대한임상미생물학회지 1999:2;49-53

*Helicobacter pylori*의 항균제감수성검사를 위한 항균제 용액의 냉동보관

전래희 · 강정옥 · 김선의 · 박일규

한양대학교 의과대학 임상병리학교실

Evaluation of Frozen Antibiotics for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter Pylori*

Lae Hee Chun, M.D., Jung Oak Kang, M.D., Sun-E Kim, M.D. and Ile Kyu Park, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Kuri, Korea

Background **: Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori(H. pylori)* is not yet standardized but broth dilution or agar dilution are considered as standard methods. In the broth microdilution method, antibiotic dilutions of different concentrations are made each time, but most of it is discarded because only small volumes of dilutions are used. To improve this tedious procedure and the waste of reagents, antibiotic solutions in 96-well microplates were frozen at -20℃ to evaluate their useful storage periods.**

Methods **: Various concentrations of metronidazole(MTZ) and clarithromycin(CLR) solutions were divided into ten plates of 96-well microplates, sealed and stored at -20℃. The broth microdilution susceptibility test was done with fresh and preserved antibiotic dilutions each month on 5 occasions for 4 strains(initial minimum inhibitory concentration(MIC) for MTZ 1, 4, 16, 64 ug/mL, initial MIC for CLR <0.125, <0.125, <0.125, 32 ug/mL) of *H. pylori*. The difference of MIC values of more than ±2 $\log_2$ dilution was considered significant.**

Results **: For both MTZ and CLR, the difference of MIC values of fresh and frozen antibiotic solutions was within ±1 $\log_2$ dilution and the results of susceptibility test were the same for 7 months.**

Conclusions **: Various concentrations of frozen MTZ and CLR solutions could be used for at least 7 months for the antimicrobial susceptibility testing of *H. pylori*.**

(Korean J Clin Microbiol 1999;2:49~53)

Key words ***H. pylori*****, Antimicrobial susceptibility test, Metronidazole, Clarithromycin, Preservation.**

원본 접수 : 1999년 1월 19일 접수번호 : CM99-12
수정본접수 : 1999년 2월 11일
교신저자 : 강 정 옥
(471-701) 경기도 구리시 교문동 249-1
한양대학교 구리병원 임상병리과
전화 : 0346-560-2572 Fax : 0346-560-2585

서 론

*Helicobacter pylori(H. pylori)*에 대한 표준 항균제감수성검사법은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)에 수록되어 있지 않으나 액체배지희

석법 및 한천배지희석법을 표준법으로 간주하고 있고 그외 디스크확산법, E test 등이 있다[1]. 한천배지희석법은 배지제조가 번거롭고 몇 개의 균주로 시행하는 일상검사법으로는 부적합하다. 디스크확산법은 연구자마다 성적이 다양하고 디스크의 metronidazole(MTZ) 용량도 표준화 되어 있지 않고 액체배지희석법이나 한천배지희석법에 비하여 정확도나 정밀도가 떨어지나[2,3] clarithromycin(CLR)의 경우에는 디스크확산법을 사용해도 좋다는 연구보고도 있다[1]. E test는 간편하고 비교적 정확하며 최소억제농도로 나타낼 수 있어 유용하지만 가격이 비싸다[1,4,5]. 96-well microplate를 사용하는 액체배지 미량희석법은 매 검사 때마다 검사하고자 하는 여러 농도의 항균제 용액을 만들어야 하고 이 희석액 중 실제 사용하는 양은 소량이어서 대부분은 버리게 된다. 저자들은 액체배지미량희석법의 번거로움과 낭비를 줄이기 위해 항균제 희석액을 여러개의 microplate에 분주하여 한꺼번에 만든 후 냉동 보관 하였다가 사용하는 방법을 고안하게 되었다.

일반적으로 항균제 용액은 -20℃이하로 저장하면 안정적이고, -70℃이하로 저장하면 더 오래 보관할 수 있는 것으로 알려져있다[6,7]. 저장 가능 기간은 항균제마다 차이가 있으나 -15℃에서 -20℃에 보관시 대개 1개월에서 3개월 정도이고, 드물게 amikacin 같이 36개월 이상 저장이 가능한 항균제도 있다[8]. 저장하는 동안 일정한 온도가 유지되도록 해야 하며 냉동-해동과정이 반복되는 자동 서리제거 냉동고(frost-free freezer)는 피해야 한다. 액체배지 미량희석법을 간편하게 실시하도록 상품화된 제품 중에 이러한 냉동보관 가능한 tray가 있으며 이들을 표준법과 비교하였을 때 대부분의 경우 그 결과가 우수하다고 보고되었다[9,10]. 그러나 그람음성 간균 중 *Pseudomonas, Acinetobacter*, 장내세균 등 잘 자라는 균주에 대해서만 보고되어 있을 뿐이어서 이들과 사용하는 항균제의 종류도 다르고 배양조건도 까다로운 *H. pylori*에 적용하기에는 어려움이 있다.

