咯痰의 細菌學的 檢査

國立醫療院 細菌科

朴 承 咸

—Abstract—

Microbiological Examination for Sputum

Seung Hahm Park, M. D.

Department of of Bacteriology, National Medical Center, Seoul, Korea

There are many pulmonary infectious diseases caused by such as bacterial, mycotic, & viral origin. Author intended to describe the outline of modern microbiological examination and its clinical evaluation, particularly, general bacteria, mycobacteria and fungus for sputum so far.

It is true that the value of direct smear is very limited.

For instance, positive acid fast bacilli or spirochaetes & fusiformis symbiosis on smear has their own diagnostic values respectively.

However, the identification of microorganisms could not be expected without the culture of the microorganisms.

New methods for drug susceptibility test for general bacteria and mycobacteria is introduced in detail.

서 언

呼吸系疾患 例컨데 急性 呼吸系 感染症, 慢性 氣管枝炎, 肺氣腫, 喘息, 氣管枝擴張症, 肺膿瘍, 肺炎, 肺結核 等에 있어서 咯痰 檢査를 實施하여 그 原因 病原體를 究明케 된다. 病原體로 보면 細菌, 眞菌, 바이러스, 寄生虫等이 있으며 여기서는 細菌과 眞菌을 中心으로 記述코저 한다.

于先 그 病原體가 무엇이든 간에 微生物學的 檢査를 함에 있어서 咯痰을 採取하는데 몇가지 注意가 先行되어야 한다. 滅菌水로 數回 양치질을 시킨後 咯痰을 咯出토록 하거나 또는 綿棒을 使用하여 咽喉에서 採取하거나 氣管枝鏡을 使用하여 深部에서 採取하는 수도 있다.

檢體를 採取하기前에 抗菌劑를 投與하여서는 안된다. 是 常識이 우리나라에서는 아직 잘 지켜지지 않고 있는 것 같다. 이미 抗菌劑를 投與한 患者이면 一旦 投藥을 中止시키고 적어도 최소한 48時間 以後에 檢體를 採取하는 것이 바람직한 일이다.

塗抹 檢査

採取된 檢體를 slide glass에 얇게 均一하게 바른後 室溫에서 乾燥케 한다. 그 後 Gram 染色, 抗酸菌染色을 하며 또 必要에 따라서는 slide 上에 生理食鹽水 1滴을 떨어 뜨리고 거기에 檢體의 小片과 잘 混合한 後 空泡가 들어가지 않도록 조심스럽게 cover glass를 얹은 後 視野를 어둡게 하여 檢鏡하기도 한다.

아직도 우리나라에서는 塗抹檢査가 微生物檢査의 全體인듯 생각하는 분들이적지 않아 뜻하지 않은 混線을 이르는 수도 있다. 이 塗抹檢査는 境遇에 따라서 必要하며 그것이 차지하는 價値는 限定되어 있다. 例컨데 抗酸菌染色에서 抗酸菌을 證明하게 되거나 또 Gram 染色에서 紡錘形菌과 螺線菌의 共生을 보게되면 塗抹檢査로서의 意義가 있는 것이다. 그러나 咯痰을 Gram 染色하여 檢鏡할때 거기에 보이는 Gram 陽性雙球菌이 肺炎球菌인지 腸球菌인지 누구나 鑑別할 수 없고 Gram 陰性雙球菌이 보일때 그것이 病原性 髓膜炎球菌인지 또는 非病原性 Neisseria 인지 누구도 斷言할 도리가 없다.

螢光顯微鏡을 使用함으로써 抗酸菌을 容易하게 識別할 수 있다. Auramin-Rhodamine 과 Potassium permanganate 染色法을 使用하면 暗視野속에 抗酸菌은 黃橙色의 桿菌으로 보이며 油浸렌즈를 使用하지 않아도 되므로 抗酸菌檢鏡에 時間이 節約되며 또 抗菌劑(특히 Isoniazid)를 服用中인 患者는 Ziehl-Neelsen 染色法에서 陰性인 것도 이 染色法으로 陽性으로 보이는 수도 있다.

培養 檢査

우리나라에서 咯痰檢査를 함에 있어서 恒常注意하여야 할 것은 우리나라에는 結核患者가 많다는 事實이다. 卽 그 檢鏡가 結核菌檢査 依頼가 온것이 아니라 할지라도 그 檢鏡中에 結核菌이 存在할 可能性이 많으므로 咯痰檢體를 다루는데 있어서는 看護員, 技士, 醫師할것 없이 모두 조심스럽게 取扱하여야 한다.

