Microtiter Plate를 이용한 結核菌의 藥劑感受性 檢査

大韓結核協會 結核研究院

金 尙 材・裴 吉 漢・梁 成 贊

= Abstract =

Drug Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis* Using Microtiter Plate

Sang-Jae Kim, Sc.D., Gill-Han Bai, Ph.D. and Sung-Chan Yang

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Use of microtiter plate to drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* has been evaluated in the hope of replacing it with the conventional method, which is so complex, laborious, and time-consuming that it requires more materials, equipments, and skilled technique.

The results obtained were summarized as follows.

1) Drug susceptibility testing with 240 isolates of *M. tuberculosis* using Löwenstein-Jensen medium showed 97.5% agreement of the results between two methods for kanamycin (KM) and rifampicin (RMP), 93.8% for streptomycin (SM), 92.9% for isoniazid (INH), 91.7% for *p*-aminosalicylic acid (PAS), and 89.6% for ethambutol (EMB). In a separate study with 38 strains using 10^{-1} mg/ml of inoculum, overall agreement was 100% for all drugs tested.

2) The direct susceptibility tests with 10 sputum specimens, that had been digested, decontaminated, concentrated by centrifugation, and then directly inoculated on the drug free and containing media, showed 100% agreement between two methods for EMB, ethionamide (TH), INH, RMP, SM, and tuberactionmycin (TUM), and 90% for CS, KM, and PAS.

3) Agreement was very poor between two tests for pyrazinamide (PZA), which had been done in acidic medium.

Microtiter method is easy and rapid to perform and requires less amount of medium, merely one-tenth of the conventional method and no culture bottles or tubes. In addition, it is possible to shorten incubation period providing an average gain of 2 weeks or so. As the result of this study, microtiter method seems to be applicable for routine use except for PZA if the inoculum size and incubation period are well standardized.

序 論

結核菌에 대한 藥劑感受性檢査는 (1) 疫學的 調查目的으로 그리고 (2) 初治療失敗 환자나 再發患者의 處方選定을 위해 실시하는 중요한 結核檢査事業의 하나이다.^{1,2)} 그러나 검사방법이 복잡하고, 많은 機資材와 숙련된 檢査要員을 필요로 하며, 嚴正한 精度管理 아래에서만 실시

해야 하기 때문에 모든 검사실에서 실시할 수 없고 專門性을 유지하고 있는 규모가 큰 검사실에서만 실시할 수 있는 검사이다. 검사에 이용되는 藥劑의 安定性, 使用培地, 耐性(또는 感受性) 判定 基準濃度 및 검사방법등에 따라서 결과와 해석이 달라질 수 있기 때문에 모든 검사 과정과 방법이 標準化되고 그리고 그에 따라 통일된 방법이 이용되기를 바라고 있지만 실제로는 다양한 방법들이 이용되고 있어서 검사결과의 一致率이 매우 낮은 경

우가 많다¹⁻⁷⁾.

현재 結核研究院에서 실시하고 있는 藥劑感受性檢査法은 Canetti등^{4,5)}이 추천하고 있는 方法中 國際抗結核聯盟 標準培地인 Löwenstein-Jensen (L-J) 培地를 사용하는 絶對濃度法으로서 inoculum제조 및 耐性判定基準濃度 설정등을 다소 개선한 方法이다. 이 方法은 檢査결과를 얻기까지 시간이 오래 걸리고, 培養瓶, 배지 및 기타 재료의 消耗가 많고, 檢査과정의 복잡하여 숙련된 인력이 소요되므로 일상적으로 많은 可檢物을 처리해야 하는 檢査실에서는 보다 簡便하고 低廉하며 좀더 빨리 결과를 얻을 수 있는 方法이 요구되어 왔다. 따라서 그와 같은 목적에 어느 정도 附合된다고 보고한 바 있는 microtiter法^{8,9)}을 現행 方法과 代替할 수 있는지를 본연구를 통해 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 試驗菌株

1987년 6월부터 12월 사이에 結核研究院으로 藥劑感受性檢査를 의뢰한 人型 結核菌株 중 의뢰순서대로 240주를 선택하여 본실험에 이용하였다. 그리고 接種菌量에 따른 종래의 方法과 microtiter법의 비교실험에는 같은 기간에 檢査의뢰된 菌株 38株를 이용하였다. 螢光塗抹檢査에서 顯微鏡 視野當 50개 이상의 抗酸菌이 檢출된

喀痰 10건으로 集菌法에 따른 直接感受性檢査를 두 方法으로 실시하여 결과를 비교 하였고 그리고 PZA에 대한感受性檢査^{10,11)}는 48株의 菌株로 microtiter법과 從來方法 그리고 pyrazinamidase (PZAse) 試驗을 실시하여 비교하였다. PZA 感受性檢査는 酸性培地(凝固滅菌前 pH 5.0)를 사용하여 실시했다.

