二次抗結核藥劑의 耐性判定基準 設定에 關한 研究

大韓結核協會 結核研究院

金成鎮 · 李圭正 · 裴吉漢

= Abstract =

Study on Calibration of Definition of Drug Resistance for Secondline Antituberculous Drugs

Sung Chin Kim, M. D., Kyu Jung Lee, and Gill Han Bai, D. V. M.

The Korean Institute of Tuberculosis, KNTA.

An attempt was made to formulate criteria for drug resistance of secondline drugs by the absolute concentration method and the cumulative method which had been set out as cumulative distributions of the results with probably sensitive and probably resistant populations.

The criteria of resistance applicable in this laboratory were obtained as follows. Any strain showing growth above 20 or more colonies in concentrations indicated below were classified as resistant to the corresponding drugs

Capreomycin 50 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin 25 $\mu\text{g/ml}$,
Prothionamide 56 $\mu\text{g/ml}$, Cycloserine 40 $\mu\text{g/ml}$,
Ethambutol 2 $\mu\text{g/ml}$, Rifampicin 32 $\mu\text{g/ml}$.

緒 論

理想的인 結核治療는 患者를 早期에 発見하여 적절한 藥劑를 投与하므로써 短期日内 患者를 治療시킴에 있다고 할 수 있다.

그러나 初治療劑나 二次藥劑의 一部에 대해 일차 또는 획득내성이 생긴 患者에게는 藥劑의 選擇이 治療의 成敗를 좌우하는 核心이 된다. 藥劑 選擇을 위한 한 方法으로 藥劑感受性檢査를 實施하며, 藥劑의 菌에 대한 感受性 与否는 耐性判定 基準에 따라 결정되므로, 어떤 藥劑의 耐性判定 基準을 設定하는 것은 중요하며 그 의의가 크다고 할 수 있겠

다.

本研究院에서는 오래전에 설정하여 현재 사용 중인 소위 二次抗結核藥劑에 대한 耐性判定 基準濃도에 대한 국제적 경향을 토대로 하여 再檢討의 必要性을 認識하고, 우리나라 患者로부터 分離된 結核菌에 대하여 各種 二次抗結核藥劑에 대한 耐性檢査成績을 토대로 하여 우리나라 실정에 맞는 藥劑耐性基準을 설정키 위해 本研究를 實施하게 된 것이다.

實驗材料 및 方法

가. 材 料

1978年 1月부터 12月까지 서울 市内 病院과本

研究院附属医院으로부터 의뢰받은 患者의 各 答에서 分離 檢出한 人型結核菌中 服藥歴 有無가 뚜렷한 菌株를 대상으로 다음과 같이 区分하여 研究에 使用하였다.

i) 治療前 환자유래 菌株(PS: probably sensitive strain)¹⁾ - 시험대상 약제를 복약한 사실이 없는 환자유래균주

ii) 내성추정균주(PR: probably resistant strain)¹⁾ - 시험대상 약제를 사용중인 환자이면서도 계속 균양성인 환자유래균주

나. 方 法

i) 사용배지: Löwenstein-Jensen계 란배지²⁾

ii) 사용약제 및 농도: Canetti等¹⁾ 및 Mitchison³⁾의 濃度 설정 방식을 참고로 하여 本研究 常用方法에 의해 다음과 같은 시험 농도를 설정 사용했다.

Capreomycin(CPM)-25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$

Kanamycin(KM)-12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$

Prothionamide(PTA)-20, 28, 40, 56, 80 $\mu\text{g/ml}$

Cycloserine(CS)-20, 28, 40 $\mu\text{g/ml}$

Rifampicin(RFP)-8, 16, 32, 64, $\mu\text{g/ml}$

10, 20, 40, $\mu\text{g/ml}$

Ethambutol(EMB)-1, 1.4, 2, 2.8, 4 $\mu\text{g/ml}$

1, 2, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$

(REP과 EMB는 二元的인 濃度를 설정 檢査하였음.)

iii) 접종 및 판정

모든 시험균은 3~5주간 37°C에서 배양 발육한 균주를 내성검사에 사용하였으며, 접종균액은 1mg/ml 되도록 McFarland No.1 比濁液에 맞추어 준비한 다음, 1백금이(27SWG, 외경 3mm)씩 각 약제 함유배지에 접종하여 37°C에서 4주간 배양후 판정하였다. 발육된 菌集落을 관찰시에는 대조배지상의 균집락수가 100개 미만이면 再檢을 行하였고 약제배지상에 20개 미만의 균집락이 형성되었을때는 음성(감수성)으로 하였다.

iv) 분석방법

CPM, KM, PTA, CS은 共通 MIC를 경계(Borderline MIC)로 하여 그 다음 농도, 즉 경계농도보다 한단계 높은 농도를 有意的 判定 基準濃度(Critical Concentration)로 하는 絶對濃度方法(Absolute Concentration Method)¹⁾을 使用하였다.