잘 施設된 病院에서는 biological safety cabinet 를 裝置하여 術者의 保護에 力點을 두고 있다.

普通培養方法으로 잘 培養이 되지 않는 螺旋菌, 紡錘形菌을 除外하고 一般細菌, 抗酸菌, 眞菌 등은 培養檢査에 의해서 同定이 可能한 것이다.

檢査室에 자리를 둔 醫師가 겪는 苦衷은 臨床醫들이 依頼한 檢査成績이 그들이 期待한 것과 다름때 檢査室에 대하여 不信하는 것이다. 그러나 大部分의 境遇에 있어서 그 原因은 不適當하게 採取된 檢體에 起因되는 수가 많다는 것을 力說하고 싶다. 그러므로 必要에 따라서는 同一한 檢査를 2~3次 反覆할 必要가 생긴다. 한번의 試驗成績이 陰性이라고 하는것은 다시 말해서 아직도 陽性이 될 可能性이 內包되어 있다는 것이다.

1. 一般細菌

咯痰에서 一般細菌을 分離하는데 있어서는 血液寒天培地가 가장 愛用되며 特別한 境遇를 除外하고는 37°C 恒溫器에 24時間 乃至 48時間 培養한 後 判讀하게 된다. 判讀의 能力은 그 判讀하는 사람의 經驗과 知識에 의하여 左右되며 많은 經驗을 가진 사람은 菌을 同定하는 時間과 培地 및 其他 材料를 節約하는 利點이 있다.

咯痰에는 所謂 常在菌(Normal flora)으로 呼稱되는 非病原性菌이 常在하고 있다.

綠色連鎖球菌, neisseria, coagulase 陰性 葡萄球菌 때로는 黃色葡萄球菌, Haemophilus haemolyticus, H. influenzae, 肺炎球菌, 非溶血性 連鎖球菌(腸球菌), diphtheroid, coliform 桿菌, Candida albicans 를 포함한 酵母樣眞菌, A 群以外的 溶連菌 등 모두 常在菌에 넣을 수 있는 菌들이다.

한편 病原性菌으로는 A 群 때로는 B, C, G 群의 溶連菌, 티푸테리아菌,百日咳菌, 髓膜炎球菌 등을 들수 있으며 黃色葡萄球菌, coliform 桿菌, 肺炎球菌, '인플루엔자' 菌, Candida albicans 등이 純粹培養되거나 또는 이런 菌들이 顯著히 많이 자라나면 原因病原體로 생각하게 된다.

急性 呼吸系 感染症에서 빈번히 隨伴되는 細菌으로서 는 肺炎球菌, Klebsiella, '인플루엔자' 菌, 黃色葡萄球菌, 連鎖球菌 등을 들수 있다. 그래서 咯痰의 培養檢査成績 報告樣式을 例示하면 다음과 같다.

ㄱ) Normal throat flora

ㄴ) Heavy growth of Group A (bacitracin positive) beta hemolytic streptococci

ㄷ) Normal throat flora, with Haemophilus influenzae predominating

ㄹ) Pure culture of Staphylococcus aureus (coagulase-positive, DNase-positive)

2. 抗酸菌

結核菌을 비롯하여 非定型 抗酸菌을 培養하는데 있어서 咯痰을 處理하는 方法과 培地 등이 여러가지 있으나 苛性소—다法은 널리 알려져 있고 N-Acetyl-L-cysteine-Sodium hydroxide 方法은 成書에 미루기로 하고 여기서는 Pancreatin-Desogen 方法을 紹介하려고 한다.

ㄱ) 基本溶液 I .....NaOH 8gm 을 蒸溜水 1L 에 溶解한다.

基本溶液 II .....Boric acid(H_3BO_3) 24.72 gm 과 KCl 25.86gm 에 우선 少量의 蒸溜水를 넣고 끓인後 後에 거기에 증류수를 더 追加하여 全量이 2L 가 되도록 한다.

ㄴ) 基本溶液 I 428ml 와 基本溶液 II 1L, 蒸溜水 2, 572ml, 10% NaOH 5ml 를 混合하여 pH 9.0가 되게 한다.