저자들은 *H. pylori*의 항균제감수성검사에 사용되는 MTZ와 CLR 희석액을 96-well microplate에 분주한 후 -20℃에 냉동 보관하였다가 한 달 간격으로 감수성검사를 실시하여 냉동보관기간이 항균제의 역가 감소 및 항균제감수성검사 결과에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상 항균제

H. pylori 감염시 표준치료법인 삼제병합요법에 사용되는 항균제 중 MTZ(Flazyl, IV용 500mg/100ml, 한국 롱프랑로라)과 CLR(Klaricid, IV용 500mg powder, Abbott, USA)의 두 가지 항균제에 대하여 검사하였다.

Table 1. MIC(ug/ml) results of cry opreserved(-20℃) and freshly prepared metronidazole solutions for 4 strains of *H. pylori*

days	Initial	39		68		109		153		215	
Strains		P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	NG	NG
2	4	4	4	4	4	8	16	4	4	4	4
3	16	16	16	8	16	8	32	16	16	8	16
4	64	64	64	>128	>128	64	128	128	128	64	64

MIC, minimum inhibitory concentration; P, preserved; F, freshly prepared; NG, no growth

2. 실험대상 균주

환자의 검체로부터 분리하여 -70℃에 보관하고 있던 4개의 균주에 대하여 실험하였다. 동정되었을 당시 액체배지 미량희석법으로 구한 이들의 최소억제농도(minimum inhibitory concerntration, MIC)는 MTZ에 대하여 각각 1, 4, 16, 64ug/mL이었으며, CLR에 대해서는 세 균주가 0.125ug/mL 미만이었고 한 균주는 32ug/mL 이었다.

3. 방법

MTZ는 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25ug/mL이 되도록, CLR은 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ug/mL 이 되도록 증류수로 배수 희석하여 96-well microplate의 각 well에 20uL씩 분주하였다. 이들을 잘 밀봉한 후 -20℃에 저장하였다.

항균제감수성검사는 39일, 68일, 109일, 153일, 215일의 다섯 차례에 걸쳐 시행하였다. 냉동 보관 되어있던 분리주는 broth에서 증식시킨 다음 혈액한천배지에 2번 계대배양하여 3일째 된 집락을 사용하였다. 계대배양시킨 *H. pylori* 집락은 fetal bovine serum(FBS)(GibcoBRL, Life Technologies, U.S.A) 5%와 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(Sigma, St. Louis, U.S.A) 40mg/L가 든 brain heart infusion(BHI)(BBL, Becton Dikison, Cockeysville, U.S.A) 액체배지에 부유시켜 McFarland No. 2(6×10^8 CFU/mL)에 맞추었다. 보관되어 있던 96-well microplate를 상온에서 녹인 후 *H. pylori* 부유액 20uL와 BHI 액체배지 160uL씩을 각 well에 분주하여 미호기성 조건에서 37℃, 3일간 배양 후 MIC를 판정하였다[1]. 이와 동시에 매번 바로 만든 항균제용액으로 동일한 조건하에서 중복실험 하였다.

4. 평가

MIC와 내성여부에 대해 냉동보관 후 녹인 항균제용액과 바로 만든 항균제용액을 비교하였다. MIC가 ±2 $\log_2$ 희석배수 이상 차이날 때 유의한 차이가 있다고 판단하였고, MTZ는 MIC가 8ug/mL이상인 경우[11] 그리고 CLR은 2ug/mL이상인 경우[12] 내성으로 판독하였다.

결 과

1. Metronidazole

냉동보관 후 녹인 항균제용액과 바로 제조한 항균제용액의 MTZ에 대한 MIC는 39일, 68일, 109일, 153일, 215일까지 초기 MIC 결과(1ug/mL, 4ug/mL, 16ug/mL, 64 ug/mL)와 ±1 $\log_2$ 희석배수 이내로 모두 일치하였으며 시일 경과에 따른 MIC의 증가경향 즉 약효감소효과는 관찰되지 않았다. 다만 MTZ MIC가 4ug/mL이었던 균주의 109일째 바로 제조한 항균제용액의 MIC가 16ug/mL로 +2 $\log_2$배수 증가 하였으나 153일, 215일치가 4ug/mL 인 것으로 보아 105일째 검사의 재현성이 낮았던 것으로 추정된다(Table 1).

