

*Bacteroides fragilis*의 E-test와 한천 평판 희석법에 의한 항균제 감수성상의 비교

영남대학교 의과대학 미생물학교실

김희선 · 김성광

대전선병원 가정의학과

차화선

서 론

병원성 세균의 항생제 감수성 검사법으로는 임상 검사실에서 가장 흔하게 사용하는 원판 확산법의 항생제의 최소 발육 억제 농도 (Minimal Inhibitory Concentration : MIC)를 결정하는 한천 평판 희석법 그리고 액체 배지 희석법, borth disk elution법 등 여러 종류가 있으나 이들 검사 방법은 균액의 농도, 배양 시간, PH, 대기의 상태, 항균제의 안정도에 따라 감수성상의 결과가 다양하게 나타나므로 표준적인 시행 과정이나 지표적인 방법이 강조 되어왔다¹⁾.

그중 혐기성 세균의 항생제 감수성 검사는 이들 균의 물리적 생화학적 특성으로 인하여 호기성 세균에 비해 감수성상의 정확도에 많은 문제점이 되어왔다^{1,2)}. 이에 최근에 개발된 E-test법 (AB Biodisk, Solna, Sweden)은

plastic strip에 항생제의 농도가 continuous gradient로 도포된것으로 항생제의 감수성상 뿐 아니라 MIC도 동시에 결정되는 것으로 이를 인체에 대표적 정상 균총인 혐기성 세균 *Bacteroides fragilis*에 적용하여 기존의 conventional agar dilution 방법과 비교하고 동시에 사용 배지에 따른 감수성상의 차이를 관찰하여 최근 많이 사용되는 quinolone 제재에 대한 *Bacteroides fragilis* group (BFG)의 감수성상도 관찰하였다.

재료 및 방법

재 료

사용 균주 : 임상에서 분리된 *B. fragilis* 45주를 사용하여 E-test와 기존의 한천 평판 희석법으로 감수성을 비교하였으며 quinolone

제제에 대한 감수성상은 임상에서 분리된 *Bacteroides fragilis* (BFG) 60주 (*B. fragilis* 45주, *B. distasonis* 6주, *B. ovatus* 5주, *B. thetaio-taomicron* 4주)를 대상으로 실시하였다.

항균제 : E-test 사용 약제는 현재 임상에서 초 광범위 항균제로 많은 관심을 받고 있는 cefalor (CF : MIC range 0.016~256µg/ml), ciprofloxacion (CFX : 0.002~32µg/ml), imipenem (IM : 0.002~32µg/ml) 3종을 사용하였으며 이와 비교한 한천 평판 회석법의 약제는 CF (대웅 릴리), CFX (Bayer, Germany), IM (萬有 제약, 일본)로서 E-test의 사용 약제와 같은 약제를 사용하였다.

BFG의 quinolone 제제에 대한 시험관내 감

수성 검사 사용 약제는 CFX (Bayer, Germany), enoxacin (ENX : 삼아제약), norfloxacin (NFX : 종근당), ofloxacin (OFX : 제일약품) 및 pefloxacin (PEX : 한국 롱프랑)의 5종을 사용하였다.

E-test : E-test는 Sweden의 AB Biodisk사에서 개발한 얇고 단단한 비 기공성의 Plastic test carrier (5 mm×50 mm)로써 항균제의 종류에 따라 0.016~256 µg/ml 또는 0.002 ~ 32 µg/ml의 약제 농도가 2단계 회석 배수로 continuous gradient로 plastic strip 한면에 도포된것으로 감수성 검사방법은 원판 확산 회석법¹⁾의 진행과 동일한 방법이다(그림 1).