ㄷ) 上記 混合液을 110°C 30分間 高壓蒸氣滅菌 한다.

ㄹ) 여기에 5N-HCl 20ml 를 添加하여 pH가 8.0이 되게 한다.

ㅁ) 上記 溶液을 各各 2L 식 兩分한다.

ㅂ) 兩分한 上記溶液中 한쪽 2L 에 Pancreatin 粉末 40gm 을 넣어서 溶解시킨 後 溫度가 식기前에 濾過紙로 濾過시킨 後 Berkefeld 나 Seitz 濾過器로 濾過시킨다. 이것은 2% Pancreatin 溶液이 된다.

ㅅ) 나머지 溶液 2L 에는 70% Desogen 溶液 60ml 를 添加하여 3% Desogen 溶液을 만든다.

ㅇ) 2% Pancreatin 液과 3% Desogen 溶液 各各 同量을 混合하여 이것을 抗酸菌 培養을 위한 咯痰處理

液으로 使用하게 된다.

即, 遠心分離用 試驗管에 喀痰과 上記 Pancreatin-Desogen 溶液을 各各 同量씩 넣은後 고무栓을 하고 그 試驗管 上下를 손에 잡고 數回 흔들어 그 內容을 振盪시킨後 4°C 에 1夜 保存한다.

翌朝에 그 試驗管 內容의 上澄部를 버리고 沈渣를 綿棒에 무친後 그것을 Loewenstein-Jensen (L-J) 培地の 斜面에 바르고 37°C 에서 培養한다.

이 方法의 長點은 그 操作이 매우 簡便하여 biological safety cabinet 가 없는 試驗室에서도 術者에 對한 結核菌의 感染危險이 거의 없으며 또 檢體를 培地에 심은後 數日間 培地汚染의 有無를 조사하여 萬若汚染된 培地가 있으면 그때까지 냉장고에 保存되어 있는 Desogen-Pancreatin 溶液으로 處理된 檢體에서 그 沈渣를 다시 綿棒으로 새 L-J 培地에 심을 수 있다는 것이다.

即, 本方法에 의하면 培地에 汚染率도 적거니와 또 一旦 汚染되여도 患者로부터 檢體를 再次 採取할 必要가 없으며 또한 培地를 汚染시킨 檢體가 그만큼 Desogen-Pancreatin 溶液에 作用을 더 받아 再次 L-J 培地에 심었을 경우에는 汚染源이 거의 없다는 것이다.

이 Desogen 은 瑞西의 Geigy 會社에서 生産되는데 同一한 이름으로 液體와 固體가 市販되나 이兩者는 全히 다른 藥品인 것이다.

即, 液體는 Methylphenyl-dodecyl-trimethyl-ammonium-methosulfate 이며 固體는 (Dodecanoyl-N'-methyl-aminoethyl)-(Phenyl-carbamyl-methyl)-dimethyl-ammonium-chloride 이다.

結核菌 培養目的에는 液體 Desogen 만이 使用된다. 喀痰 또는 結核菌을 loop 로 다루는데 있어서 '알콜' 과 모래가 混合되어 있는 alcohol-sand flask 에 一旦 汚染된 loop 를 그 모래속에 찔렀다가 꺼내면 不必要한 檢體 또는 菌을 除去하게 되고 火焰滅菌을 할때에 術者에게 感染의 危險을 덜게 하여 주는 長點이 있다.

L-J 培地에 자라는 菌集落을 第1表에서 보는바와 같이 1週以內에 자라는 Rapid grower 와 1週以上에서 자라는 Slow-grower 로 區分하고 이 Slow-grower 를 그 菌集落의 色調와 光線에 대한 感受性에 의하여 細分한後 第2表와 같은 여러가지 化學的檢査를 하여 어느 抗酸菌인가 하는것을 同定하게 된다.

우리나라에는 아직도 人體에서 分離된 牛型結核菌의 症例報告가 없는바 臨床醫나 臨床微生物을 專攻하는 분 들이나 다 같이 관심을 가지고 努力하여야 할 것으로 사료된다.

3. 眞 菌

眞菌中에서 喀痰이 檢體가 될수 있는 것은 大體로 深部 眞菌症이며 Mycetoma(Maduremycosis)를 除外한 모든 深部 眞菌症에서 證明될수도 있다. 即 Actinomycosis, Aspergillosis, North american blastomycosis, South american blastomycosis, Candidiasis, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Geotrichosis, Histoplasmosis, Nocardiosis, Phycomycosis, Sporotrichosis, Torulopsosis 등 患者의 喀痰에서 眞菌을 證明할수도 있다.