2. Clarithromycin

냉동보관 후 녹인 항균제 용액과 바로 제조한 항균제 용액의 CLR에 대한 MIC도 39일, 68일, 109일, 153일, 215일까지 초기 MIC 결과(<0.125ug/mL 세 균주, 32 ug/mL 한 균주)와 대부분 ±1 $\log_2$ 희석배수 이내로 모두 일치하였으며 시일 경과에 따른 MIC의 증가경향 즉 약효감소효과는 관찰되지 않았다. 그러나 MIC가 32 ug/mL이었던 균주에서 109일째와 153일째의 MIC가 -2 $\log_2$ 희석배수로 낮아졌고 215일째에는 양성대조군에서도 균이 자라지 않았다(Table 2).

고 찰

H. pylori 감염이 소화성 궤양의 중요한 유발인자로 밝혀지면서[13] 항균제 치료가 권장되고 있으며 현재 가장 널리 사용되는 치료법은 bismuth, MTZ, amoxicillin의 삼제병합요법(triple therapy)으로 박멸률이 91%에 이른다[14]. 그러나 MTZ 내성 균주인 경우는 박멸률이 65%로 떨어지므로 이러한 경우엔 CLR을 대신 사용할 것이 권장되고 있다[1,15]. 우리나라의 경우 한국인에게서 분리된 *H. pylori*의 MTZ 내성율이 46.2%에 이르므로 경험적으로 치료할 것이 아니라 *H. pylori*에 의한 소화기계 질환 치료 전에 *H. pylori*에 대한 항균제감수성검사를 실시하여 적절한 치료약제를 선택해야 할 것이다[1]. 그러나 CLR의 내성률은 2.2%로 낮으므로 임상분리균주에 대한 일상적인 항균제감수성검사는 필요없고 내성양상의 변화를 보기 위한 정기적인 확인검사만 필요하다고 하였다[1]. 이렇게 *H. pylori*에 대한 항균제감수성검사가 필요함에도 불구하고 항균제감수성검사 방법, 배지, 배지 첨가물, 배양기간, 배양조건 등의 여러 요인들로 항균제감수성검사를 표준화하기 어려운 특성이 있다[16]. *H. pylori*에 대한 항균제감수성검사방법으로 일반세균의 감수성 검사와 마찬가지로 액체배지희석법, 한천배지희석법, 디스크확산법, E test 등이 있으나 NCCLS에 등재된 표준법은 아직 없는 실정으로 다만 액체배지희석법과 한천배지희석법을 표준법으로 간주하고 있다[1,14]. 이중 한천배지희석법은 배지제조가 번거롭고 몇 개의 균주로 시행하는 일상검사법으로 사용하기는 부적합하다. 디스크확산법은 *H. pylori*가 성장속도가 느려 적용하기에 어려움이 있으며 디스크의 MTZ 용량도 표준화 되어 있지 않고 액체배지희석법이나 한천배지희석법에 비하여 정확도나 정밀도가 떨어진다. E test는 간편하고 비교적 정확하며 최소억제농도로 나타낼 수 있어 유용하지만 가격이 비싸 현재 한국의 의료보험수가제에서는 일상적 검사로 사용하기에는 문제가 있다[1]. 액체배지희석법은 96-well microplate를 사용하는 액체배지 미량희석법이 실용적이고 일상검사실에서 사용하기에 가장 적당하다. 저자들의 병원에서는 액체배지 미량희석법을 이용하여 3년여 *H. pylori* 항균제감수성검사를 해오고 있다. 그러나 액체배지 미량희석법은 매 검사 때마다 검사하고자 하는 여러 농도의 항균제용액을 만들어야 하고 이 희석액 중 실제 사용하는 양은 소량이어서 대부분은 버리게 된다. 저자들은 이러한 번거로움과 낭비를 줄이는 개선안을 모색하던 중 항균제 희석액을 여러개의 microplate에 분주하여 한꺼번에 만들어 냉동 보관하는 방법을 실험하게 되었다.

