

실용적인 *Helicobacter pylori* 항균제감수성검사법의 확립을 위한 네 가지 검사법의 비교

강정욱^{1*}, 한동수², 최태열¹

한양대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 내과학교실²

배 경 : *Helicobacter pylori*는 배양 조건이 까다롭고 배양 기간이 길어 항균제감수성검사가 어렵다. 현재까지 개발되어있는 여러 감수성검사방법 중, 임상미생물검사실에서 일상적으로 사용할 수 있는 실용적인 *H. pylori*의 항균제감수성검사법을 찾고자 하였다.

방 법 : 소화성 궤양 환자의 위생검 조직에서 분리한 *H. pylori* 37 균주를 대상으로, amoxicillin (AMX), clarithromycin (CLR), metronidazole (MTZ)의 세 항균제에 대하여, 액체배지희석법, Mueller-Hinton 혈액한천배지(MH BAP)를 사용한 Etest, egg yolk emulsion (EYE) 배지를 사용한 Etest, EYE배지를 사용한 디스크확산법의 네 가지 항균제 감수성검사법을 실시하였다.

결 과 : AMX 내성인 균주는 발견되지 않았으며, 네 방법의 감수성 결과는 거의 일치하였다. CLR에 내성인 균주는 10.8%였으며, 네 가지 방법의 결과가 일치하였다. MTZ의 경우, 변형 액체배지희석법으로 최소억제농도가 32 mg/L 이상이었던 네 균주는 네 방법의 결과가 모두 일치하였으나, 최소억제농도가 4 mg/L 이하이었던 20균주의 경우, 감수성 category 판정에서는 모두 일치하였으나, 최소억제농도 및 억제대의 크기는 상당한 차이를 나타내었다. 변형 액체배지희석법으로 MTZ의 최소억제농도가 8 mg/L 및 16 mg/L이었던 균주의 경우, 네 방법간에 상당한 차이를 나타내었다. 그러나 Etest EYE법과 Etest MH BAP법은 100%의 category 일치율을 나타내었다.

결 론 : 임상미생물검사실에서 일상적으로 *H. pylori* 감수성검사를 시행할 경우, AMX 및 CLR의 감수성검사에는 EYE배지나 MH BAP를 사용한 디스크확산법을 사용할 수 있을 것으로 추정된다. 그러나 MTZ의 경우에는 네 가지 방법의 일치도가 좋지 않았으므로 MH BAP나 EYE배지를 사용하는 Etest법과 디스크법을 모두 사용하는 것이 바람직할 것 같다.

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 감염이 입증된 소화성 궤양의 치료에는 위산분비억제제와 항생제 병합요법이 사용되고 있으며, 일차 치료에 가장 많이 사용되는 항생제는 clarithromycin (CLR), metronidazole (MTZ), amoxicillin (AMX), tetracycline 등이다 [1]. 세계적으로 MTZ에 대한 내성률은 20~90%, CLR에 대한 내성률은 5%미만에서 50%까지 다양하게 보고되고 있으며 [2, 3], 한국의 경우에는 MTZ 내성률이 40%~60%, CLR 내성률이 2%-29%로 보고자에 따라서 다양하다 [4-6]. 항생제에 대한 내성이 증가

되면 치료 실패율이 증가되므로 항생제 치료를 시작하기 전에 감수성검사를 시행하여 감수성이 있는 약제를 선택하거나 다른 병합요법을 시도하는 것이 바람직하며, 정기적으로 *H. pylori* 항균제 내성율을 조사, 분석하여 각 나라마다 적절한 병합요법 약제를 선택해야 할 것이다.

