各種 抗結核劑에 對한 直接感受性檢査法の 改善에 關한 研究

I. 接種菌量 및 培養基

結核研究院

裴 吉 漢 · 金 尙 材

= Abstract =

Study on Direct Sensitivity Test of Tubercle Bacilli to the Various Anti-tuberculous Drugs

I. Inoculum Adjustment and Medium

Gill Han Bai and Sang Jae Kim

The Korean Institute of Tuberculosis, KNTA

Drug sensitivity of tubercle bacilli is usually determined by the indirect method, because the direct method is not considered easy to obtain standardized inocula for tests. Therefore, the present study has stressed on the standardization of inoculum size for the direct sensitivity test. In order to determine probable number of culturable bacilli in the sputum specimen, we used the fluorescence microscope instead of conventional light microscope, because we could scan much larger fields of smear in a much shorter time by the former than by the latter.

Microscopic enumeration of acid-fast bacilli in the sputum specimen was compared with the number of colony forming particles on culture examination and we could prepare a proper inoculum by diluting the digested sputum on the basis of microscopic data. If the homogenized sputa contain more than 100 or 50 to 100 bacilli per fluorescence microscopic field, it is desirable to dilute the specimens in 10 or 5 folds respectively before inoculation. If the specimens contain more than 100 bacilli per smear or 1 to 50 bacilli per microscopic field, the specimens must be planted onto media without dilution or after 2 folds dilution.

Minimal inhibitory concentrations(MIC) of tubercle bacilli to KM, EMB, TH, and CS showed a great differences between Löwenstein-Jensen medium and KIT medium, regardless of the methods employed. In the indirect methods, the minimal inhibitory concentrations to INH and SM were higher in KIT medium than those in Löwenstein-Jensen medium. But it was not evident in the direct method.

結 論

一般的으로 初治療 患者에 대한 藥劑感受性檢査는 意義가 없다. 그러나 初治療에 失敗한 患者의 再治療 藥劑 選定을 爲해서는 藥劑感受性檢査가 매우 重要하다. 特히 直接藥劑感受性檢査는 間接法에 비해 檢査結果를 훨씬 더 빨리 얻을 수 있기때문에 그와 같은 경우에 잘 適用 될 수 있을 것이다. 뿐만아니라 直接感受性檢査는 患者의 咯痰으로 感受性檢査를 實施함으로써 患者 病變內 菌의 耐性傾向이 보다 正確히 把握될 수 있으며, 菌培養 過程을 없앴으로써 培養過程에 所要되는 諸般 人的·物的資源을 節約할 수 있다는 長點 등을 가지고 있다. 그러나 直接感受性檢査는 對象 可檢物內에 存在하는 菌數를 顯微鏡 檢査 結果에 의거하여 推定한 후, 이에따라 接種 菌量을 調整·實施해야 하기때문에 間接法보다 接種 菌量 調整이 어렵다. 特히 咯痰內에 存在하는 菌이 不均等하게 分布되어 있거나, 咯痰 塗抹로부터 檢鏡 判讀에 이르는 過程에 缺陷이 있을 때는 檢鏡 結果로부터 推定된 咯痰內 菌數와 實在 菌數間에는 差異가 크게 생길수 있으며, 該痰內 존재하는 菌이 어떤 原因에 의해 生活力이 弱화 되었거나 死菌일 경우에도 檢鏡으로 推定된 菌과 培養된 菌數間에 큰 差가 생기게 되어 接種 菌量 調整上에 問題點이 있다고 볼 수 있다. 이러한 缺點을 補完하기 위해서, 螢光顯微鏡을 使用하여 咯痰內 菌數를 推定하고 실제 分離培養된 菌數와 比較한 다음, 最適 接種 菌量을 얻기위한 咯痰 稀釋法을 觀察하였다. 그리고 感受性檢査用 培地로서 本 研究院에서 現在까지 使用해오던 中性培地인 Löwenstein-Jensen (L-S)培地 대신에, 4% NaOH處理後 中和 有無에 관계없이 使用 가능한 KIT培地를 次後 感受性檢査用 培地로서 使用 가능한지도 本 實驗에서 檢討하였다.

實驗材料 및 方法

(1) 使用된 可檢物…感受性檢査가 可能할 것으로 생각되는 菌數를 含有하는 咯痰 93件을 使用하였다. 이 咯痰들은 모두 서로 다른 結患者로부터 採取되었다.