우리나라에서는 actinomycosis, aspergillosis, candidiasis, cryptococcosis, geotrichosis, sportichosis 등의 各種 臨床症例가 있으니 좀더 관심을 가지고 喀痰檢査를 하면 深部眞菌症을 야기시키는 眞菌으로 인한 肺疾患症例를 發見할 수 있으리라고 생각된다.

眞菌培養에 있어서는 Sabouraud's 培地가 第一 普遍的으로 많이 使用되며 檢體를 直接 이 培地에 심어 37°C 및 20°C 에 1乃至 2週間, 경우에 따라서는 約 8週日까지 保存 眞菌集落의 形成을 기다리며 관찰을 계속하게 된다. 上記 37°C 와 20°C 의 各各 溫度에서의 集落形成 與否는 境遇에 따라서는 病原性 또는 非病原性的 鑑別에 도움이 되기도 한다.

Actinomycetes 는 嫌氣性 病原體이므로 嫌氣性 培養을 하여야 하며 또 塗抹檢査에서 Actinomycetes 와

Table 1. Work-Flow Chart for Identification of Mycobacterium Cultures

Cultures having growth within	Rapid Growers ≤7 days	Slow Growers ≥7 days		
		Chromogenic	Non-chromogenic	
			Exposure to light 1 hour Reincubate	
1st week	Inoculate liquid medium.		Photochromogenic	Non-chromogenic
2nd week or later	Inoculate 7-day-liquid culture to Arylsulfatase, MacConkey, 5% NaCl	Tween 80, Catalase, 5% NaCl, Nitrate	Tween 80, Catalase, 5% NaCl, Nitrate	Tween 80, Catalase, pH 7/68, 5% NaCl, Tellurite, Niacin, Nitrate

Table 2. Growth Characteristics and Identification of Mycobacteria*

Species	Growth in less than 7 days	Pigment formation		Niacin	Nitrate Reduction		Catalase Activity		Tween hydrolysis (days)		Tellurite Reduction in 3 days	Growth on 5% NaCl	Arylsulfatase		Growth on MacConkey agar
		Dark	Light 1 hour		1+	3+	<40 mm	>50 mm	pH7 68°	5	10		3 da.	2 week	
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. Kansaii</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. marinum</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tap Water	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. flavescens</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	-
<i>M. avium</i> **	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	±	-	-	-	-
<i>M. intracellulare</i> **	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	±	-	-	-	-
<i>M. xenopi</i>	-	±	±	-	-	-	+	-	+	-	-	-	±	2/5+	-
<i>M. gastri</i> ("J")	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. terrae</i> complex	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. triviale</i> ("V")	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	±	3/5+	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	-	-	±	±	+	+	+	-	+	+	±	3/5+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3+	-
<i>M. phlei</i> **	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. vaccae</i> **	+	+	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	3+	-
<i>M. borstelense</i>	+	-	-	V	-	-	+	+	+	-	-	-	±	3+	±

*Variations are to be expected.

**With tests listed, the pairs of organisms so indicated cannot be separated; colonial morphology on 7H-10 may be helpful in the case of *M. phlei*-*M. vaccae*.

Key to symbols:

- : usually negative

± : positive, rarely negative

± : negative, rarely positive

/ : low to high variations

V : variable; niacin+species is *M. borstelense* var. *niacinogenes*

Nocardia는 그 形態는 類似하나 Nocardia 中에는 抗酸性인 것이 있는 反面 Actinomycetes는 非抗酸性菌인 것이다.

Candida와 Crptococcus는 後者가 菌周邊에 두터운 莢膜이 있고 urea 反應이 陽性인 點이 前者와 달라 鑑別이 된다.

coccidiomycosis를 이르는 Coccidioides immitis는 아주 危險한 真菌임으로 檢査室에서 잘못 吸引하여 感染의 事故를 내지 않도록 格別히 注意하여야 할 것이다.

Candida albicans는 corn meal 培地에서 Chlamydospore(厚膜孢子)를 生産하는 點이 다른 Candida species와 다르므로 鑑別診斷에 도움이 된다.