2. Microtiter Plate 製作

Micortiter plate는 크기가 가로·세로·높이 각각 118×36×30 mm이고, 모서리의 屈曲은 24.5°인 polyethylene plate로서 직경 8 mm, 높이 12 mm의 “U”자형 well 48개가 들어가게끔 제작하였다(Fig. 1). 그리고 plate 내면에는 幅 8 mm의 홈을 만들어 濾過紙를 증류수에 적셔서 놓아 培地乾燥를 막을 수 있도록 하였다. 두경은 菌發育을 觀察할 수 있게끔 透明하게 제작하였고 그리고 培地乾燥를 막기 위해서 고무대를 이용해 두경과 본체 사이를 密閉할 수 있도록 제작하였다. Microtiter plate는 E.O gas로 滅菌하여 個別 包裝해 공급하도록 했고, plate 材質은 90℃에서 여러 시간 처리해도 형태가 변하거나 有害한 化合物이 溶出되지 않는 것을 사용하였으며, 1회 사용을 원칙으로 하였다.

3. 藥劑含有 및 非含有 培地 製造

본 실험에 사용된 藥劑는 isoniazid (INH), ρ-

Fig. 1. A design of microtiter plate for durg susceptibility testing.

aminosalicylic acid (PAS), streptomycin (SM), ethambutol (EMB), rifampicin (RMP), prothionamide (TH), cycloserine (CS), kanamycin (KM), tuberactinomycin (TUM), ofloxacin (OX), pyrazinamide (PZA) 등이었다. 모든 藥劑는 凝固滅菌前 L-J培地에 添加하였다. 從來方法에서는 各培地瓶에 배지를 5 ml씩 分注해 斜面으로 凝固滅菌하였다. Microtiter plate는 各 well에 0.2 ml씩 分注해 凝固滅菌하였고, 藥劑 1濃度當 2 well씩 分注하였다. 그리고 well 周圍의 濾過紙에 배지건조를 막기 위해 蒸溜水 2.5 ml을 가하였다.

4. 菌液 製造와 接種

Ogawa 培地나 L-J培地에 배양한 菌을 nichrome wire loop로 채취해 직경 3 mm의 硝子球 5~6개와 멸균된 0.067 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 이 0.1 ml이 든 1/2 ounce瓶에 옮겨 vortex mixer로 均質化하여 MacFarland #10濁도와 일치하는 菌液 (10 mg/ml)을 제조하여 藥劑含有 및 非含有 培地에 接種하거나, 磷酸緩衝液으로 여러 濃도로 희석한 다음 接種하였다. Microtiter well에는 分注器(step-pette, Wheaton社)를 사용하여 25 μ l씩 接種하였고 培養瓶에 제조한 培地에는 外徑 3 mm의 27 SWG wire loop로 接種(약 2,000~10,000개의 菌)하였다.

直接法에 의한 感受性檢査는 直接塗抹標本을 螢光염

료로 염색하여 약 200배율의 螢光顯微鏡으로 鏡檢했을 때 시야당 50개이상의 抗酸菌이 검출된 喀痰을 0.5% N-acetyl-L-cysteine+2% NaOH로 均質化 및 汚染菌 제거를 실시한 다음(약 15분 처리) 滅菌蒸溜수로 5배이상 희석하여 4,000 rpm에서 15분간 遠心分離한 후 沈澱物을 재차 蒸溜水에 浮游시켜 遠心分離해 NaOH를 세척하였다. 沈澱物을 喀痰量 만큼 磷酸緩衝液으로 再浮游시킨 다음 從來方法이나 microtiter法에 따라 培地에 接種하였다.

5. 檢査結果 觀察

從來方法에 따라 菌接種한 培地는 37°C에서 4주간 배양한 다음 菌發育 與否를 관찰하였고, microtiter법으로 接種한 plate는 2주 배양후 觀察하였다.