(2) 使用 藥劑 및 濃度(mcg/ml)

① Isoniazid (INH) : 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4

② Paraaminosalicylic acid (PAS) : 0.25, 0.5, 1, 2, 4

③ Streptomycin (SM) : 1.25, 2.5, 5, 10, 20

④ Kanamycin (KM) : 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100

⑤ Rifampicin (RFP) : 2, 4, 8, 16, 32

⑥ Capreomycin (CPM) : 6.25, 12.5, 25, 50, 100

⑦ Ethambutol (EMB) : 0.25, 0.5, 1, 2, 4

⑧ Prothionamide (TH) : 1.75, 3.5, 7, 14, 28, 56

⑨ Cycloserine (CS) : 2.5, 5, 10, 20, 40

(3) 塗抹標本製作方法 및 檢鏡…22 SWG (內經3mm) nichrome loop로 新鮮 該痰의 膿部를 取해 約 2×1 cm크도록 Slide上에 塗抹하여 螢光染料로 染色¹⁾한 다음, 最少한 300視野 이상을 檢鏡토록 했다. 檢鏡에 使用된 顯微鏡은 日製 Tiyoda이며, 200×에서 檢鏡했다.

(4) 螢光顯微鏡判讀方法(表1 参照)

卅: 每視野當 100개이상 菌數

卅A: 每視野當50개이상 100개미만 菌數

卅B: 每視野當 1개이상 50개미만 菌數(全視野 500個以上 菌數)

+A: 全視野 100個以上 500個미만 菌數

+B: 全視野 10個以上 100個미만 菌數

實數記錄: 全視野 10個미만 菌數

陰性: 全視野에서 1個의 菌도 없을 때

(5) 咯痰處理方法…咯痰과 同量의 4% NaOH로 15分間 處理後, phenol red 指示藥이 含有된 15%黃酸²⁾으로 中和하여 藥劑含有 또는 非含有 Löwenstein-Jensen 培地에 接種하거나, 中和없이 KIT培地에 接種했다.

KIT培地의 組成 成分 및 製造方法은 다음과 같다.

A 溶液

KH₂PO₄ 2.7g

Na₂HPO₄ 1.0g

Sodium glutamate 0.9g

Pyruvic acid 0.1g

D.W. 100ml

B 溶液

2% Malachite Green 6ml

Glycerine 4ml

Whole egg 200ml

A溶液에 B溶液을 섞어 分注한 다음, 85~90°C에서 1時間 加熱 凝固시켰다.

(6) 處理된 咯痰의 稀釋 및 接種…4% NaOH로 處理한 咯痰은 咯痰內 生菌數 推定을 위해 다음과 같이 희석하여 0.1ml씩 接種토록 하였다.

① 塗抹에서 卅인 咯痰: 100倍 및 1,000倍로 稀釋하여 接種.

② 塗抹에서 卍A인 咯痰: 10배 및 500배 희석하여 接種.

③ 塗抹에서 卍B인 咯痰: 5배 및 100배 희석하여 接種.

④ 塗抹에서 +A인 咯痰: 原液 및 10배 희석하여 接種.

結 果

(1) 螢光顯微鏡檢査 結果에 의한 菌數推定 方法

22 SWG(內經 3mm) nichrome loop를 利用하여, 咯痰을 1 loopful 취해 Slide上에 고르게 塗抹한다면 約 200mm² 咯痰塗抹面이 되며 顯微鏡 製造會社에 따라 다소 差異는 생길 수 있으나, 光學顯微鏡 1,000倍率로 觀察할 때, 視野面積은 0.02mm²內外로 볼 수 있으므로, 全塗抹面은 約 10,000視野정도로 推定된다. 그러나 螢光顯微鏡 200倍率로 觀察할 때는 視野面積이 大略 0.34mm²(視野 直徑이 0.66mm정도인 顯微鏡일 경

우)로 推定되므로, 全塗抹面이 500~600視野에 불과하다. 따라서 光學顯微鏡으로 300視野를 檢鏡하는 時間에 螢光顯微鏡으로는 거의 全視野를 觀察할 수 있다.