이러한 真菌症은 最近에 와서 抗菌劑, Steroid, 避妊劑 등의 長期服用으로 二次의 發生이 수가 많으므로 年少者, 老人, 또는 衰弱한 患者에서 抗菌劑等 長期 服用者에 對해서는 그 治療成績이 如意치 못한 境遇에는 한 번은 真菌症을 疑心하여 보는 것이 의의가 있다고 본다

感受性 檢査

아직 真菌에 對한 感受性檢査는 臨床의 利用되지 못하고 있으며 一般細菌 및 結核菌에 對한 感受性檢査에 對하여 記述코자 한다.

1. 一般細菌感受性檢査

一般細菌에 對한 感受性檢査는 Disk 法, 試驗管稀釋法, 平板稀釋法 등 여러가지가 있다. 稀釋法이 Disk 法에 比하여 그 正確성이 크다고는 하나 簡便性에 있어서 Disk 法에 따르지 못하고 또 그間 많은 研究結果 檢査操作만 제대로 하면 Disk 法으로도 充分히 臨床結果가 잘 一致되는 方法들이 考案 되어졌다. 即 最低發育阻止濃度(Minimum Inhibition Concentration)原理에 의한 感受性の 判定이 可能하여 졌다. 培地로서는 Mueller Hinton 培地가 愛用된다.

感受性檢査를 함에 있어서 菌數가 지나치게 많거나 또는 적거나 하는데 라마 檢査成績에 顯著한 差異가 생기게 된다. 各菌에 따르는 菌數의 實際의 均一化方法은 다음과 같으며 使用菌株는 可及의 檢體에서 처음 分離培養된 18時間 菌을 使用함이 理想的이다.

ㄱ) 連鎖球菌 또는 H. influenzae와 같이 그 크기가 微細하고 培養條件이 까다로운 菌은 그 菌叢 10~20個를 生理的食鹽水(以下 食鹽水로 略) 또는 peptone free broth(以下 pfb로 略) 5ml에 浮遊시킨다.

ㄴ) 腸球菌, 葡萄球菌 등은 그 菌叢 10個를 食鹽水 또는 pfb 1ml에 浮遊시킨 다음 이 한방울을 다시 食鹽水 또는 pfb 5ml에 稀釋 浮遊시킨다.

ㄷ) 大腸菌 등과 같이 가장 容易하게 發育되는 菌들은 그 菌叢 10個를 食鹽水 또는 pfb 1ml에 浮遊시킨 後 이 한방울을 다시 pfb 5ml에 稀釋 浮遊시켜 그 한방울을 재차 食鹽水 또는 pfb 5ml에 稀釋 浮遊시킨다.

以上과 같이 菌을 稀釋 浮遊시킨 것을 感受性檢査用 培地 두장에 各各 約 2.5ml씩 分注하여 均等하게 平板 全面에 퍼지게 한 後 그 남은 菌液을 pasteur pipette 등으로 完全히 除去한 後 37°C 恒溫器內에서 30分間 植菌한 培地表面을 乾燥시킨다.

ㄹ) 冷藏庫에 保管되어 있는 disk를 平板의 外緣으로부터 적어도 20mm 떨어지게 하고 또 各 disk의 間隔이 一定하게 disk를 얹어 놓는다. 이 때 普通使用되는 直徑 9cm의 平板에 disk를 4枚以上 얹어 놓으면 支障이 생기는 수가 있다. 그리고 室溫이 20~24°C 일 때는 室溫에서 30分間, 또 室溫이 24°C 以上일 때는 冷藏庫에서 3~4時間 放置하여 抗菌劑가 充分히 擴散됨을 기다려 37°C 恒溫器에 넣어 18時間 培養한 後 翌朝 判讀한다. 그 方法은 細菌의 發育 阻止帶를 sliding calliper나 '콤파스'로 計測하여 阻止帶의 解釋을 第3表에 依하여 便宜上 graph用紙에 그 크기를 表示한 chart를 對照하여 判讀한다.

上記 抗菌劑의 豫備擴散(pre-diffusion)은 重要的 與件의 하나이며 이 過程을 無視하면 二重 菌發育阻止帶 또는 實地보다는 顯著히 적은 阻止帶를 보게 되어 誤判의 原因이 된다.