結 果

1. 接種菌量과 培養期間에 따른 Microtiter內 培地の 색깔 變化

標準菌株 H₃₇Rv와 한국인 환자로 부터 分離해 이용하고 있는 參考菌株 2株(W₁, W₂)로 10 mg/ml의 菌浮游液을 만들어 5배 희석법으로 희석한 다음 各稀釋菌液을 6개의 well에 接種하여 37°C에서 배양하면서 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28일에 菌發育에 의한 培地表面의 색깔 變化를 觀察하였다. 그리고 稀釋菌液의 일부는 培養瓶培地에 0.1 ml씩 接種해 배양하여 microtiter well에 接種한 生菌數推算에 참고하였다. 실험결과를 보면 Fig. 2에 나타난 바와 같이 H₃₇Rv인 경우 接種菌量이 1.56×10⁵개이면 7일 배양후 발육한 菌集落이 培地表面을 거의 다 덮어 색깔이 乳白色 내지 淡黃色으로 변하고 10일에는 菌集落이 많이 자라 배지 全表面을 덮을 뿐 아니라 건조하고 거친 菌集落이 두겹게 형성되는 되는 것을 볼 수 있었다. 대체로 10³개의 生菌을 接種하면 2주 배양에서 菌集落이 培地表面을 거의 다 덮을 정도로 菌이 자라 배지 색깔이 변한다. 그러나 50~100개의 菌을 接種하면 16일 이후에 배지의 색깔이 변했다. 동시에 시험된 W₁과 W₂菌株는 3.13~15.6×10⁶개의 菌을 接種해도 7일에 培地表面의 약 절반정도를 菌集落이 덮어 색깔이 약간 변할 정도였다(“+”). 대체로 10⁵~10⁶개의 菌을 接種했을 때 2주 배양에서 “+++” 이상의 菌發育을 볼 수 있었다. 2주 배양에서

感受性檢査結果判讀要領

判讀結果 表記	從來方法	microtiter法
—	菌發育 없음	菌 接 種 하 지 않 은 wells과 색깔 같음
菌集落數 기록	菌集落이 50개 미만일 때*	
+	菌集落 50~100개	약간 또는 부분적 變 色
++	菌集落 100~200개	培地表面의 折半정도 가 菌發育으로 變色
+++	菌集落이 헤아릴 수 없이 많지만 融合않음	培地表面의 거의 전부 를 菌集落이 덮어 變 色
++++	菌集落이 融合되어 發 育	培地 全表面이 菌集落 層으로 덮여 變色

*藥劑含有培地에 20개 이상의 菌集落이 發育하면 그 濃度에 耐性으로 判讀함

Inoculum (mg/ml)	Viable counts		
	Hv	W1	W2
① 2.5	1.56	3.13	6.25
$\times 10^{-1}$	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^8$
② 5.0	3.13	6.25	3.13
$\times 10^{-2}$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
③ 1.0	6.25	1.25	6.25
$\times 10^{-2}$	$\times 10^3$	$\times 10^5$	$\times 10^5$
④ 2.0	1.25	2.5	1.25
$\times 10^{-3}$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$
⑤ 4.0	2.5	5.0	2.5
$\times 10^{-4}$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$
⑥ 8.0	5.0	1.0	5.0
$\times 10^{-5}$	$\times 10^1$	$\times 10^3$	$\times 10^3$
⑦ 1.6	1.0	2.0	1.0
$\times 10^{-5}$	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$
⑧ 3.2	2	4.0	2.0
$\times 10^{-6}$		$\times 10^1$	$\times 10^2$

Fig. 2. Color change of microtiter medium due to the growth of *M. tuberculosis*.

“+” 이상의菌이發育하려면 약 $10^4 \sim 10^5$ 개의菌을接種해야 한다. 약 10^3 개의菌을接種하면 3주전후에判讀이 가능하였다.

2. Microtiter 培地上에서의臨床分離菌의培養期間別發育樣相

4주培養에서藥劑가 들어있지 않은배지에 “+” 이상의發育을 나타낸菌株 240株의 발육을 배양기간별로 살펴보면 Table 1에서 보는 바와 같다. 1주 배양에서는

93.3%가 분명한 발육을 보여주지 않았다. 그러나 10일 배양에 56.3%, 14일 배양에 86.3%, 21일 배양에 98.8% 그리고 4주 배양에는 모두 (100%) 발육하여 배지색깔이 현저하게 변했다. “+++” 이상의 발육을 나타낸菌株가 2주에 39.6%였고, 3주에는 72.5%이었다.

3. 培養期間別藥劑含有培地에서의菌發育樣相

2주 배양후 對照培地に “+” 이상의菌이發育했을 때藥劑含有培地に接種한菌의發育을 4주까지 관찰한 결

Table 1. Growth of 240 Clinical Isolates of *M. tuberculosis* on Drug Free Medium in Microtiter Plate by Incubation Periods

Incubation periods (days)	Growth					Total
	—	+	++	+++	++++	
7	224 (93.3)	16 (6.7)				240 (100)
10	105 (43.8)	70 (29.2)	43 (17.9)	22 (9.2)		240 (100)
14	33 (13.8)	44 (18.3)	68 (28.3)	78 (32.5)	17 (7.1)	240 (100)
21	3 (1.3)	9 (3.8)	54 (22.5)	91 (37.9)	83 (34.6)	240 (100)
28		4 (1.7)	22 (9.2)	51 (21.3)	163 (67.9)	240 (100)