그러므로, 咯痰內 菌數推定을 위해서 螢光顯微鏡을 利用하는 것이 有利할 것으로 사료되어, 檢鏡判讀基準을 7個 等級으로 나누어 이에따라 咯痰 1ml當 菌數推定表를 作成하였다(表 1). +B이하로 檢鏡된 咯痰은 感受性檢査結果 判定에 充分할 정도의 菌數를 培養에서 얻지 못할 것으로 推定되므로 實驗對象에서 除外되었다.

(2) 咯痰塗抹檢鏡 및 培養 結果의 比較

塗抹 檢鏡이 끝난 咯痰은 4% NaOH로 均質化시키고, 그리고 같은 方法으로 塗抹標本을 만든 다음, 均質化前 咯痰의 檢鏡 結果에 따라 희석 한 후, 生菌數測定을 위한 培養을 실시하였다. 接種後 5週間 培養한 後 菌發育을 觀察하였으며, 그 結果를 檢鏡 結果와 比較했다.

表 2는 均質化前 咯痰의 檢鏡成績과 同一 咯痰의 培

Table 1. Fluorescence microscopy scale adapted for direct sensitivity test.

FM grades	Bacilli per field	Bacilli per smear	Bacilli per ml of sputum
卍	20,000	10,000,000	10 ⁹1,000,000,000
	2,000	1,000,000	10 ⁸100,000,000
	200	100,000	10 ⁷10,000,000
	100	50,000	5×10 ⁶5,000,000
卍A	50	25,000	2.5×10 ⁶2,500,000
卍B	20	10,000	10 ⁶1,000,000
	10	5,000	5×10 ⁵500,000
	2	1,000	10 ⁵100,000
	1	500	5×10 ⁴50,000
+A	0.5 (1 bacilli per 2 fields)	250	2.5×10 ⁴25,000
	0.2 (1 bacilli per 5 fields)	100	10 ⁴10,000
+B		50	5×10 ³5,000
		25	2.5×10 ³2,500
		10	10 ³1,000
Actual count		<10	<10 ³<1,000
		5	5×10 ²500
		1	10 ²100
No bacillus on whole fields (negative)			<10 ²<100

Table 2. Comparison of microscopic results of sputum smears with the culturable numbers of tubercle bacilli in sputum specimens.

Culturable bacilli per ml of sputum		Fluorescence microscopic grades of unhomogenized sputum smears			
		卄	卄A	卄B	+A
$\geq 5 \times 10^6$	(卄)				
$2.5 \times 10^6 - < 5 \times 10^6$	(卄A)		4(57.1%)	8(11.4%)	
$5 \times 10^4 - < 2.5 \times 10^6$	(卄B)	1(33.3%)	2(28.6%)	37(52.9%)	7(53.8%)
$10^4 - < 5 \times 10^4$	(+A)	1(33.3%)	1(14.3%)	7(10.0%)	
$10^3 - < 10^4$	(+B)			7(10.0%)	1 (7.7%)
$10^2 - < 10^3$		1(33.3%)		3 (4.3%)	2(15.4%)
$10 - < 10^2$				2 (2.9%)	1 (7.7%)
Negative				6 (8.6%)	2(15.4%)
Total		3	7	70	13

Table 3. Comparison of microscopic results of homogenized sputum smears with culturable numbers of bacilli in sputum.

Culturable numbers of bacilli per ml of sputum	Microscopic results	卄	卄A	卄B	+A	+B	Negative	Total
$\geq 5 \times 10^6$	(卄)							
$2.5 \times 10^6 - < 5 \times 10^6$	(卄A)	1(100.0%)	2(40.0%)	10(15.2%)				13
$5 \times 10^4 - < 2.5 \times 10^6$	(卄B)		3(60.0%)	43(65.2%)	3(100.0%)	1(25.0%)		50
$10^4 - < 5 \times 10^4$	(+A)			6 (9.1%)				6
$10^3 - < 10^4$	(+B)			4 (6.1%)		1(25.0%)		5
$10^2 - < 10^3$				2 (3.0%)		2(50.0%)	4(28.6%)	8
$10 - < 10_2$				1 (1.5%)			2(14.3%)	3
Negative							8(57.1%)	8
Total		1	5	66	3	4	14	93

養 可能 菌數로부터 測定된 喀痰內 菌數를 比較해 본 것이며, 表 3은 均質化된 同一 喀痰의 檢鏡 成績을 培養 成績과 다시 比較한 것이다.