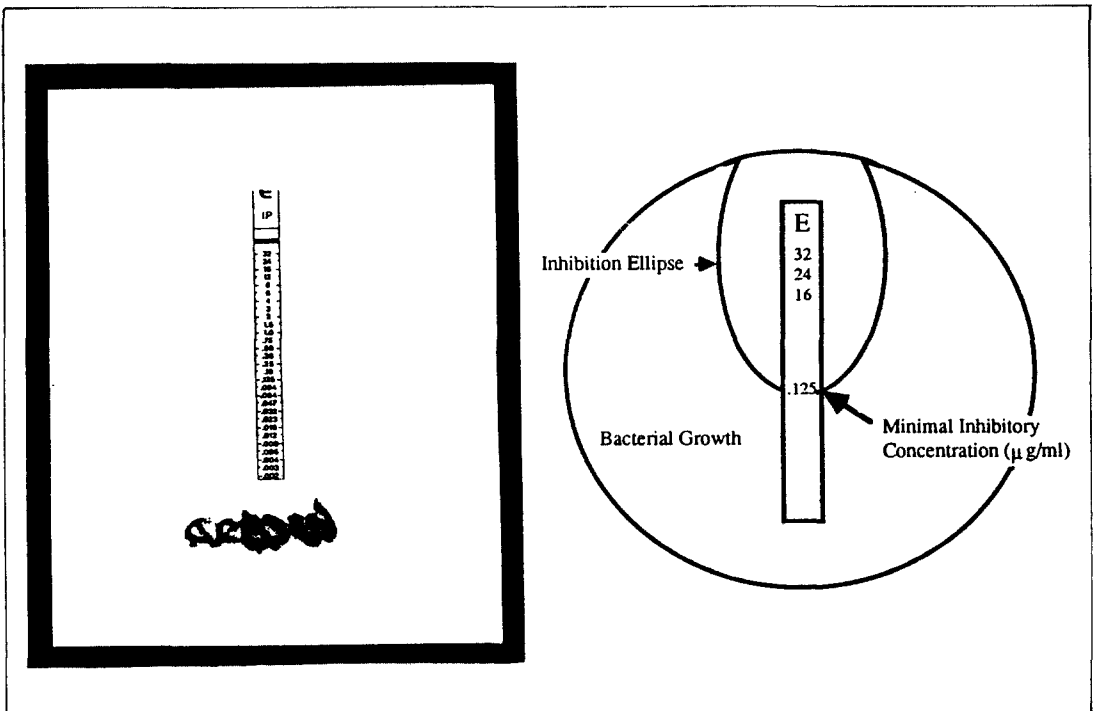


Fig. 1. E-test demonstrating the point at which the zone of inhibition of bacterial growth intersects the antimicrobial strip.

사용 배지 : 사용된 배지는 brain heart infusion agar (BHIA), Mueller-Hinton agar (MHA), Wilkins Chalgren agar (WCA)의 3 종류를 사용 하였다.

방 법

E-test : 접종 균액은 thioglycollate 배지에 24 시간 배양된 균액을 brucella broth로 MacFarland 0.5로 맞추어 각 종류의 평판 배지에 멸균 면봉으로 면밀히 도포하여 말린 후 CP, CFX, IM의 strip을 균이 접종된 배지위에 radical pattern으로 얹은 후 48시간, 35°C, anaerobic jar system (GasPak : BBL)으로 혐기 배양을 실시하였다.

한천 평판 회석법 : NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory)³⁾ 기준에 준하여 실시하였으며 접종 균액은 E-test법과 동일한 균액으로 Steers replicator를 사용하여 항균제

가 각 농도별로 함유된 배지에 접종한 후 48 시간, 35°C, 혐기 배양을 실시하였다.

BFG의 quinolone제제에 대한 감수성 검사는 BHIA를 기본배지를 사용하여 이와 동일한 방법으로 실시하였다.

성 적

B. fragilis 45주에 대한 항균제 감수성 검사를 E-test법과 한천 평판회석법을 이용하여 BHIA, MHA, WCA배지에서 실시한 결과 실험 전균주는 BHIA, WCA에서는 균의 증식이 극히 양호하였으나, MHA에서는 다른 배지에 비해 균의 증식이 극히 불량하여 E-test법의 MIC성적은 불가능 하였으며 한천 평판 회석법의 MIC 또한 BHIA, WCA에 비해 낮게 관찰되었다(그림 2).