그러나 *H. pylori*는 배양 조건이 까다롭고 배양기간도 길어서, 최근까지 항균제감수성검사에 대한 표준화된 방법이 없었고, 내성을 판정하는 기준농도도 연구자마다 달라서 내성을 비교에도 문제가 있었다 [2, 7]. 미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 1999년에 최초로 *H. pylori* 감수성검사 표준법을 제시하였고, 2000년에 처음으로 CLR에 대한 판정 기준농도를 제시하였으며 MTZ, AMX 및 그 외의 항균제에 대해서는 아직까지도 세계적으로 표준화된 판정 기준농도가 없는 실정이다 [8].

미국의 NCCLS에서 추천하는 *H. pylori* 균의 감수성검사법은 균집중액의 농도를 2.0 McFarland 탁도에 맞춘 후

접 수 일: 05/2/11 게재승인일: 05/3/7

교신저자: 강정욱

(407-701) 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 구리병원 진단검사의학교실

TEL: (031)560-2572 FAX: (031)560-2585

E-mail: jokang@hanyang.ac.kr

항생제가 포함된 Mueller Hinton 혈액한천배지 (5% 양혈액, MH BAP)를 사용하는 한천배지희석법이고, 유럽의 *H. pylori* 연구회에서 추천하는 방법은 균접종액을 4.0 McFarland 탁도에 맞춘 후 항생제가 포함된 MH BAP (10% 말혈액)를 사용하는 한천배지희석법이다[2, 9]. 그러나 한천배지희석법은 환자에게서 분리된 몇 개의 균주를 검사하기에는 매우 번거롭고 비경제적이므로 이를 변형시킨 breakpoint 한천배지희석법이 시도되기도 하였으나 이 역시 아직 상용화된 제품이 없고, 몇 개의 균주를 검사하기에는 실용성이 높지 않다[10].

현재까지의 연구보고에 의하면 *H. pylori* 균의 일상적인 항균제감수성검사에는 Etest가 가장 널리 이용되고 있으며 표준법과의 일치도가 우수한 것으로 알려져 있으나 Etest 역시 MTZ에 대해서는 일치율이 좋지 않다는 보고도 있으며 Etest strip의 가격이 비싸서 경제적으로 부담이 된다[11-13]. 항균제감수성검사법 중 경제적이면서 기술적으로도 용이하여 가장 널리 쓰이고 있는 디스크확산법은 *H. pylori*의 경우에는 정확도가 떨어지는 것으로 보고되고 있으나 감수성검사 결과는 연구자마다 다양하고 항생제에 따라서도 다르다[13-15]. 그러므로 *H. pylori* 제균요법에 가장 많이 사용되고 있는 AMX, CLR, MTZ에 대하여, 단일 균주에 대해서도 적용할 수 있고 기술적으로 용이하면서 경제적인 항균제감수성검사법의 개발이 필요한 실정이다. 연구자들은 이러한 문제점을 해결하기 위하여 변형 액체배지희석법을 개발하였으나[15] 임상 미생물검사실에서 사용하기 위한 보다 간편한 방법이 필요하다는 점을 인식하여 왔다. 이에 연구자들은 국내에서 일차 치료에 사용되는 AMX 및 CLR과 이차 치료에 사용되는 항생제 중 비교적 국내 내성율이 높은 MTZ에 대하여, 가장 가격이 저렴하고 기술적으로도 용이한 디스크확산법을 *H. pylori* 균의 항균제감수성검사에 사용할 수 있는지를 평가하고자 변형 액체배지희석법 및 Etest법과 비교하였다.

연구재료 및 방법

1. *H. pylori* 배양

한양대학교 구리병원 소화기내과를 방문한 소화성 궤양 환자에게서 위내시경으로 위생검조직 두 조각을 채취한 후 수송 배지 (20% glucose 용액이나 생리식염수)에 넣어 4시간 이내에 미생물검사실로 보내도록 했다. 위생검조직을 멸균된 공이 (micropestle)로 분쇄하여 두개의 5% 면양 혈액한천배지에 접종 시켰다. 미호기성 조건은 CampyPak Plus (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 사용하여 만들었으며 37 °C 배양기에서 3일간 배양 후 균집락을 관찰하였고, 의심되는 균집락이 관찰되지 않을 때는 3일간 더 배양하였다. *H. pylori*로 의심되는 균집락이 보이면 그람염색 하여 특징적인 만곡된

그람 음성 간균인지를 확인하였고, urease, catalase, oxidase 검사를 시행하여 양성인 경우 *H. pylori*로 확인하였으며 이번 실험에 사용된 균주는 37 균주였다.