可檢物數가 比較的 많은 卄B喀痰을 보면, 均質化前 卄B喀痰은 檢鏡으로 推定된 菌數와 實際 培養된 菌數 間의 一致率이 52.9%였으며, 檢鏡 結果로부터 推算된 菌數보다 높게 培養된 群은 11.4%, 낮게 培養된 群은 35.7%였다. 그리고 8.6%는 培養 陰性이었다. 均質化 한 卄B인 喀痰의 檢鏡 및 培養 結果 사이의 一致率은 65.2%였으며, 15.2%는 檢鏡時보다 培養 結果 推定菌 이 다소 높게, 19.7%는 檢鏡 結果보다 낮게 培養 되 었다. 즉, 均質化 有無에 關係없이 塗抹檢鏡 結果로부 터 推定된 菌數보다 실제 培養되는 菌數가 대체로 낮

은 경향이었고, 一致率은 均質化 된 喀痰이 均質化前 喀痰보다 높음을 보여주었다. 이는 可檢物數가 적은 卄, +A 喀痰에서도 유사한 結果였다.

表 4는 同一 喀痰의 均質化 前·後 檢鏡 結果를 比較한 것으로, 卄B喀痰은 80%의 一致率을 보였으나, 대체로 均質化 前後 喀痰의 檢鏡 結果 사이에는 一致 率이 낮았다.

(3) KIT培地 및 Löwenstein-Jensen 培地上에서의 各藥劑의 最低菌發育抑制濃度.

使用된 可檢物 93件 가운데서 抗結核藥劑 服藥歴이 전혀 없으면서 同時에 均質化前 檢鏡에서 卄B이상의 菌이 發見되는 10名の 結核患者 喀痰을 直接藥劑感受 性檢査에 使用하였다. 試驗된 喀痰中에서 藥劑非含有

Table 4. Comparison of microscopic results between homogenized and unhomogenized sputum specimens.

Unhomogenized	Homogenized with 4% NaOH						Negative	Accordance rate*
	##	##A	##B	+A	+B			
##			3					0/3(0%)
##A	1	3	3					3/7(48.9%)
##B		2	56		2	10		56/70(80.0%)
+A			4	3	2	4		3/13(23.1%)
Total	1	5	66	3	4	14		93

* Accordance rate = $\frac{\text{Numbers accorded}}{\text{Numbers sampled}} \times 100$

Table 5. The growth patterns of tubercle bacilli planted by direct method on Löwenstein-Jensen and KIT media containing the various concentrations of anti-tuberculous drugs.

Incubation period (week)	Media used	Drugs and their concentrations(mcg/ml)																																													
		INH				PAS				SM				KM				RFP				CPM				EMB				TH				CS													
		0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.25	0.5	1	2	4	1.25	2.5	5	10	20	3.125	6.25	12.5	25	50	100	2	4	8	16	32	6.25	12.5	25	50	100	0.25	0.5	1	2	4	1.75	3.5	7	14	28	2.5	5	10	20	40
2	L	3	2	1																		1	1									2	1				1					3	3	1			
	K	3	3	1	1						3	3					3	3	2				2	1	1			3	2	1			3	3	3	2	1					3	3	2	2	1	
3	L	3	2	2		1					1	1				1						3	2	1			3	1				3	1				3	3				3	3	2			
	K	3	3	1	1						3	3	1				3	3	2	2			3	2	1			3	3	2			3	3	3	3	2		3	1			3	3	3	2	2
4	L	3	2	2		1					2	2				2						3	2	2	1		3	2	1			3	3				3	3	1				3	3	2		
	K	3	3	1	1		1				3	3	1				3	3	3	2			3	2	2			3	3	2	1		3	3	3	3	2		3	2			3	3	3	3	2
5	L	3	2	2		1					2	2				3	2					3	2	2	1		3	3	2			3	3	1			3	3	2				3	3	2		
	K	3	3	1	1		1				3	3	1				3	3	3	2			3	2	2	1		3	3	3	1		3	3	3	3	2		3	2			3	3	3	3	2
6	L	3	2	2		1					3	2				3	2					3	2	2	1		3	3	2			3	3	1			3	3	2				3	3	3		
	K	3	3	2	1		2	1			3	3	2	1			3	3	3	3			3	2	2	1		3	3	3	1		3	3	3	3	2		3	2	1			3	3	3	3

L=Löwentain-Jensen medium K=KIT medium

培地上에 菌集落이 50개 미만이거나 試驗培地의 一部 汚染 또는 乾燥等으로 檢査 結果를 比較分析하는데 使用할 수 없었던 可檢物을 除外한 3件만이 最終 比較 資料로 사용되었다. 間接法에 의한 感受性檢査에서는 H₃₇Rv 1株과 韓國人 結核患者로부터 分離된 wild strains 19菌株를 使用하였으며, 最終 接種菌量이 10⁻³ mg되게 菌液을 調整하여 使用하였다. 直接 및 間接法 共히 6週까지 培養하면서 每週 菌發育 與否를 觀察하였다.