第3表는 細菌發育阻止帶와 MIC의 關係를 보여 주고 있으며 이表에서 sensitive란 抗菌劑를 通常使用法으로 深部感染에 效果를 볼 수 있는 것을 말한다. fairly sensitive란 通常 使用法으로는 深部感染에 效果를 期待하기 어려우나 多量療法으로 效果를 얻을 수 있는 것을 말한다. slightly sensitive란 예컨대 尿路系感染과 같이 抗菌劑가 局所의 集中되어 作用하는 部位에서만 效果를 期待할 수 있는 것이며 resistant는 전혀 效果를 期待할 수 없는 것이다.

一般的으로 抗菌劑에 對한 感受性 檢査는 어느 方法이든 간에 그 原法에 충실하면 좋은 成績을 얻을 수 있는 것이다. 溶連菌, 肺炎球菌, 등은 penicillin에 感受性이 크므로 感受性檢査를 매번할 必要가 없으며, 綠膿菌은 polymyxin B, colistin, gentamicin, carbenicillin 등을 제외하고는 大部分의 抗菌劑에 耐성이므로 보통 感受性 檢査는 施行치 않는다. 또 '인플루엔자'菌은 sulfa劑와 chloramphenicol의 併合治療 또는 ampicillin이 卓効를 보이므로 感受性檢査를 施行치 않는다. 腸球

Table 3. The Conversion of Zone-Sizes into MIC

	Con/Disc	Sensitive MIC	Fairly sensitive MIC	Slightly sensitive MIC	Resistant
Penicillin-G	500r	$\geq 19\text{mm}$ 150	$\geq 15\text{mm}$ 300	$\geq 10\text{mm}$ 400	$< 10\text{mm}$
Penicillin-G	10r	$\geq 25.5\text{mm}$ 0.25	$\geq 7.5\text{mm}$ 16	$< 7.5\text{mm}$	
Penicillin-G	1r	$\geq 16\text{mm}$ 0.25	$< 16\text{mm}$		
Ampicillin	10r	$\geq 31\text{mm}$ 0.25	$\geq 14\text{mm}$ 16	$\geq 6\text{mm}$ 128	$< 6\text{mm}$
Penicillin-V	10r	$\geq 22.5\text{mm}$ 0.25	$\geq 15.5\text{mm}$ 4.0	$\geq 6.5\text{mm}$ 128	$< 6.5\text{mm}$
Methicillin	10r**	$\geq 10\text{mm}$ 2			$< 10\text{mm}$
Cefalexin	30r	$\geq 25\text{mm}$ 2	$\geq 15\text{mm}$ 16	$\geq 6\text{mm}$ 128	$< 6\text{mm}$
Carbenicillin	100r***	$\geq 22\text{mm}$ 16		$\geq 15\text{mm}$ 128	$< 15\text{mm}$
Cefalosporin	30r	$\geq 24\text{mm}$ 2	$\geq 15\text{mm}$ 16	$\geq 9\text{mm}$ 128	$< 9\text{mm}$
Gentamycin	30r	$\geq 24\text{mm}$ 0.5	$\geq 18\text{mm}$ 4	$\geq 10\text{mm}$ 64	$< 10\text{mm}$
Kanamycin	30r	$\geq 17\text{mm}$ 4		$\geq 8\text{mm}$ 128	$< 8\text{mm}$
Streptomycin	30r	$\geq 17\text{mm}$ 4		$\geq 8\text{mm}$ 128	$< 8\text{mm}$
Neomycin	30r	$\geq 16\text{mm}$ 4		$\geq 12\text{mm}$ 128	$< 12\text{mm}$
Oxytetracycline	30r	$\geq 21\text{mm}$ 1	$\geq 18\text{mm}$ 4	$\geq 11\text{mm}$ 64	$< 11\text{mm}$
Chloramphenicol	30r	$\geq 28.5\text{mm}$ 1	≥ 21.5 8		$< 21.5\text{mm}$
Tetracycline	30r	$\geq 16.5\text{mm}$ 1	$\geq 13\text{mm}$ 4	$\geq 7\text{mm}$ 64	$< 7\text{mm}$
Lincomycin	15r	$\geq 17.5\text{mm}$ 1	$\geq 14.5\text{mm}$ 4	$\geq 7\text{mm}$ 64	$< 7\text{mm}$
Doxycycline	30r	$\geq 18\text{mm}$ 1	$\geq 15\text{mm}$ 4	$\geq 8\text{mm}$ 64	$< 8\text{mm}$
Erythromycin	15r	$\geq 23\text{mm}$ 1	$\geq 19\text{mm}$ 4	$\geq 12\text{mm}$ 64	$< 12\text{mm}$
Nitrofurantoin	30r	$\geq 12\text{mm}$ 64			$< 12\text{mm}$
Sulfonamide	2.5mg	$\geq 33\text{mm}$ 20	$\geq 30\text{mm}$ 80	$\geq 27\text{mm}$ 1280	$< 27\text{mm}$
Sulfonamide	0.25mg	$\geq 25\text{mm}$ 20	$\geq 23\text{mm}$ 80	$\geq 19\text{mm}$ 1280	$< 19\text{mm}$
Bacitracin	10 IU	$\geq 28\text{mm}$ 0.05	$\geq 24\text{mm}$ 0.14	$\geq 16\text{mm}$ 3.0	$< 16\text{mm}$
Nalidixin	30r	$\geq 20\text{mm}$ 6.0			$< 20\text{mm}$
Fucidin	50r	$\geq 25\text{mm}^*$			$< 25\text{mm}$
Colistin	30r	$\geq 18\text{mm}^*$			$< 18\text{mm}$