() = %

Table 2. Growth of *M. tuberculosis* Isolates on Drug Media

Growth on drug free medium at 2 weeks incubation	Incubation periods (weeks)	Number of strains grown on drug containing medium ($\mu\text{g/ml}$)								
		INH (0.2)	EMB (2)	RMP (32)	PAS (1)	SM (10)	KM (50)	TH (56)	CS (40)	OX (2.5)
+	2	25	8	20	11	7	2	1	2	1
	3	27	12	23	12	7	2	1	2	1
	4	31	16	24	13	9	3	1	2	1
++	2	30	16	25	11	8	4	0	1	0
	3	32	18	25	13	10	5	0	2	0
	4	34	23	26	16	12	5	3	2	0
+++	2	33	24	29	15	24	8	1	2	0
	3	34	28	30	18	26	9	2	4	0
	4	36	31	30	20	28	10	5	6	0
++++	2	10	7	0	7	6	4	0	1	1
	3	10	7	1	8	6	4	1	1	1
	4	10	7	2	8	6	6	2	2	1
Total		111	77	82	57	55	24	11	12	2

과를 보면 Table 2에 나타난 바와 같다. 즉 INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 함유된 배지에 2주에서 “+” 이상의發育을 나타낸菌株가 對照培地에서 “+”, “++”, “+++” 및 “++++”이었던菌株 가운데서 각각 25株, 30株, 33株 및 10株였고, 그후 延長培養(3, 4주)에서 추가로 INH 배지에서 자란菌株가 각각 6株, 4株, 2株 및 2株였다. 2주배양에서 EMB 2 $\mu\text{g/ml}$ 에 자란菌은 모두 55株인데 4주 후 2주에 對照培地에서 “+”, “++”, “+++”이었던菌株 가운데서 각각 8株, 7株 및 7株가 추가로發育하였다. RMP 32 $\mu\text{g/ml}$ 배지에 2주배양에 자란菌은 모두 74株이고 4주 延長培養에서 추가로 자란菌株는 모두 8株에 불과했다. PAS와 SM배지에서 2주배양에發育한菌株가 각각 44株 및 45株이었는데 4주 연장배양에서 13株 및 10株가 추가로發育하여 耐性菌株가 모두 57株 및 55株였다. 기타藥劑培地에서는發育한菌株數가 적어 분석할 의미가 없었다.

4. 從來方法과 Microtiter법에 의한 藥劑感受性檢査 결과의 비교

從來方法에 따른 藥劑感受性檢査 결과는 4주에 判讀하였고, microtiter법에 의한 검사결과는 2주배양에서 藥劑가 함유되어 있지 않은 배지상의發育이 “+++”

Table 3. Comparison of INH Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			0.2 μg/ml	1.0 μg/ml	
Sensitive		97 (40.4)	6 (2.5)	2 (0.8)	105 (43.8)
Resistant to	0.2 μg/ml	1 (0.4)	23 (9.6)	5 (2.1)	29 (12.1)
	1.0 μg/ml	8 (3.3)	6 (2.5)	92 (38.3)	106 (44.2)
Total		106 (44.2)	35 (14.6)	99 (41.3)	240 (100.0)

() = %

이상이면 즉시 判讀하고, “+” 또는 “++”이면 1~2주간 연장배양하여 “+++” 이상의發育이 보일 때 判讀하였다. 그러나 4주 배양에서도 “+++”이면 그대로 判讀하였지만 “+”인 경우에는 검사를 다시 실시하였다.從來方法에서는 藥劑含有培地에서 20개 이상의菌集落이發育하면 해당 藥劑濃度에 耐性인 것으로 判讀하였고 그리고 microtiter법에서는 “+”이상의發育(색깔 변

화)을 耐性으로 判讀하였다.

INH에 대한 感受性檢査 결과를 비교해 보면 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉 두 방법의 결과가 완전히 일치한 경우는 240株 중 212株이었고, 感受性を 耐性으로 또는 그와 반대로 耐性を 感受性으로 判讀하여 완전히 불일치한 경우는 불과 17株(7.1%)이므로 사실상 92.9%의 일치된 결과를 보여 주었다. 두 방법 중 어느 것에 의해서던 耐性으로 判讀된 269건(135+134) 중 일치하지 않은 건수가 17건으로 93.7%의 一致率을 나타내고 있는 셈이었다.

RMP에 대한 感受性檢査 결과를 보면 240株 중 234株(97.5%)가 두 방법사이에 완전히 일치된 결과를 보여 주었다(Table 4). 두 방법 중 어느 것에 의해서던 耐性으로 밝혀진 206건(101+105) 중 不一致 건수가 6건이므로 97.1%의 一致率을 나타내고 있다.