表 5, 6에서 보는 바와 같이, L-J培地와 KIT培地에 다 同時に 感受性檢査를 실시한 結果, 藥劑에 따라서는 使用된 培地나 直接·間接方法別 菌의 耐性樣狀이 달라짐을 觀察할 수 있었다. 直接·間接法間에는 耐性樣

狀에 큰 差가 없었으나 使用 培地에 따라 差를 보인 藥劑는 KM, EMB, TH, CS이었다. 그리고 使用 培地 사이에는 差가 없었으나 直接 또는 間接法에 따라 差를 보여준 藥劑는 PAS, CPM이었다. 方法에 따른 差를 보인 藥劑中 PAS는 直接法에서는 H₃₇Rv와 비슷한 0.2mcg/ml미만에서만 菌이 發育되었으나, 間接法으로 實施했을 때에는 대부분의 菌株(90% 이상)가 1mcg/ml에서 菌發育이 沮止되었고, 일부는 1mcg/ml에서 菌集落 50個 이내의 Pinpoint發育이 觀察되기도 했다. 表 6에서 보는바와 같이, 一部 菌株는 PAS, CPM, SM, KM等の 藥劑가 含有되어있는 培地上에서 6週까지도 菌發育이 계속되어, 初期에 發育이 抑制되었던 濃度까지 菌發育이 觀察되고있다. 直接法에서는 이러

Table 6. Drug sensitivity patterns of tubercle bacilli planted by indirect method on Löwenstein-Jensen and KIT media

Incu- tion period (week)	Media used	Drugs and their concentrations(mcg/ml)									
		INH	PAS	SM	KM	RPF	CPM	EMB	TH	CS	
H ₃₇ Rv	L	0.025	0.25	1.25	3.125	16	32	100	1.75	28	40
	K	0.1	0.5	2.5	12.5	8	16	50	2	14	20
2	L	0.2	1	4	12.5	4	8	25	0.5	7	10
	K	0.5	2	10	25	2	4	100	1	3.5	5
3	L	1	18	17	16	13	7	16	18	13	18
	K	2	11	2	8	1	1	19	9	2	10
4	L	2	3	6	18	4	5	16	11	9	16
	K	2	7	3	6	4	5	19	19	16	17
5	L	2	10	18	17	12	1	19	19	16	18
	K	2	2	6	12	3	4	15	16	4	19
6	L	2	6	18	18	16	4	19	19	16	19
	K	2	2	9	16	1	1	19	19	16	19
7	L	2	4	16	18	6	19	16	11	18	16
	K	2	10	18	18	3	19	16	16	17	19
8	L	2	5	19	19	19	8	19	19	16	19
	K	2	7	19	19	18	7	19	18	13	19
9	L	2	17	14	19	18	9	19	19	16	19
	K	2	15	18	19	19	3	19	19	19	19
10	L	2	18	19	19	19	9	19	19	19	19
	K	2	15	18	19	19	3	19	19	19	19

#=100-200 colonies, eugonic growth.

pp=50-100 colonies, sometimes minute.

#=Almost confluent growth.

pp=disygonic growth.

한 傾向이 間接法만큼 顯저하지는 않았다. 並行해서 試驗한 H37Rv菌株의 各藥劑에 대한 感受性은 Wild strains와 거의 一致했다. INH 및 SM에 대해서는 MIC가 KIT培地에서는 0.1mcg/ml 및 20mcg/ml이고, L-J培地에서는 0.05mcg/ml 및 10mcg/ml였다. 그리고 KM, EMB 및 CS에 대해서는 KIT培地上에서의 MIC가 50mcg/ml 이내, 4mcg/ml이상 그리고 40 mcg/ml이상이었는데, L-J培地上에서는 6.25mcg/ml 이내, 2mcg/ml이내 및 20mcg/ml이내로 크게 差異가 있었다. TH는 L-J培地上에서는 MIC가 28mcg/ml이내, KIT培地에서는 14mcg/ml 이내로, L-J培地에서 다소 높게 나타났다. PAS나 CPM은 培地間 MIC차는 없었으나 borderline MIC에서는 菌發育이 KIT培地에서 良好했다.