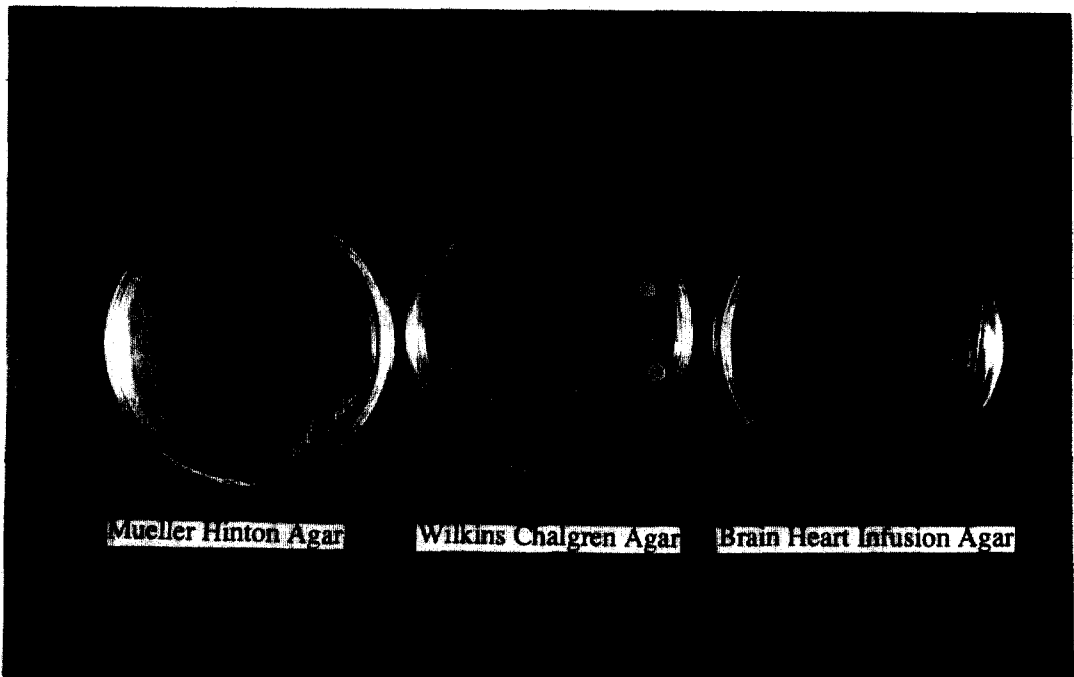


Fig. 2. Comparison of growth activity for Bacteroides fragilis by using various media.

배양 48시간 후 평판 회석법의 MIC를 기준으로 하여 E-test의 MIC결과를 비교할때 한천 평판 회석법의 MIC와 E-test의 MIC가 동일하게 나타난 균주는 CFX는 WCA상에서 20.0%, BHIA에서 31.1%, IM은 WCA 17.1%, BHIA 48.9%로 WCA에 비해 BHIA상에서 높은 일치율을 보였다. 실험 균주의 E-test

MIC가, 약제의 2배수 회석농도를 기준으로, 한천 평판 회석법 MIC치의 ± 1 dilution내에 속하는 비율은 CFX는 WCA 93.3%, BHIA 93.3%, IM은 WCA 87.81%, BHIA 86.7%로 전체적으로 90.3%가 ± 1 dilution 범위내에 속하였다(표 1).

Table 1. Comparison between E-test MICs and agar dilution MICs for 45 strains of *B. fragilis*

Antibiotics	media	% of E-test MICs within the following concentration(log ₂) of agar dilution MICs							% within ± 1 dilution
		<-2	-2	-1	0	1	2	>2	
Ciprofloxacin	WCA	0	0	2.2	20.2	71.1	6.7	0	93.3
	BHIA	2.2	4.4	15.6	31.1	46.7	0	0	93.3
Imipenem	WCA	2.2	12.2	61.0	17.1	9.8	0	0	87.8
	BHIA	2.2	6.7	24.4	48.9	13.3	4.4	0	86.7
Cefaclor	WCA				ND				
	BHIA				ND				

ND : not determined, All strains showed growth activity and resistant pattern

WCA : Wilkins Chalgren agar

BHIA : Brain Heart Infusion agar

In the case of Mueller-Hinton agar, All strains show no growth activity with E-test strip.

사용된 약제를 기준으로 배지와 방법에 따른 MIC를 비교해 보면 CFX는 한천 평판 회석법에 비해 E-test법의 MIC₅₀, MIC₉₀가 다소 높게 나타났으나 resistant breakpoint를 4 µg/

ml로 했을때 한천 평판 회석법의 WCA는 100%, BHIA 100%의 동일한 내성률을 보였고 E-test법의 WCA 97.8%, BHIA 100%로 한천 평판 회석법과 거의 같은 내성률을 보였으나,

Table 2. Comparison of MICs of ciprofloxacin for *B. fragilis* 45 strains by using various media and methods

Medium	MIC ₅₀ (µg/ml)		MIC ₉₀ (µg/ml)		Resistant at breakpoint (4µg/ml)	
	agar	E-test	Agar	E-test	Agar	E-test
WCA	4	8	8	16	100.0%	97.8%
BHIA	4	6	8	8	100.0	100.0
MHA	2	ND	2	ND	8.9	ND

ND : not determined, no growth activity in MHA with E-test strip

한천 평판 회석법의 MHA에서는 8.9%의 내성률로 크게 어긋나는 결과를 관찰할 수 있었으며 이는 MHA 내의 *B. fragilis*에 대한 어떠한 억제 작용으로 생각된다(표 2). IM은 한천 평판 회석법에 비해 E-test의 MIC₅₀,

MIC₉₀이 다소 낮았으나 resistant breakpoint를 8μg/ml로 했을 때 한천 평판 회석법의 WCA는 0.0%, BHIA는 4.4% E-test의 WCA 또한 0.0%, BICH 4.4%로 한천 평판 회석법과 E-test법의 결과가 일치하였다(표 3).