*The limit has been statistically measured

**After incubation at 30°C for 18 hrs

***The limits are based on gram negative bacteria

菌은連鎖球菌이기는 하나 大部分의 抗菌劑에 耐性을 가졌으므로 感受性檢査를 꼭施行하여야 한다.

淋菌에 關하여서는 penicillin 耐性問題가 論議되고는 있으나 적어도 우리나라의 경우 아직 別로 penicillin 耐性菌株가 없는듯 보인다. 髓膜球菌에 關하여서는一部 sulfa 劑耐性이 報告되고 있으나 sulfa 및 penicillin 들이 卓効를 보이므로 感受性 檢査가 別로 必要치 않다.

우리나라에서 臨床檢體로부터 分離頻도가 가장 높은 葡萄球菌과 大腸菌의 各種 抗菌劑에 對한 感受性(1969 年度)을 보면 葡萄球菌에 對하여 cloxacillin 99%, methicillin 97%, leucomycin 88%, erythromycin 67%, chloramphenicol 54%, streptomycin 49%, sulfa 21%, tetracycline 15%, penicillin 13%이다.

大腸菌에 對한 感受性은 colistin 90%, kanamycin

61%, ampicillin 56%, streptomycin 30%, chloramphenicol 30%, nitrofurantoin 13%, sulfa 9%, tetracycline 6%이다.

2. 結核菌感受性檢査

結核菌 感受性檢査를 施行하는데는 여러가지 難點이 있으며 그 몇가지 理由를 들어 보면

ㄱ) 여러가지 滅菌法과 貯藏方法에 따르는 抗菌劑의 安定性 問題.

ㄴ) 여러가지 抗菌劑를 가지고 각각 다른 培地를 使用하였을 때 오는 抗結核作用의 變動

ㄷ) 感受性을 決定하는데 최소한 세가지 각각 다른 方法의 存在 等이다.

比率法에 있어서는 檢査에 使用된 抗菌劑의 濃度에 耐性인 菌叢數의 比率을 決定하여야 한다. 臨床目的으

로는 特定抗菌劑가든 培地에 成長한 菌叢數가 抗菌劑가 들지 않은 對照群보다 1% 또는 그 以上인 境遇 그 特定 抗菌劑는 治療目的으로는 價値를 認定할 수 없게 된다.

感受性 檢査는 直接法 또는 間接法으로 施行케 된다.

直接法은 塗抹檢査에서 抗酸菌 陽性인 檢體에 對하여 施行한다. 檢査에 使用되는 接種 菌數는 塗抹檢査에서 보이는 抗酸菌數에 따라 稀釋하여 培地에 심게 된다.

間接法은 檢體에서 처음 分離된 菌을 繼代培養하여 使用케 된다. 直接法이 더 所望스럽기는 하나 塗抹檢査가 陰性이고 培養 陽性인 境遇, 直接法에 있어서 對照群의 菌의 成長이 믿을만한 報告로서는 不適當한 境遇, 또 培養된 菌株를 다른 研究所에 送付하여 感受性 檢査를 委託하는 境遇等에는 間接法을 擇하게 된다.

7H-10培地를 使用하였을 때 一次藥劑의 濃度는 다음과 같다.