考 察

(1) 螢光顯微鏡을 통한 接種菌量 調整

咯痰으로부터 直接 藥劑感受性檢査를 實施하기 위해서는 咯痰內 菌數 推定이 先行되어야 한다. 著者等은 光學顯微鏡보다 短時間內에 대부분의 咯痰塗抹面의 觀察이 가능한 螢光顯微鏡을 使用하여 咯痰內에 存在하는 菌數를 推定하여 感受性檢査에 적합한 接種菌量を 얻기위한 稀釋方法을 檢討하였다.

可檢物이 少數이기는 하나, 檢鏡時 卅B인 咯痰을 例로들면, 卅B咯痰은 ml當 적어도 5萬個 以上の 菌은 存在할 것이며, 이 咯痰을 4% NaOH 同量으로 約 15~20分間 處理하여 0.1ml를 接種한다면, 推定으로는 最少 1,000個정도의 菌은 培養될 것이다. 그런데 均質化前 檢鏡에서 卅B였던 70件의 咯痰中에서 6件(8.6%)이 培養 陰性이었다. 同一 咯痰의 均質化 前後 檢鏡 結果 比較表(表 4)에서 본 바대로, 均質化前에 菌을 觀察할 수 있었던 咯痰이 均質化後에 陰性으로 判定되었으므로 均質化前 檢鏡成績이 卅B 또는 +A인 咯痰中에서 培養 陰性이 생긴 理由는 4%NaOH處理에 의한 菌의 生活力 損傷도 考慮될 수 있으나 咯痰內 菌의 심한 不均等 分布가 主要原因인 것으로 說明된다.

그리므로, 檢鏡으로 推定한 菌數와 培養된 菌數의 一致率을 높히려면 菌에는 영향을 주지 않는N-acetyl-L-cysteine이나 其他 mucolytic agent로 咯痰을 均質化 한 後 塗抹·檢鏡하여, 그 結果에 基礎해서 接種菌量 調整을 實施함이 유리할 것으로 思料된다. 表 2에서 본 바와 같이 均質化前 檢鏡 結果가 卅B인 咯痰의 約 16%, +A인 咯痰의 38%정도가 희석하지 않고 培養해도 50個 이내의 菌集落이 培養되어, 이들은 培養

된 菌에 의한 再檢査가 불가피할 것이다. 均質化된 喀痰의 檢鏡 結果를 基準으로 感受性檢査를 실시한다면, 그러한 問題를 상당히 개선할 수 있을 것으로 본다. 以上の 結果를 종합해 볼 때, 藥劑感受性檢査를 絕對濃度法(Absolute concentration method)³⁾에 따라 實施하는 實驗室에서는 다음과 같은 方法으로 接種菌量을 調整함이 좋을 것으로 생각되었다. 즉, 喀痰을 均質化한 後 檢鏡한 結果로부터 接種菌量을 調整時는, 塗抹에서 卅인 喀痰은 前處理하여 10倍 稀釋한 후, 卅A喀痰은 5倍 稀釋한 後, 卅B인 喀痰은 2倍 稀釋한 後, +A喀痰은 稀釋없이 0.1ml씩 接種하도록 하며, +B이하 喀痰은 培養後 間接法으로 檢査하도록 한다. 만일 均質化 되지 않은 喀痰塗抹檢査 結果로부터 接種菌量을 調整時는 卅B喀痰도 原液 接種함이 有利할 것으로 본다.

(2) KIT培地와 L-J培地上에서의 最低菌發育抑制濃度(MIC)의 比較

藥劑感受性檢査는 菌에 有害할 가능성이 있고 檢査施行上 번거로운 過程은 加급적 省略하고, 가능한 한 신속하게 菌의 發育을 허용할 수 있을 뿐만 아니라 使用藥劑의 安定性이 오랫동안 維持될 수 있는 培地の 選定을 필요로 한다.