Table 3. Comparison of MICs of imipenem for *B. fragilis* 45 strains by using various media and method

Medium	MIC ₅₀ (μg/ml)		MIC ₉₀ (μg/ml)		Resistant at breakpoint (8 μg/ml)	
	Agar	E-test	Agar	E-test	Agar	E-test
WCA	0.031	0.023	0.5	0.19	0.0%	0.0%
BHIA	0.063	0.063	1	0.75	4.4	4.4
MHA	0.031	ND	0.5	ND	0.0	ND

ND: not determined, no growth activity in MHA with E-test strip

Table 4. Comparative susceptibility of *B. fragilis* group to quinolones

Quinolone	<i>B. fragilis</i> (n=45)			<i>B. distasonis</i> (n=6)			<i>B. ovatus</i> (n=5)			<i>B. thetaiotaomicron</i> (n=4)		
	MIC(μg/ml)			MIC(μg/ml)			MIC(μg/ml)			MIC(μg/ml)		
	range	50	90	range	50	90	range	50	90	range	50	90
Ofloxacin	2 - 16	2	4	2 - 4	2	2	2 - 16	4	16	2-4	2	4
Ciprofloxacin	4 - 32	4	8	8 - 32	8	16	4 - 16	16	16	8-16	16	16
Pefloxacin	4 - 32	8	8	8 - 32	8	32	4 - 32	32	32	16-32	16	32
Enoxacin	32 - 256	32	32	16 - 64	32	32	32	32	32	32	32	32
Norfloxacin	16 - >256	128	256	128 - >256	256	256	32 - >256	32	32	>256	>256	>258

현재 크게 각광받고 있는 quinolone제제에 대한 BFG의 감수성상을 기존의 한천 평판 회석법으로 실시한 결과 실험 균주 60주는 사용한 quinolone제제중 NFX에 가장 높은 내성률을 보였으며 OFX에 대해 대다수의 균주가 감수성을 보였다. BFG중 *B. fragilis*는 다른 균종에 비해 CFX, PFX에 대해 다소낮은 MIC₉₀치를 보였으나 BFG 균종간의 quinolone제제

에 대한 감수성상의 차이는 두드러지게 나타나지 않았다(표 4).

고 찰

항생제 감수성 검사법으로서 E-test법은 기존의 한천 평판 회석법에 비해 시간의 절

약과 간단한 방법으로 손쉽게 MIC를 구할 수 있는 장점을 가진다.

*B. fragilis*는 다른 혐기성 세균에 비해 비교적 용이하게 배양이 잘되는 균종으로 인체 내의 혼합 감염시 주된 혐기성 분리 균주이다.

이들 균종의 항균제에 대한 감수성 검사로써 한천 평판 회석법과 broth disk elution법을 사용 하나 균주, 실험 약제, 실험방법에 따라 결과가 다양하게 나타난다⁴⁻⁶⁾.

이 실험은 *B. fragilis*를 대상으로 새로 개발된 항생제 감수성 검사법인 E-test법과 기존의 방법인 한천 평판 회석법의 MIC결과를 비교 하였으며 사용 배지에 따른 MIC의 변화를 관찰하였다. E-test의 결과 실험 균주 90.3%가 한천 평판 회석법의 MIC \pm 1 dilution 범위에 속하였으며 이는 Citron 등⁷⁾의 보고서와 유사하게 나타났으나 일부는 접종균액의 농도나 약제의 resistant breakpoint의 결정에 따라 감수성상의 결과가 다르게 관찰되었으며 이 또한 Baker 등⁸⁾의 보고서와 일치하였다.

