냈고 *Staph.AA*와 *E. coli* No.1株는 卍의 強한 感受性을 나타내었다.

4. 感受性 檢査法에 對한 比較試驗에서 標準法의 出現度는 正確하나 判定時間이 많이 所要되었고 簡易法은 86%의 出現度로서 7~12時間內에서 判定이 可能하였다.

5. 簡易法은 判定時間을 短縮할 수 있었고 簡便하여 臨床的應用價値가 높기 認定되므로 勸奨할 수 있는 方法이라 생각된다.

參 考 文 獻

1. Arcnson, A.R.: The use, misuse and abuse of antibacterial agents. M.V.P. (1975) 56:383.
2. Biberstein, E.L., Franti, 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, 1st ed. (1977) 157:163.

4. Cheattle, E.L.: The single disk sensitivity test using a zone chart. Am. J. Cln.Path. (1967) 48:603.
5. Coles, E.H.: Veterinary clinical pathology. saunders Co.(1980) 424:428.
6. Kowalski, J.J.: Microbial agents and bovine mastitis. J.A.V.M.A. (1977) 170: 1175.
7. Olds, R.J.: Color atlas of microbiology. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago (1975).
8. Low, P., Betty, R. and Adrienne, S.D: Practical clinical microbiology and mycology. New-York (1975).
9. Schalm, O.W. and Silberman, Z.: Some observation on the CMP and its application in heads of co-lective settlements. Israel Rofuah Vet. (1967) 47:24.
10. Schneider, R. and Jasper, D.E.: Standardization of the California mastitis test. Am. J. Vet. Res. (1964) 25:1635.
11. Wilson, G.S. and Miles, A.A. Topley: Principles of bacteriology, virology and immunity. Williams and Wilkins Co. Baltimore(1964).
12. 金敎準: 乳牛와 山羊 및 犬의 乳汁內 殘留抗生物質에 관한 研究 忠南大學校 農業技術研究報告 (1975) 2:199.
13. 金敎準: *Micrococcus pyogens var aureus*에 의한 乳山羊의 壞疽性乳房炎에 관한 臨床學的 研究. 忠南大學校 農業技術研究報告 (1976).
14. 金敎準, 李洙基: 젖소乳房炎由來 staphylococcus群의 抗菌性 製劑에 대한 感受性試驗. 大韓獸醫師會誌 (1982) 18:9.
15. 김봉환, 이재진, 김동성: 대장균 설사증에 이환된 소, 돼지, 양에서 분리한 대장균의 약제감수성. 대한수의학회지(1979) 19:21.

16. 金鍾冕, 宋憲鍾, 郭澤勲: 生乳에서 分離된 葡萄球菌의 藥劑耐性. 大韓獸醫學會誌 (1979) 15:143.
17. 손봉환, 김효린, 한우중, 정홍환, 김수장: 乳房炎에서 分離한 Staph와 Strept.의 抗菌劑에 대한 感受性試驗. 大韓獸醫學會誌 (1975) 15:101.
18. 孫奉煥: 治療劑의 試驗管內와 生體內感受性的 比較와 治療試驗. 大韓獸醫學會誌 (1976) 15:109.
19. 石瑚峰, 李鉉洙: Lancefield grouping에 의한 乳房炎由來 staphylococcus의 固定과 抗生物質에 對한 感受性 課查. 大韓獸醫學會誌 (1975) 15:69.
20. 鄭昌國, 韓弘栗, 鄭吉澤: 우리나라 젖소 乳房炎原因菌의 疫學的 課查 및 治療에 關한 研究. 大韓獸醫學會誌 (1970) 10:39.
21. 韓弘栗, 鄭吉澤: 乳牛乳房炎 原因菌 *Staphylococcus aureus*의 각종 化學療法劑에 대한 感受性試驗. 大韓獸醫學會誌 (1972) 12:85.
22. 堂本憲司, 浜田義雄, 久米常夫: 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.
23. 金澤 裕: 感受性 Disc法の 基礎と臨床. 메デア사클 (1964) 19:8.
24. 小酒井望: 感受性 Disc法による Sulfa劑 感受性的의 研究. 榮研. Digest (1972)No.2.
25. 中村良一: 臨床家畜內科 治療學. 東京. (1975)
26. 農林水産省: 動物用 抗生物質製劑 檢定基準. 農林告示, 東京(1979).
27. 佐藤雄夫, 吉田康幸, 佐々木康友: 乳房炎 乳汁由來菌의 藥劑感受性 檢査에 於ける 判定時間의 短縮および 其의 臨床應用, 獸畜新報. (1976) 663:646.
28. 清水健, 柴田重孝: 各種動物由來 브투우球菌의 抗生物劑耐性, 日本細菌學雜誌(1967) 222:56.
29. 清水龜平次, 小野齊: 乳牛의 乳房炎. 明文書房. 東京(1974).

A Drug Sensitivity Test for Shortening of Detection Time

Kyo-Joon Kim, D. V. M., M. S., Ph. D., Min-Do Hu, D. V. M., M. S.

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

Myung-Hwan Lee, D. V. M., M. S.

Chungnam Animal Health Experimental Station

Abstract

This study was conducted to evaluate the modified drug sensitivity test for the shortening of detection time and clinical application. The results obtained were summarized as follows.

1. Inhibitory zone in 6 strains of *Staphylococcus* and *Escherichia coli* tested to sensitivity test were reached at 100% between 2 and 6 hours.
2. The sensitivity test of *Staphylococcus* A,B and *E. coli* No.2, No.3 to antibacterial ointment drugs were strong positive(+++), but *Staphylococcus* A.A. and *E. coli* No.1 were mild resistant(+).
3. The sensitivity test of *Staphylococcus* A.B and *E. coli* No.2, No.3 to antibacterial injection drugs in 6 hours after treatment were strong positive(+++), and *Staphylococcus* A.A. and *E. coli* No.1 were moderate positive(++).
4. This modified method was detected 86% degree of sensitive between 7 to 12 hours after treatment.
5. We think this modified method was more practical compare to other methods.