Table 4. Comparison of RMP Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			16 μg/ml	32 μg/ml	
Sensitive		134 (55.8)	0	1 (0.4)	135 (56.3)
Resistant to	16 μg/ml	0	0	0	0
	32 μg/ml	5 (2.1)	0	100 (41.7)	105 (43.8)
Total		139 (57.9)	0	101 (42.1)	240 (100.0)

() = %

EMB에 대한 感受性檢査 결과는 두 방법사이에 240株 중 25株의 결과가 일치하지 않아 89.6%의 一致率을 나타내었다. 感受性菌은 一致率이 92.4%로 높지만 두 방법 중 어느 것에던 耐性으로 判讀된 151건(82+69)중 25건이 일치하지 않아 83.4%의 一致率을 보여주고 있다(Table 5).

두 방법에 의한 PAS 感受性檢査도 一致率이 91.7%로 높은 편이지만 종래의 방법에서 耐性으로 밝혀진 41건과 microtiter법에 의해 밝혀진 耐性 53건의 相互一致率은 평균 78.7%(각각 90.2% 및 69.8%)에 불과했다. Microtiter법에서 耐性 判讀 基準濃度로 PAS 2 μg/ml

Table 5. Comparison of EMB Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			2.0 μg/ml	2.8 μg/ml	
Sensitive		152 (63.3)	3 (1.3)	3 (1.3)	158 (65.8)
Resistant to	2.0 μg/ml	7 (2.9)	2 (0.8)	0	9 (3.8)
	2.8 μg/ml	12 (5.0)	18 (7.5)	43 (17.9)	73 (30.4)
Total		171 (71.3)	23 (9.6)	46 (19.2)	240 (100.0)

() = %

을 택하면 一致率이 다소 높아진다.

SM 感受性檢査의 결과도 전반적으로 두 방법 사이에 비교적 높은 一致率을 보여주고 있다. 즉 93.8%의 菌株가 두 방법에 의해 일치된 耐性 또는 感受性菌으로 判讀되었다. 耐性菌으로 分類된 경우가 모두 119건인데 그 중 15건의 결과가 一致하지 않아 전반적 一致率은 87.4%이었다.

두 방법에 의한 KM 感受性檢査의 결과는 97.5%의 높은 一致率을 보여주고 있다. 耐性으로 분류된 건수가 많지는 않지만(29+29=48건) 一致率이 89.7%로 높았

Table 6. Comparison of PAS Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			1.0 μg/ml	2.0 μg/ml	
Sensitive		183 (76.3)	3 (1.3)	1 (0.4)	187 (77.9)
Resistant to	1.0 μg/ml	5 (4.1)	1 (0.4)	1 (0.4)	7 (2.9)
	2.0 μg/ml	11 (4.6)	2 (0.8)	33 (13.8)	46 (19.2)
Total		199 (82.9)	6 (2.5)	35 (14.6)	240 (100.0)

() = %

다.

그외의 藥劑에 대한 感受性檢査는 두 방법에 의해 耐性으로 判讀된 菌株가 OX 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해 2株, TH 56 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해 2株, CS 40 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해 5株, TUM 25 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해 2株로 수가 너무 적어 의미있는 분석을 할 수 없었다. 感受性菌들은 모두 일치된 결과를 보여 주었다.

Table 7. Comparison of S M Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			10 μg/ml	20 μg/ml	
Sensitive		173 (72.1)	4 (1.7)	4 (1.7)	181 (75.4)
Resistant to	10 μg/ml	1 (0.4)	2 (0.8)	6 (2.5)	9 (3.8)
	20 μg/ml	6 (2.5)	3 (1.3)	41 (17.1)	50 (20.8)
Total		180 (75.0)	9 (3.8)	51 (21.3)	50 (100.0)

() = %

Table 8. Comparison of K M Susceptibility Test Results by the Conventional and Microtiter Methods

Microtiter method		Conventional method			Total
		Sensitive	Resistant to		
			50 μg/ml	100 μg/ml	
Sensitive		208 (86.7)	0	3 (1.3)	211 (87.9)
Resistant to	50 μg/ml	2 (0.8)	0	0	2 (0.8)
	100 μg/ml	1 (0.4)	1 (0.4)	25 (10.4)	27 (11.3)
Total		211 (87.9)	1 (0.4)	28 (11.7)	240 (100.0)

() = %

5. Microtiter법에 의한 直接 感受性檢査

螢光染色한 直接塗抹標本の 檢鏡에서 視野當 50개 이상의 抗酸菌이 검출되어 두가지 방법으로 直接感受性檢査

査를 실시하여 菌이 發育된 10건의 결과를 비교분석 하였다.