E-test와 한천 평판 회석법의 MIC의 불일치의 주된 요인으로는 약제농도의 회석배수의 차이에 기인된 것이라 생각된다. 이는 한천 평판 회석법의 경우 NCCLS의 기준으로 약제농도를 0.008~256 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 2배수 회석으로 실시하였으나 E-test의 경우 CF의 약제농도 회석배수는 한천 평판 회석 배수와 동일하나 CFX와 IM은 0.002~32 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도의 범위에서 1.5배수 회석 농도로 정해져 한천 평판 배지의 회석 배수에 비해 더 세분화된 농도로 나타나기 때문일 것으로 생각되었다. 또한 CFX에 비해 IM의 MIC가 한천 평판 회석법 MIC의 \pm 1 dilution에 포함되는 비율이 더 낮은 이유를 IM에 대한 실험 균

주의 높은 감수성상으로 이들의 MIC는 대부분이 0.016~0.125 $\mu\text{g/ml}$ 에 속하는 것으로 높은 농도에서 결정되는 MIC 약제들에 비해 이런 경우, 또한 회석배율(1.5배)이 다른 상황에서, MIC의 일치율은 떨어진다고 생각되었다.

CFX의 MIC₅₀, MIC₉₀의 범위가 한천 평판 회석법에 비해 E-test에서 다소 높게 나타나고 IM에서는 오히려 다소 낮게 나타난 것은 아마도 균점중량의 차이에 의한 것으로 생각되며 Snyderman 등⁹⁾의 보고에 의하면 사용하는 배지에 따라 방법에 따라 MIC의 상당한 차이를 관찰할 수 있으며 WCA에서 MIC가 다소 높게 나타나는 경향이 있다고하나 본 실험에서는 IM의 경우 WCA에 비해 BHIA에 다소 높게 나타나 사용 항생제에 따라 다를 수도 있다고 생각되었다.

*B. fragilis*는 약제를 첨가하지 않은 상태의 MHA내에서도 균의 증식이 극히 불량하여 E-test법으로는 MIC를 결정할 수 없었으며, 한천 평판 회석법에서의 MIC 결정 또한 쉽지않아 MHA 배지에서의 MIC결과는 정확하지 않을 수도 있으리라 생각된다. MHA배지는 일반적으로 가장 흔히 사용되는 항균제 감수성 검사용 배지로서 특히 gonococcus와 meningococcus의 증식을 원활히 해주는 배지¹⁰⁾로 알려져 있으나 이 배지에서는 혐기성 세균인 *B. fragilis*의 증식을 억제시키는 억제 인자가 있을 것으로 생각되었다. BFG의 일반적인 항균제에 대한 감수성상은 균종에 따라 다양한 양상을 나타내나¹¹⁻¹³⁾ 본 실험의 quinolone제에 대한 감수성상의 양상에서는 균종간의 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었으며 호기성균주에 비해 혐기성균은 quinolone제에 대해

낮은 감수성을 나타낸다는 보고들¹⁴⁻¹⁵⁾과 유사하게 본 실험에서도 OFX를 제외하고는 낮은 감수성상을 보였다.

본 실험의 결과 E-test는 *B. fragilis*의 항균제 감수성 검사법으로 한천 평판 회석법과 비교하여 90.3% (within±1 dilution)의 높은 일치율을 보였으며 사용의 간편함, 시간의 절약, MIC 결정의 용이함 등으로, 비용이 비교적 비싼 단점은 있으나, 기존의 다른 방법에 비해 여러가지 장점을 갖추었다 생각된다. *B. fragilis*의 항균제 감수성검사를 위한 기본 배지로서 MHA는 부적합하며 BHIA, WCA는 적합한것으로 나타났으며 이 두가지 배지에서의 MIC의 차이는 두드러지게 관찰되지 않았다. quinolone제제에 대한 BFG의 감수성상은 OFX를 제외한 약제에 대하여 대부분의 균종이 내성을 띄었으며 균종간의 이들 약제에 대한 감수성상의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다.

요 약

*Bacteroides fragilis*의 임상 분리균주 45주의 cefaclor, ciprofloxacin, imipenem의 3종 항균제에 대한 감수성 검사를 기존의 한천 평판 회석법과 최근 새로이 개발된 E-test (AB Biodisk, Slona, Sweden)법으로, brain heart infusion, Mueller-Hinton, Wilkins Chalgren 한천 배지 3종류를 사용하여 균의 최소발육 억제 농도 (MIC : Minimal Inhibitory Concentration)의 결과를 비교, 관찰하였으며 5종의 quinolone 제제 (ciprofloxacin, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin)에 대한 *Bacte-*

roides fragilis group 60주의 시험관내 감수성 검사를 한천 평판 회석법으로 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 한천 평판 회석법에서 관찰된 MIC를 기준으로 E-test MIC의 결과를 비교하면 실험균주 90.3%가 한천 평판 회석법의 MIC (within±1 dilution)와 일치하여 E-test가 *B. fragilis*의 항균제 감수성 검사법에 한 종류로 유용한 것으로 생각되며 사용된 배지에 따른 감수성상의 양상은 큰 차이를 관찰할 수 없었으며 *B. fragilis*의 항균제 감수성 검사용 기본 배지로 brain heart infusion배지와 Wilkins Chalgren배지는 적합하나 Mueller-Hinton배지는 부적합 한것으로 나타났다.