Isoniazid(INH) .....0.2 mcg/ml
Streptomycin(SM).....2.0 mcg/ml
Para-aminosalicylic acid (PAS) .....2.0 mcg/ml
Control .....no drug

結核菌이 上記藥劑濃度에 1% 또는 그 以上 耐性인 境遇에는 더 높은 濃度 또는 二次藥劑에 對한 檢査를 施行케 된다.

Table 4. Concentration of Drug in Susceptibility Test Medium (7H-10)

Drug	mcg/ml
Isoniazid	0.2, 1, & 5
Streptomycin	2 & 10
PAS	2 & 10
Kanamycin	5
Ethionamide	5
Viomycin	5
Ethambutol	5
Cycloserine	50
Pyrazinamide(pH 5.5)	50
Rifampin	1

耐性比率는 對照群의 菌叢數와 藥劑가든 培地上的 菌

叢數로서 決定하게 된다. 菌叢數가 너무 많아서 計算치 못할 경우에는 普通 다시 100倍로 稀釋하여 두 系列로 檢査케 된다.

塗抹陽性인 檢體의 稀釋은 다음과 같이 한다.

Microscopy	Inoculate
Less than 1 AFB/field	Undiluted and 10^{-2} (1:100)
1-10 AFB/field	10^{-1} and 10^{-3} (1:10 & 1:1,000)
More than 10 AFB/field	10^{-2} and 10^{-4} (1:100 & 1:10,000)

對照群 또 抗菌劑가 든 培地上的 菌叢數를 다음과 같은 記號로 表示한다.

Confluent (500 or more colonies) +++++ (4+)
Almost confluent (200~500 colonies) +++ (3+)
100~200 colonies ++ (2+)
50~100 colonies + (1+)
Less than 50 Actual count

感受性檢査 報告에는 檢査種類 直接 또는 間接法, 對照群培地의 菌叢數, 藥劑가 든 培地內의 藥劑濃度, 藥劑에 耐性인 菌의 百分率 등이 包含되어야 한다.

耐性菌 比率를 計算하는 公式은

$\frac{\text{Number of colonies on the drug}}{\text{Number of colonies on the control}} \times 100 = \% \text{ resistance}$

이며 이것을 例示하면 다음과 같다.

	Growth		% Resistant
	undilute	10^{-2}	
Control	4+	150	
INH 0.2 mcg/ml	1+	9	6%
SM 2.0 mcg/ml	0	0	0%
PAS 2.0 mcg/ml	0	0	0%

$$\frac{9 \text{ colonies}}{150 \text{ colonies}} \times 100 = 6\%$$

이 檢査에서이 菌의 6%가 INH 0.2mcg/ml 에 耐性인 것이다.

Loewenstein-Jensen 培地를 感受性檢査에 使用할 때 各 藥劑의 濃度와 耐性の 標準 比率은 第5表와 같다.

Table 5. Drug Concentration and Critical Proportion for Resistance in Susceptibility Test Medium (Loewenstein-Jensen)

Drug	mcg/ml	Resistance(%)
Isoniazid	0.2	1
Streptomycin	4	10
PAS	0.5	1
Kanamycin	20	10
Ethionamide	20	10
Viomycin	30	10
Ethambutol	2	10
Cycloserine	30	10
Pyrazinamide	100	10
Rifampicin	40	1
Thioacetazone	2	10
Capreomycin	20	10

如何間 結核菌 感受性檢査에 있어서도 어느 方法을

使用하든 間에 原法에 充實히 하여야 한다는 것을 다시
금 強調코져 한다.

References:

1. Canetti, G. et al: *Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the Use of Sensitivity Tests in Tuberculosis Control Programmes*, Bull. Wld Hlth Org. 41:21, 1969
2. 朴承威外: 細菌學的 檢査—특히 檢體取扱과 耐性檢査를 中心으로, 대한의학협회지. 10:281, 1967
3. 朴承威: 1969년에 分離된 病原性 細菌의 抗菌劑에 대한 感受性, 대한 의학협회지, 13:347, 1970
4. 박승함: 세균검사와 혈청검사, 대한 의학협회지, 14:445, 1971
5. The Paper Disc Method in Quantitative Determination of Bacterial Sensitivity to Antibiotics, AB BIODISK, Stockholm, 1971
6. Vestal, A. L.: *Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria*, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, NCDC, Atlanta, Georgia, 1969