2주 배양에서 microtiter plate의 對照培地(藥劑 含有되지 않은 배지)에서 “+” 이상의 菌發育을 볼 수 있었던 경우는 10건 중 1건에 불과했다. 3주배양에 8건에서 菌이 發育했지만 “+++” 이상은 4건이었다. 4주에는 10건 모두 “+++” 이상의 發育을 나타내었다.

비록 檢査건수가 적지만 KM, PAS 및 CS를 제외한 고는 10건 모두 microtiter법과 從來方法 사이에 일치된 결과를 보여 주었다. 國家結核管理에서 사용되는 處方의 主軸이 되는 INH, EMB 및 RMP에 대한 耐性件數가 각각 8건, 8건 및 9건이라 분석에 도움이 되었지만 KM, CS, TH, TUM 및 OX에 耐性인 경우는 0~2건에 불과해 분석에 적합하지 못했다. 그러나 感受性菌은 모두 두 방법에 의해 일치된 결과를 보여 주었다.

Table 9. Direct Susceptibility Tests by the Conventional and Microtiter Methods with 10 Smear Positive Sputums

Drugs tested	Agreement in both methods		Disagreement between two methods
	Sensitive	Resistant	
INH	2	8	0
RMP	1	9	0
EMB	2	8	0
S M	6	4	0
K M	7	2	1
PAS	5	4	1
T H	9	1	0
C S	7	2	1
TUM	9	1	0
O X	10	0	0

6. Microtiter법에 의한 pyrazinamide (PZA) 感受性檢査

試驗菌株 48株 가운데서 2주배양에 “+” 이상의 發育을 보여준 菌株가 중성배지상에서는 44株인데 비해 酸性培地에서는 11株에 불과했고, 3주배양에서는 각각 47株, 15株, 4주배양에서는 각각 48株, 3株 그리고 5주배양에서는 각각 48株, 35株 이었다. 6주배양에서도 6株는 酸性培地에서 發育하지 않았다.

Table 10. Pyrazinamide Susceptibility Tests with 48 Strains of *M. tuberculosis* by the Conventional and Microtiter Methods and by Pyrazinamidase Tests

Microtiter method	Conventional method					Total
	Sensitive		Resistant	No growth		
	+PZAse	−PZAse	−PZAse	+PZAse	−PZAse	
Sensitive	32 (66.7)	1 (2.1)	1 (2.1)	2 (4.2)		36 (75.0)
Resistant	3 (6.3)	1 (2.1)	2 (4.2)			6 (12.5)
No growth			2 (4.2)	1 (2.1)	3 (6.3)	6 (12.5)
Total	35 (72.9)	2 (4.2)	5 (10.4)	3 (6.3)	3 (6.3)	48 (100.0)

() = %

從來方法과 microtiter법 그리고 pyrazinamidase 시험등에 의한 PZA 感受性檢査 결과를 비교해 보면 Table 10에서 보는 바와 같다. 즉 세가지 방법에 의해 일치된 결과를 나타낸 菌株은 34株(70.8%)에 불과해 다른 抗結核劑에 비해 一致率이 낮다는 사실을 알 수 있다. PZAse試驗法을 제외하더라도 microtiter법과 從來方法의 一致率은 79.2%에 불과하다.

接種量에 따른 藥劑感受性樣相을 藥劑別로 보면 Table 11에서 보는 바와 같다. 從來方法에 따른 검사에서는 接種量의 多寡에 따라 크게 달라지지 않지만 microtiter법은 크게 달라진다.

에 microtiter법을 처음 시도한 학자는 川村 達⁸⁾로서 從來方法과의 一致率이 높다고 보고했다.

Microtiter법의 특징은 한개의 plate에 여러개(48개)의 홈을 만들어 넣고 그곳에 소량(0.2 ml)의 배지를 分注하여 凝固멸균한 다음 從來方法 보다 약 100배 정도되는 菌을 接種하여 배양한 후 菌發育與否를 菌集落數가 아니라 菌發育으로 인한 培地表面의 색깔 변화를 보아 判讀하는 것이다. 따라서 從來方法과 다른 점을 요약하면 (1) 검사결과를 약 1~2주 정도 빨리 얻을 수 있고, (2) 소요 배지량이 1/10정도로 적게 들뿐 아니라 培地瓶(또는 시험관) 購入費用 보다 microtiter plate 購入費用이

Table 11. Drug Resistance Patterns of 38 Strains of *M. tuberculosis* in Relation with Inoculum Size