2. 변형 액체배지희석법 (modified broth microdilution method, mBMD)

Brain heart infusion (BHI) 액체배지에 발색제 (triphenyltetrazolium)를 넣어 *H. pylori*가 소량 성장하더라도 연한 미색인 액체배지의 색이 붉은 색으로 변하도록 하여 최소억제농도를 육안으로 쉽게 판정할 수 있도록 변형시켰다[15]. 96-well microplate의 각 well에 BHI를 160 μ L 씩 넣은 후, 배수 희석 시킨 AMX, CLR, MTZ을 20 μ L 씩 가하여 AMX 와 CLR은 0.125 mg/L부터 64 mg/L까지의 농도가 되게 만들고 MTZ은 0.25 mg/L부터 128 mg/L까지 되게 하였다. 순수 계대배양 시킨 *H. pylori* 균집락을 멸균된 생리식염수에 부유시켜 McFarland No. 2에 맞춘 다음 20 μ L씩 각 well에 가했다. 37°C 배양기에서 미호기성 조건으로 3일간 배양시킨 후 최소억제농도를 판정하였다.

3. Etest

액체배지희석법과 같은 방법으로 균접종액 (McFarland No. 2)을 만든 후, 면봉으로 MH 혈액배지 (5% 면양 혈액, MH BAP)와 egg yolk emulsion (EYE) 배지(자가제조)[16]에 고루 접종 시킨 후 Etest strip을 조심스럽게 배지 위에 놓았다. 이때 사용한 Etest strip은 AMX 0.016~256 mg/L, CLR 0.016~256 mg/L, MTZ 0.016~256 mg/L (AB BIODISK, Solna, Sweden) 의 세 종류이었다. 접종 후 즉시 미호기성 용기에 넣은 후 37°C 배양기에서 3일간 배양시킨 후 제조사의 지시대로 최소억제농도를 판정하였다.

4. 디스크확산법

영국 Oxoid사에서 제조한 AMX 10 μ g, CLR 15 μ g, MTZ 5 μ g 의 세 가지 디스크를 사용하였으며, 5% 양혈액이 포함된 MH BAP (코메드사, 성남, 한국), 5% 양혈액한천배지 (BAP, 코메드사, 성남, 한국), EYE 배지를 사용하였다. 변형 액체배지희석법 및 Etest를 위하여 제조한 균부유액을 일반 디스크확산법과 같은 방식으로 고루 접종한 다음 배지 위에 세 가지 디스크를 놓았다. 접종된 배지를 미호기성 용기에 넣은 후 37°C 배양기에서 3일간 배양시킨 후 억제대의 직경을 측정하였다.

5. 정도관리 용 균주

H. pylori ATCC 43504를 사용하였으며, -70°C 냉동고에 보관된 균주는 2회 계대배양을 실시한 후 검사에 사용하였다. *H. pylori* ATCC 43504 균주의 최소억제농도 허용

Table 1. Results of the modified broth microdilution method (mBMD), disk diffusion test with egg yolk emulsion (EYE) media, Etest with EYE media, and Etest with Mueller-Hinton blood agar plate (MH BAP), tested with *Helicobacter pylori* ATCC 43504 strain

Antibiotics*	mBMD(mg/L)	Etest EYE(mg/L)	Etest MH BAP(mg/L)	Disk [†] EYE(mm)
Amoxicillin (0.016-0.12)	<0.125	0.23	<0.016	64
	<0.125	<0.016	<0.016	70
	<0.125	<0.016	<0.016	68
	<0.125	<0.016	<0.016	68
	<0.125	<0.016	<0.016	65
Clarithromycin (0.016-0.12)	<0.125	0.032	<0.016	45
	<0.125	0.023	<0.016	53
	<0.125	<0.016	<0.016	55
	<0.125	0.023	<0.016	52
	<0.125	0.023	<0.016	53
Metronidazole (64-256)	>128	256	64	6
	>128	256	94	6
	>128	256	64	6
	>128	256	256	6
	>128	256	256	6

*(); NCCLS acceptable ranges in mg/L.