Table 2. MIC(ug/ml) results of cryopreserved(-20℃) and freshly prepared clarithromycin solutions for 4 strains of *H. pylori*

days / Strains	Initial	39		68		109		153		215	
		P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
1	32	16	32	16	16	4	16	4	4	NG	NG
2	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
3	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
4	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.25	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125

MIC, minimum inhibitory concentration; P, preserved; F, freshly prepared; NG, no growth

MTZ와 CLR의 MIC를 알고 있는 네 균주를 택하여 7개월에 걸쳐 5회 실험하였으나 215일째에 한 균주가 자라지 않아 MTZ와 CLR에 대해 각각 19회 시행하였다. 냉동보관 후 녹인 항균제용액과 바로 제조한 항균제용액의 MTZ와 CLR에 대한 MIC는 39일, 68일, 109일, 153일, 215일까지 초기 MIC 결과와 대부분 ± 1 $\log_2$ 희석배수 이내로 일치하였으며 시일 경과에 따른 MIC의 증가경향 즉 약효감소효과는 관찰되지 않았다.

다만 MTZ에서 MIC가 4ug/mL이었던 균주의 109일째 바로 제조한 항균제용액의 MIC가 16ug/mL로 +2 $\log_2$배수 증가 하였으나 153일, 215일치가 4ug/mL 인 것으로 보아 항균제 냉동 보관의 영향 때문이라기 보다는 105일째 검사의 재현성이 낮았던 것으로 추정되었다.

그리고 CLR 내성 균주에서 MIC가 초기엔 32ug/mL이었던 것이 냉동보관기간이 길어질수록 16, 16, 4, 4 ug/mL로 오히려 더 낮아지는 결과가 관찰되었고 바로 제조한 항균제 용액의 경우도 32, 16, 16, 4ug/mL로 비슷하였다. 마지막 실험인 215일째에 균주가 자라지 않았기 때문에 더 낮아지는지 확인해볼수는 없었다. 그러나 항균제의 능력이 냉동보관 할수록 증진된다고 보기는 어려우므로 검사간의 차이 이거나 균주의 생존력이 약화된 것으로 추정되었다.

저자들의 실험결과 MTZ와 CLR은 -20℃에서 일반적으로 알려진 항균제 저장기간인 3개월보다 긴 7개월 동안 내성결과가 변함이 없었다. 그러므로 희석액을 만들때 한꺼번에 분주하여 냉동보관하였다가 7개월이내에 사용하면 손쉽게 항균제감수성검사를 할 수 있고 결과도 믿을 수 있을 것으로 생각되었다. 이러한 방법은 *H. pylori*의 항균제감수성검사시 매번 희석액을 만드

는 번거로움과 소량만 사용하고 나머지는 버리게되는 낭비를 줄일 수 있고, 만들 때마다 조금씩 차이가 생길 수 있는 항균제농도를 일정기간 동일하게 유지할 수 있는 이점이 있다. 그러므로 한번 만들때 약 6개월 정도 사용할 분량을 미리 분주해 두었다가 냉동보관하여 사용하되 저장온도를 -20℃로 일정하게 유지하고 microplate를 잘 밀봉하여 수분의 손실로 항균액의 농도가 달라지는 일이 없도록 주의해야 할 것이다. 그리고 한번 녹인 microplate는 사용하지 않았더라도 버려야하고 다시 얼려 사용하면 안되는 것은 항균제 용액에 일반적으로 적용되는 상식과 같다.

이상을 요약하면 액체배지 미량희석법을 이용한 *H. pylori*의 항균제감수성검사시 MTZ와 CLR의 희석액을 냉동보관하는 방법은 7개월까지 MIC 판독 결과에 영향을 주지 않았다. 그러므로 항균제 희석액을 만든 후 여러개의 96-well microplate에 분주한 다음 밀봉하여 냉동보관해 두었다가 사용하면 매번 항균제 용액을 만들어야 하는 번거로움을 덜 수 있고 항균제도 절약할 수 있다고 생각되었다.

요 약

배 경 : *H. pylori*에 대한 표준 항균제감수성검사법은 NCCLS 에 수록되어 있지 않으나 액체배지 미량희석법 및 한천희석법을 표준법으로 간주하고 있다. 이중 액체배지 미량희석법의 경우 매 검사 때마다 검사하고자 하는 여러 농도의 항균제용액을 만들어야 하고 이 희석액 중 실제 사용하는 양은 소량이어서 대부분은 버리게 된다. 이러한 번거로움과 낭비를 개선하고자 항균제 용액을 96-well microplate에 분주한 후 냉동보관(-20℃)하여 사용할 수 있는지를 실험하였다.