다.

한편 EMB와 RFP에 대해서는 治療前 환자유래균주(PS)와 복약력이 있는 내성추정균주(PR) 各 各의 最低發育抑制濃度の 누적분포율을 산출하여 兩群間의 농도별 누적분포율의 차이가 가장 큰(peak value) 농도를 내성판정기준으로 하는 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)의 누적분포율에 의한 분석방법³⁾을 採択, 分析에 使用했다.

結 果

1) Capreomycin(CPM)-최저발육억제농도는 100r였으며 50r에서는 추정감수성균의 2.3%만이 발육을 보였다. (표 1)

2) Kanamycin(KM)-25r에서 2.3%의 감수성균이 포함되며 설정된 농도상 MIC는 50r로 나타났다. (표 2)

3) Prothionamide(PTA)-두개의 각기 다른 대상균주에 대한시험예(A 및 B 시험)에서, A에서는 40r가, B에서는 80r가 MIC였다. 또한 B 시험에서 MIC前濃度인 40r에서 4.1%의 감수성균이, A 시험에서는 MIC前濃度인 28r에서 6.8%의 추정감수성균이 발육을 보였다. (표 3)

4) Cycloserine(CS)-A, B試驗例에서 최저발육억제농도는 각각 28r, 40r이며, 20r에서는 16.3% 및 18.0%의 추정감수성균(PS)이 발육을 보였다. (표 4)

5) Rifampicin(RFP)-절대농도법에서 최저발육억제농도는 32r PS, PR균주간 MIC의 누적분포율의 차이가 가장 큰 농도는 40r, 64r에 있었다. (표 5, 6)

6) Ethambutol(EMB)-절대농도법에서의 MIC는 2.5r, 2r에 PR, PS間 MIC의 누적분포율의 Peak value인 농도는 2.8r, 2.5r였다. (표 7, 8)

考 察

結核菌의 各種 抗結核劑에 대한 感受性檢査는 그 方法이 一般細菌과는 달리 매우 복잡하고 까다롭다. 一般細菌의 檢査法과 같이 disk法으로는 精確한 성적을 얻기 어려우므로 藥劑含有培地를 使用하여야 하며 또한 藥劑別로 여러가지 농도를 설정해야 한다.

Table 1. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to capreomycin (CPM)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	<25	25	50	100	total tested
Number (%)	442 (72.6)	153 (25.2)	14 (2.3)	0 (0)	609 (100.0)

Table 2. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to kanamycin (KM)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	< 12.5	12.5	25	50	100	total tested
Number (%)	226 (86.3)	30 (11.5)	6 (2.3)	0 (0)	0 (0)	262 (100.0)

Table 3. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to prothionamide (PTA)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	A							B			
	< 20	20	28	40	56	80	total tested	< 40	40	80	total tested
Number (%)	248 (72.9)	69 (20.3)	23 (6.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	340 (100.0)	402 (95.9)	17 (4.1)	0 (0)	419 (100.0)

Table 4. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to cycloserine (CS)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	A					B			
	<20	20	28	40	total tested	<20	20	40	total (tested)
Number (%)	201 (82.0)	44 (18.0)	0 (0)	0 (0)	245 (100.0)	164 (83.7)	32 (16.3)	0 (0)	196 (100.0)

Table 5. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to rifampicin (RFP)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	<8	8	16	32	64	total tested
Number (%)	269 (81.0)	57 (17.2)	6 (1.8)	0 (0)	0 (0)	332 (100.0)

Table 6 . Cumulative disribution of sensitivity to rifampicin(RFP)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Probable sensitive strains (PS)			Probable resistant strains (PR)			difference - between percentage (PR - PS)
		No.	%	Cum. %	No.	%	Cum. %	
A	8	260	81.0	100.0	27	13.4	100.0	0
	16	57	17	19.0	10	85.	5.0	67.6
	32	6	1.8	1.8	1	0.5	86.6	79.8
	64	0	0	0	1	0.5	81.1	81.1
	>64	0	0	0	162	80.6	80.6	80.6
	total tested	332			201			
B	10	109	87.2	100.0	76	68.4	100.0	0
	20	15	12.8	12.8	6	4.3	81.0	68.3
	40	0	0	0	4	2.9	76.8	76.8
	>40	0	0	0	102	73.9	73.9	73.9
	total tested	124			138			