Bacteroides fragilis group 60주에 대한 5종의 quinolone제제에 대한 감수성상은 ofloxacin을 제외한 약제에 대해 대부분 내성을 띄었으며 균종간의 감수성상의 두드러진 차이는 관찰되지 않았다.

참고문헌

1. Balows A, William JH, Kenneth LH, Henry DI : Manual of clinical microbiology. 5th ed, ASM, Washington, D.C., 1991, pp 1105-1172.
2. 정윤섭, 이삼열 : 혐기성 세균 검사법. 연세대학교 출판부, 서울, 1983, pp 59-62.
3. National Committe for Clinical Laboratory Standards : Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 2th ed, NCCLS, Villanova, Pa., 1988.

4. Brook I : Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. *J Clin Microbiol* 26 : 1181-1188, 1988.
5. Cornick N, Cuchural Jr. GJ, Snyderman DR : The antimicrobial susceptibility patterns of the *Bacteroides fragilis* group in the United States. *J Antimicrob Chemother* 25 : 1011-1019, 1987.
6. Cuchural GJ, Tally FP, Jacobus NV, Aldridge K : Susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group in the United States : analysis by site of isolation. *Antimicrob Agents Chemother* 32 : 717-722, 1988.
7. Cirron DM, Ostovar MI, Karlsson A, Goldstein EJC : Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 9 : 2197-2203, 1991.
8. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberrry C : Comparison of the E-test to agar dilution, Broth and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 29 : 533-538, 1991.
9. Snyderman DR, Cuchural Jr. GJ, McDermott L : Correlation of various in vitro testing methods with clinical outcomes in patients with *B. fragilis* group infections treated with cefoxitin : a retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 36 : 540-544, 1992.
10. Difco : Difco manual. 10th ed, Difco Laboratories, Detroit, 1984, pp 582-584.
11. Fingold SM, Jacobus NV, Tally FB : Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 26 : 1253-1256, 1988.
12. Wexler HM, Fingold SM : In vitro efficacy of sulbactam combined with ampicillin against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 27 : 876-878, 1985.
13. 김희선, 정재규, 김성광 : *B. fragilis*군에 대한 β -lactam 항생제의 감수성상 및 β -lactamase inhibitor의 작용에 관하여. 대한 화학 요법 학회지, 6 : 104-109, 1988.
14. King A, Shannon K, Phillips I : The in vitro activity of enoxacin and ofloxacin compared with that of ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 15 : 551-558, 1985.

-Abstract-

Comparison of the E-Test with Agar
Dilution Susceptibility Test by
Using *Bacteroides fragilis*

Hee Sun Kim, Sung Kwang Kim

Department of Microbiology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea

Hwa Sun Cha

Department of Family Medicine
Jeon Sun Hospital
Taejeon, Korea

The susceptibilities of 45 clinical isolates of *bacteroides fragilis* to cefaclor, ciproflxacin and imipenem were determined by new method, E-test (AB Bidisk, Solna, Sweden) and were compared with those from conventional agar dilution method by using brain heart infusion, Mueller-Hinton and Wilkins Chalgren agar plates.

And the susceptibility of 60 clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group (*B. fragilis* 45 strains, *B. distasonis* 6 strains, *B. ovatus* 5 strains, *B. thetaiotaomicron* 4 strains) to 5 quinolones (ciprofloxacin, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin) were determined by *in vitro* agar dilution method.

Compared with agar dilution MICs for *B. fragilis* 45 strains, 90.3% of E-test MICs were within ± 1 dilution of the agar dilutions, and 98.4% were within 2 dilutions. And there were little effect of different medium bases to determine MICs except Mueller-Hinton agar. On Mueller-Hinton agar, *B. fragilis* showed have or no growth activity.

In vitro susceptibility of *B. fragilis* group to quinolones, most of the test strains showed resistant patterns to quinolones except ofloxacin and there was little difference of susceptibility patterns between species of *B. fragilis* group.

Key Words : E-test, Agar dilution, Susceptibility test