방 법 : Metronidazole(MTZ)과 clarythromycin(CLR)의 희석액을 10개의 96-well microplate에 분주한 후 밀봉하여 냉동보관(-20℃) 하였다. 약 일개월 간격으로 5회에 걸쳐 보관균주 4균주(MTZ에 대한 최초 MIC 1, 4, 16, 64ug/mL, CLR에 대한 최초 MIC <0.125, <0.125, <0.125, 32ug/mL)에 대하여, 냉동 보관하였다가 녹인 항균제용액과 바로 만든 항균제용액으로 액체배지 미량희석법을 시행하여 이들의 결과를 비교하였다. 최소억제농도가 ± 2 $\log_2$ 희석 배수 이상 차이가 날 때 유의한 차이로 판단하였다.

결 과 : 39일, 68일, 109일, 153일, 215일간 냉동보관시킨 MTZ 용액으로 실시한 MIC와 바로 만든 MTZ 용액의 MIC는 ± 1 $\log_2$ 희석 배수 이내로 모두 일치했으며 내성판독결과도 동일하였다. 같은 기간 냉동보관시킨 CLR용액으로 실시한 MIC와 바로 만든 CLR용액의 MIC도 ± 1 $\log_2$ 희석 배수 이내로 모두 일치했으며 내성판독결과도 동일하였다.

결 론 : 액체배지 미량희석법을 이용한 *H. pylori*의 항균제 감수성 검사시 MTZ와 CLR의 희석액 냉동보관은 7개월까지 최소억제농도 판독 결과에 영향을 주지 않았다. 그러므로 항균제 희석액을 만든 후 여러개의 96-well microplate에 분주한 다음 밀봉하여 냉동보관해 두었다가 사용하면 매번 항균제용액을 만들어야 하는 번거로움을 덜 수 있고 항균제도 절약할 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. 강정옥. *Helicobacter pylori*의 항균제 감수성검사. 대한임상미생물학회지 *1998;1:1-3.*
2. Knapp CC, Ludwig MD, Washington JA. *In vitro activity of metronidazole against Helicobacter pylori as determined by agar dilution and agar diffusion. Antimicrob agents and Chemother 1991;35:1230-1*
3. Hirschl AM, Hirschl MM, Rotter mL. *Comparison of three methods for the determination of the sensitivity of Helicobacter pylori to metronidazole. J Antimicrob Chemother 1993;32:45-9.*
4. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. *Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori. J clin Microbiol 1991;29:2072-5.*
5. Piccolomini R, Bonaventura GD, Catamo G, Carbone F, Neri M. *Comparative evaluation of the E test, agar dilution and broth microdilution for testing susceptibilities of Helicobacter pylori strains to 20 antimicrobial agents. J Clin Microbiol 1997;35:1842-6.*
6. Woods GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: *dilution and disk diffusion methods. In Murray PR, ed. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington:ASM, 1995:1327-41.*
7. Antimicrobial susceptibility testing. In Koneman EW ed. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, 1997:785-856.*
8. Amsterdam D. *Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In Lorian V ed. Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. A Waverly company:Williams &Wilkins, 1996:52-111*
9. Peterson EA, Evans KD, Shigei JT, Pezzlo MT, Maza LM. *Evaluation of four anti-microbic susceptibility testing systems for gram-negative bacilli. Am J Clin Pathol 1986;86:619-23.*

10. Schieven B, Hussain Z, Lannigan R. *Comparison of American MicroScan dry and frozen microdilution trays. J Clin Microbiol 1985;22:495-6.*
11. Rautelin H, Seppala K, Renkonen O-V, Vainio U, Kosunen TU. *Role of metronidazole resistance in therapy of Helicobacter pylori infections. Antimicrob agents Chemother 1992;36:163-6.*
12. Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R, Flamm R, Evans DG, Tanaka SK et al. *Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori: Comparison of E test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. Diagn Microbiol Infect Dis 1996;24:37-41.*
13. Soll AH. Pathophysiology of peptic ulcer. *In Benenett JC, Plum F, ed. Cecil Textbook of Medicine. 20th ed. Philadelphia:W.B.Saunders, 1996:662-4.*
14. Jerris RC. Helicobacter. In Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington:ASM, 1995: 492-8.*
15. Bell GD, Powell K, Burridge SM, Pallecaros A, Jones PH, Gant PW et al. *Experience with triple anti-Helicobacter pylori eradication therapy: side effects and the importance of testing the pre-treatment bacterial isolate for metronidazole resistance. Aliment Pharmacol Ther 1992;6:427-35.*
16. Berger SA, Gorea A, Moskowitz M, Santo M, Gilat T. *Effect of inoculum size on antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:782-3.*