Drugs (μg/ml)		Microtiter method			Conventional method			Drugs (μg/ml)		Microtiter method			Conventional method		
		10*	1*	10 ⁻¹ *	10*	1*	10 ⁻¹ *			10*	1*	10 ⁻¹ *	10*	1*	10 ⁻¹ *
INH	0.2	34	22	20	20	20	20	INH	1.0	30	21	16	17	16	14
PAS	1.0	28	14	5	8	7	5	PAS	2.0	27	13	5	8	7	5
S M	10.0	21	7	5	8	7	5	S M	20.0	14	5	3	6	5	4
EMB	2.0	26	12	6	8	6	6	EMB	2.8	22	6	3	6	4	3
RMP	16.0	14	13	13	13	13	13	RMP	32.0	14	13	13	13	13	13
T H	56.0	17	2	1	1	1	1	C S	40.0	10	3	1	2	2	1
K M	50.0	11	4	4	4	4	4	O X	2.5	9	2	0	0	0	0

* mg/ml

考 察

Microtiter plate를 이용한 藥劑感受性檢査는 Cooke Laboratories, Inc.가 液體培地 희석법을 改良해 상품화한 것이 嚆矢가 되었다^{12,13)}. 結核菌의 藥劑感受性檢査

1/20로 低廉하며, (3) 菌接種에 소요되는 시간도 1/10로 단축되며, (4) 소요배지도 한정된 시간내 3배이상 제조할 수 있을 뿐 아니라 부란실 점유 공간도 1/4로 적다는 이점이 있다. 그러므로 검사결과가 從來方法과 일치한다면 microtiter법으로 交替하는 것이 타당하다고 사료되어 본 실험을 실시했다. 그러나 사용배지는 國際抗結

核聯盟 標準培地인 Löwenstein-Jensen 배지가 타당하다고 사료되어 본 연구에서는 1% Ogawa배지 대신에 L-J배지를 이용했다.

Microtiter plate를 이용할 경우 적절한 배양기간이從來方法과는 다를것으로 보기 때문에 標準菌株 $H_{37}Rv$ 와 參考菌株 2株를 이용하여 관찰한 결과 물론 接種菌量에 따라서도 크게 다르지만 같은 接種菌量이라도 菌株에 따라 다소 다르다는 사실을 알 수 있었다. 대체로 判讀에 적절한 “+++” 이상의 發育을 2주에 얻기 위해서는 $H_{37}Rv$ 의 경우 10^3 개 이상, 參考菌株의 경우 10^{5-6} 개의 菌을 接種해야 했다. 따라서 2주에 “+++” 이상의 發育을 보이지 않으면 연장배양한 다음 判讀하는 것이 바람직 했다. 240株의 試驗菌株도 2주에 “+++” 이상의 發育을 보여준 菌株이 약 40%에 불과했고, 3주에는 73%였다. 接種菌량을 증가시키면 判讀기간을 단축할 수 있으나 藥劑耐性 突然變異菌數의 증가에 의한 誤判危險이 따르게 된다. 예를 들어 接種菌液의 菌數가 많아 耐性變異菌數가 약 1% 정도 있으면 藥劑가 함유되지 않은 배지에 “+++” 이상의 菌이 發育하면 그로부터 약 4~6일 이내에 藥劑含有培地の 색깔도 菌發育으로 인해 변한다. 耐性菌 含量이 더 많으면 藥劑培地の 색깔변화는 더 빠르게 일어난다. 標準菌株 $H_{37}Rv$ 를 50개 정도 對照培地에 接種하면 2주에 발육이 관찰되기 시작해 3주에는 “++++”에 이르지만 INH $0.025 \mu g/ml$ 배지에는 4주가 되어도 菌發育이 검출되지 않는다. 그러나 10^5 정도 接種하면 7일에 INH $0.025 \mu g/ml$ 배지에서의 發育이 대조배지와 마찬가지로 “+++”의 發育을 보여주고, $0.05 \mu g/ml$ 배지에는 14일에 “+”, 16일에 “++”, 18일에 “+++”의 發育을 나타내었고, $0.1 \mu g/ml$ 배지에서는 16일에 “+”, 18일에 “++” 그리고 20일에 “+++”의 發育을 보여주고 있는 점은 곧 接種菌량이 많을 경우 배양기간이 매우 중요하다는 사실을 말해 주고 있다. 그래서 $10 mg/ml$ 의 菌液을 $25 \mu l$ 씩 接種한 경우에는 2주에 첫 判讀을 하고 만일 對照培地에서의 發育이 “+++”가 안되면 연장배양한 후 判讀하여從來方法과 비교관찰한 결과 전반적 一致率은 RMP와 KM이 97.5%, SM이 93.8%, INH가 9.9%, PAS가 91.7% 그리고 EMB가 98.6%이었다. 일반적으로 耐性突然變異菌 出現頻도가 낮은 藥劑일수록 높은 一致率을 나타내는 경향이였다. 그외의 抗結核劑는 비록 感受性菌의 一致率은 매우 높아도 耐性菌株數가 적어 의미있는 비교를

할 수 없었다. 接種菌量과 耐性基準濃度 조정등을 통해 一致率을 提高할 수 있을 것으로 보지만 結核研究院 細菌部에서 3년이상 藥劑感受性檢査에 從事했던 5명의 技士에 의해 同一菌株로 동일한 방법에 의해 독립적으로 感受性檢査를 실시하여 그 결과를 비교한 결과 一致率이 70~93.3%⁷⁾이었음을 勘案하면 microtiter법과從來方法의 一致率은 매우 높다고 볼 수 있다.