L-J培地를 直接感受性檢査에 使用할 때에는 alkali로 處理된 喀痰을 中和後 接種해야 하는 번거로움이 있으나, KIT培地는 凝固後 pH가 6.5의 強한 酸性緩衝培地로서 alkali로 處理된 喀痰을 中和없이 接種할 수 있는 長點이 있고, Ogawa培地나 L-J培地에 비해 菌發育이 多少 良好하기때문에⁴⁾ 直接感受性檢査에서 L-J培地대신 使用 可能性을 검토하고자 했다.

結果에서 이미 본 바와 같이, 直接法과 間接法間 藥劑別 耐性樣狀은 藥劑에 따라서는 대체로 一致하는 것으로 보이나, 直接法에 使用된 可檢物이 少數이므로 앞으로 더 많은 可檢物로 比較 檢討 되어야 하겠다. 그러나, aminoglycosides antibiotics, EMB, CS와 같은 藥劑에서는 使用된 培地에 따라 MIC差가 현저했는데, 그 理由는 명확하지 않으나 培地의 pH, KH₂PO₄와 같은 鹽類의 含量差, pyruvic acid 등의 영향인 것으로 본다. 더 많은 患者의 喀痰과 耐性 및 感受性 菌株로 比較檢討하여 耐性基準濃度を 確立함으로써 檢査가 가능할 것으로 본다. 그 밖의 藥劑는 KIT培地를 성공적으로 利用할 수 있다고 본다.

結 論

各種 抗結核藥劑에 대한 藥劑感受性檢査는 一般的으

로 接種菌液의 菌數와 菌의 生活力의 標準化가 쉬운 間接法이 使用되고 있으나, 迅速한 檢査 結果를 얻기 위해 直接法에 의한 感受性檢査가 實施되기도 한다. 그러나 接種菌量의 標準化가 어려워 塗抹된 喀痰을 螢光顯微鏡으로 菌數를 推定, 感受性檢査에 適合한 菌量으로 調整하는 方法을 檢討하였다. 그리고 直接法에 使用할 培養基 改善의 일환으로, 本 研究院에서 改發한 KIT培地가 直接感受性檢査에 使用 可能한 培地인지를 檢討하였다. 試驗 結果를 要約하면 다음과 같다.

(1) 接種菌量調整...前處理된 喀痰은 螢光顯微鏡 200倍率로 檢鏡된 結果에 따라 稀釋한다. 희석된 喀痰의 接種 菌量은 0.1ml이며, 全視野에서 菌이 100個미만인 喀痰은 間接法으로 처리한다. 즉, 每視野 菌이 100個이상인 喀痰은 10倍, 每視野 50이상 100개미만인 喀痰은 5倍, 每視野 1個이상 50개미만일 때는 2倍로 희석한다. 全視野에서 菌이 100個이상 500개미만인 喀痰은 희석않고 接種한다. 단, 均質化 되지 않은 喀痰으로 檢鏡했을 때 每視野에서 菌이 1~50個인 喀痰도 희석하지 않고 接種토록 한다.

(2) L-J培地와 KIT培地上에서의 MIC比較—KM, EMB, TH, CS等 藥劑는 使用된 培地에 따라 현저한 MIC差를 볼 수 있었다. INH와 SM도 KIT培地上 MIC가 L-J培地보다 다소 높게 나타났다. PAS, CPM, 및 RFP等은 培地사이에 差를 볼 수 없었다.

參 考 文 獻

1. Truant, J.P., Brett, W.A. and Thomas, W. : Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. Henry Ford. Hosp. Med. Bull. 10 : 287-296. 1962.
2. 財團法人 日本公衆衛生協會 : 結核菌檢査指針, 東京, 財團法人 日本公衆衛生協會, 1972. p. 58
3. Canetti, G., Froman, S., Grosset, J., Hauduroy, P., Langerova, M., Mahler, H.T., Meissner, G., Mitchison, D.A. and Sula, L. : Mycobacteria : Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance, Bull. Wld. Hlth. Org. 29 : 565-578, 1963.
4. Dixon, J.M.S. and Cuthbert, E.H. : Isolation of tubercle bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic acid medium. Amer. Rev. Resp. Dis. 96(1) : 119-122, 1967.
5. 金尙材·金成鎮 : 數種의 結核菌分離培養方法의 比較實驗, 結核및呼吸器疾患, 23(2) : 85-91, 1976.