Table 7. Inhibitory concentrations of pretreatment cultures to ethambutol (EMB)

Concentration (μg/ml)	A					B					
	<1.2	1.2	2.5	5	total tested	<1.4	1.4	2	2.8	4	total tested
Number	84	20	0	0	104	17	7	0	0	0	24
(%)	80.8	19.2	0	0		70.8	29.2	0	0	0	100.0

사용배지에 따라서도 배지 성분의 藥劑 吸着性 및 熱에 不安全한 藥劑의 力価低下 藥劑耐性 突然變異 結核菌의 發育으로 因한 false resistance를 피하기 위한 接種 菌量の 적정과 判定 時間等 여러 가지가 기술적으로 매우 어려우나, 特히 各種 藥劑에 대한 耐性判定基準(Definition of Drug Resistance)의 설정은 무엇보다도 중요하다. 아무리 좋은 檢査室에서 훌륭한 手技로 검사했다 해도 그 기준이 잘못 되었을때, 그 結果는 無意味하게 될것이다.

本研究院에서 현재 실시중인 藥劑耐性判定基準濃度는 Capreomycin은 20r, Kanamycin은 10r이상, Prothionamide 40r, Cycloserine 20r, Rifampicin에서는 10r, Ethambutol은 1.25r에서 발육을 보일 때 耐性으로 判定하고 있으나 現行 判定濃度を 再檢討보완하는 의미에서, 絶對濃度法에 의한 耐性基準濃度設定方法과 병행하여 特히 현재 二次抗結核 藥劑로 많이 쓰이고 있는 EMB와 RFP에서는 추정 내성균과 추정감수성균과의 최저발육억제농도의 누적분포의 差에 의한 비교 방법을 시도하였다. Canetti

의 Proprtion test는 本研究院과 같이 업무량이 過多한 실험실에서는 일상업무에 이 方法을 적용 할때 時間과 경비의 소요가 많을 것이므로 실제 응용이 불가능하여 本試驗에서 제외했으며 Mitchison의 Resistance Ratio에 의한 耐性基準設定方法역시 差장자 自信이 이미 그 부적합성을 인정한바도 있지만, 判定상 번거로움이 수반되기도 하므로 本試驗 方法에서는 채택하지 않았다.

表1 및 表2에서와 같이 CPM은 MIC가100r, KM은 MIC가 50r이므로 耐性判定基準濃度 역시 CPM 100r, KM 50r에 두어야 할 것이다. 그러나 最低發育抑制의 前濃度인 CPM 50r, KM 25r에 耐性判定基準濃度を 설정할 경우 各各 2.3%의 感受性菌만이 耐性으로 判定된다. 따라서 이 이상 濃度에 判定基準濃度を 둘 경우 耐性菌이 感受性으로 判定되는 率이 증가할 것으로 추측되므로 CPM 과 KM은 설정된 耐性判定基準濃度を 잠정 사용하면서 CPM은 50r에서 100r사이에, KM은 25r사이에서 有意的 判定濃度の 再設定을 위한 追試가 필요할 것으로 생각한다.

Table 8. Cumulative distribution of sensitivity to ethambutol (EMB)

Concentr ation (μ g/ml)		PR			PS			Difference between perent age (PR – PS)
		Cumulative			Cumulative			
		No.	%	%	No.	%	%	
A	1.0	19	7.5	100.0	29	50.0	100.0	0
	1.4	9	3.5	92.5	15	25.9	50.0	42.5
	2.0	18	7.1	89.0	14	24.1	24.1	64.5
	2.8	33	13.0	81.9	0	0	0	81.9
	4.0	50	19.7	68.9	0	0	0	68.9
	4.0	125	49.2	49.2	0	0	0	49.2
	total tested	254	100.0		58	100.0		
B	1.2	147	39.4	100.0	84	80.8	100.0	0
	2.5	107	28.7	60.7	20	19.2	19.2	41.5
	5	83	22.3	32.0	0	0	0	32.0
	5	36	9.7	9.7	0	0	0	9.7
	total tested	373	100.0		104	100.0		