Microtiter plate를 이용한 直接 藥劑感受性檢査가 검사기간 단축에 크게 기여할 것으로 기대되므로 接種菌量 標準化와 배양기간 조정등을 통하여 개선해 나갈 필요가 있다고 생각된다.

그리고 PZA感受性檢査에는從來方法도 어려운 점이 많지만 microtiter 법도 적합하지 않음을 알 수 있었다.

結 論

현재 실시하고 있는 結核菌의 藥劑感受性檢査法은 배지제조로 부서 菌液의 제조 및 점종과 결과 判讀에 이르기까지 제반과정의 복잡해 숙련된 인력에 의해서만 실시될 수 있고 비용도 많이 들며 결과를 얻기까지 시간도 많이 걸리는 단점을 가지고 있어 이를 개선하기 위한 방편으로 microtiter법을從來方法과 비교검토하여 대체하고자 본 연구를 실시하였다.

환자로 부터 분리된 240주의 結核菌으로 각종 抗結核劑에 대한 感受性檢査를 두방법으로 실시하여 비교한 결과 一致率이 KM과 RMP에 대해서는 97.5%, SM, INH, PAS 및 EMB에 대해서는 각각 93.8%, 92.9%, 91.7% 및 89.6%로 높게 나타났다. 38株의 菌에 대해 $10^{-1} mg/ml$ 의 接種菌液으로 실시한 결과는 두 방법 사이에 100%의 一致率을 나타내었다.

10건의 塗抹陽性喀痰을 直接感受性檢査法으로 실시한 결과를 보면 CS, KM, PAS 등을 제외하고는 두 방법의 결과가 모두 일치하였다. 그러나 酸性培地를 이용한 PZA에 대한 감수성검사는 두방법간의 一致率이 낮았다.

Microtiter법은 배지와 培地瓶의 소모를 크게 절약할 수 있을 뿐 아니라 菌液接種도 容易하고 결과도 1~2주일씩 얻을 수 있는 장점이 있어서 PZA를 제외한 각종 抗結核劑에 대한 日常 感受性檢査法으로 이용할 수 있다고 본다. 다만 接種菌量에 따라 결과가 크게 달라지므로 藥劑別로 試驗濃度와 관련하여 細心한 標準化가 이루어

적야 한다.

REFERENCES

- 1) 金尙材, 金成鎮: 結核 및 非結核抗酸菌檢液, 結核. 大韓結核協會, 大韓結核學會 pp 161-184, 1984
- 2) Mitchison DA: The mycobacteria. In Scientific foundations of respiratory medicine. Scadding JG, Cumming G, Thurlbeck WM (Ed), William Heinemann Medical Books Ltd, pp 371-383, 1981
- 3) World Health Organization: Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests. Technical Report Series 210, 1961
- 4) Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull WHO 41:21, 1969
- 5) Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Miloslara L, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula L: Mycobacteria. Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO 29:565, 1963
- 6) Marks J, Cited In Toman K: Tuberculosis. Case-finding and chemotherapy. p 173, World Health Organization, 1979
- 7) Kim SJ: Tuberculosis laboratory services in the national tuberculosis programme. Hand-out for the laboratory course in TB control of the WHO/Japan international TB course in Tokyo, 1990
- 8) 川村 達: 結核菌耐性スバクトル檢査法, 近代醫學社, 東京, 1971
- 9) Kawai M, Mochizuki T, Sugiyama C: Rapid and simple method for sensitivity test of antituberculous drugs. Proceeding of the 18th Congress of the International Association of Medical Laboratory Technologists, 1988
- 10) 裴吉漢, 金尙材: Pyrazinamide 感受性檢査 方法 改選에 관한 研究, 結核 및 呼吸器疾患, 30(3):103, 1983
- 11) Tripathy SP, Mitchison DA, Nair NGK, Radhakrishna S, Subbammal S: A comparison of various measures of sensitivity of *M. tuberculosis* to pyrazinamide. Tubercle 51:373, 1970
- 12) Gavan TL, Town MA: Microdilution method for antibiotics susceptibility testing. Bacteriol Proc p 73, 1969
- 13) Goldschmidt MC: Instrumentation, automation and mimaturation. In Soonenwirth AC, Jarett L(ed), Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, 8th ed, Chap 74, CV Mosby, St Luis, 1980