약 제	현행사용농도 및 판정기준농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	사용하고자 하는 약제별 농도 및 판정기준 농도
CPM	$\boxed{20}$, 40	25, $\boxed{50}$, 60, 120
KM	5, $\boxed{10}$, 20	15, $\boxed{25}$, 30, 50, 100
PTA	20, $\boxed{40}$, 80	14, 28, $\boxed{56}$, 112
CS	10, $\boxed{20}$,	10, 20, $\boxed{40}$,
RFP	5, $\boxed{10}$, 20	16, $\boxed{32}$,
EMB	$\boxed{1.25}$, 2.5, 5	1.25, $\boxed{2}$, 2.5, 4

- $\square$ = 현판정농도, $\boxed{\square}$ = 사용하고자 하는 농도, $\square$ = 주시요농도

CS는 비교적 널리 쓰이지 않는 理由때문인지 他藥劑에 比해 耐性추이에 변동이 크게 인정되지 않고 있다. 有意의 判定濃度는 40r 정도에 설정함이 타당할듯 하다. 한편 PTA의 判定基準濃度도 表3에서 처럼 各各 40r, 80r에 두어야 할 것으로 나타났는데 만약 A 濃度法에서 MIC 前濃度인 28r에 判定基準을 둘 때는, 6.8%의 感受性菌이 耐性菌으로, B 농도법에서와 같이 40r에 둘 때는 4.1%가 耐性菌으로 判定되게 된다. 그러므로 적어도 40r 이상, 80r이내의 濃度인 56r 정도를 耐性判定基準濃度로 使用함이 좋을 듯하다. 이는 Mitchison等⁵⁾의 研究 結果와도 부합하였다.

RFP은 絶對濃度法의 最低발육억제농도는 32r에, PS·PR최저발육 억제농도의 누적분포의 差가 最高(peak value)인 濃度는 64r로 나타났으나 RFP은 일단 耐性을 획득하면 곧 바로 高度耐性으로 移行하게 되므로, 누적분포율의 差를 볼때 실제로 32r 이상에서는 peak value上 有意한 差는 없다. 特히 表5에서 처럼 16r를 有意判定濃度로 設定時에도 1.8%의 추정감수성균만이 耐性으로 判定되는 사실을 보아서도 耐性判定基準濃度는 32r를 판정농도로 함이 좋을 것이다.

表8에서와 같이 EMB는 PR·PS間 최저발육억

제농도間的 누적분포의 peak value는 2.8r, 2.5r로 나타나고 있다. 그러나 表7, 8에서 보는바와 같이 EMB는 감수성균주와 내성주간의 in vitro에서의 差가 적어 耐性判定濃度 設定이 까다로운 藥劑이다.

表7의 A 구분 농도에서 MIC는 2.5r이나 그 前濃度인 1.2r에서 19.2%의 PS菌株가 발육을 보인 점과, 本研究院과 英国王立医学研究所(British Medical Research Council)間的 정도관리 시험⁶⁾에서는 2r를 耐性判定濃度로 해야 한다는 成績을 보인 점 등을 참고로 할 때, 感受性菌이 耐性으로 判定됨을 最少로 줄이기 위해서도 잠정적으로 EMB의 내성 판정 기준농도는 2r를 기준으로 하되 그 이상 농도에 대한 계속적인 추시가 필요할 것으로 생각된다.

結 論

6종의 二次抗結核藥劑에 대한 절대농도법과MIC의 누적분포의 差에 의한 耐性判定 方法에 의거 현재 쓰이고 있는 本研究院의 耐性判定方法을 검토, 우리나라 結核患者로부터 分離한 結核菌의 抗結核劑에 對한 耐性判定基準濃度를 分析 시험하였다. 그 結果, 設定된 濃度와 次後 耐性檢査時 添加할 藥劑 濃度는 다음과 같이 정할 수 있었다.

References

1. Canetti, G., Fox, W., Khomenko, A., Mahder, H. T., Memon, N. K., Mitchison, D. A., Rist, N. and Smelev, N. A.: *Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in the tuberculosis control programmes*, Bull. Wld. Hlth. Org. 41:21-93, 1969.
 2. Jensen, K. A.: *Towards as standardization of laboratory methods*, Bull. Int. Un. Tuberc. 25: 89, 1955.
 3. Mitchison D. A.: *Personal Information*, Fed. 1978.
 4. Canetti, et al: *Bull. Wld. Hlth. Org.* 29:565, 1963.
 5. Lefford, M. J. and Mitchison, D. A.: *Comparisons of methods for testing the sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to Ethionamide*, Tubercle, Vol. 47, 3:250-262, 1966.
-