[†]; the antibiotic disk potencies were 10 μ g of amoxicillin, 15 μ g of clarithromycin, and 5 μ g of metronidazole. The numbers denote the diameter of the inhibition zone.

범위는 AMX 0.016~0.12 mg/L, CLR 0.016~0.12 mg/L, MTZ 64~256 mg/L이다.

결 과

1. *H. pylori* 표준 균주 ATCC 43504

AMX, CLR, MTZ의 세 항균제에 대하여, 변형 액체배지미량회석법, EYE배지와 MH BAP배지를 사용한 Etest 방법으로 최소억제농도를 5회 반복 검사한 결과, 모든 결과가 각 항균제에 대한 표준 균주의 허용범위 내에 들었다. AMX 및 CLR의 최소억제농도는 변형 액체배지미량회석법, Etest EYE, Etest MH BAP 세 방법의 결과가 거의 일치하였으며, MTZ의 경우에는 Etest MH BAP법에 의한 최소억제농도가 약간 낮게 나타났으나 허용범위 내에 들었다. EYE배지를 사용한 디스크확산법의 경우, AMX 억제대의 직경은 평균 67.0 mm, CLR 억제대의 직경은 평균 51.6 mm로 상당히 컸으며, MTZ의 경우 억제대가 전혀 생기지 않아 최소억제농도법과 일치되는 감수성 결과를 나타내었다 (Table 1).

2. 임상 균주의 AMX 결과

소화성 궤양 환자에게서 분리된 *H. pylori* 37균주를 대상으로, 상기한 네 가지 방법으로 AMX에 대하여 항균제

감수성검사를 실시한 결과, AMX에 내성인 균주는 없었으며, 최소억제농도는 0.125 미만에서부터 0.5 mg/L까지였다. AMX의 내성기준농도를 1.0 mg/L로 하면, 37균주 모두 감수성이었다. 변형 액체배지미량회석법, Etest EYE, Etest MH BAP 세 방법의 결과가 거의 일치하였으며 디스크확산법의 억제대 직경은 평균 61.3 mm (\pm 10.3 mm)로 상당히 큰 편이었다 (Table 2).

3. 임상 균주의 CLR 결과

상기한 *H. pylori* 37균주를 대상으로, 네 가지 방법으로 CLR에 대하여 항균제감수성검사를 실시한 결과, 4균주 (10.8%)가 CLR에 내성 (최소억제농도 1 mg/L 이상)을 나타내었다. CLR에 감수성이었던 33 균주 (최소억제농도 1 mg/L이하)의 경우, 네 가지 방법의 결과가 모두 일치하였으며, CLR에 내성이었던 네 균주의 경우에도 네 가지 방법 모두 내성 결과를 나타내었다. 감수성인 균주의 디스크확산법 억제대 직경은 평균 46.6 mm (\pm 8.0 mm)로 상당히 큰 편이었으며, 내성인 네 균주는 억제대가 전혀 생기지 않았다 (Table 3).

4. 임상 균주의 MTZ 결과

상기한 *H. pylori* 37균주를 대상으로, 네 가지 방법으로 MTZ에 대하여 항균제감수성검사를 실시한 결과, 변형

Table 2. Antimicrobial susceptibility results of amoxicillin

Strain No.	mBMD (mg/L)	Etest EYE (mg/L)	Etest MH-BAP (mg/L)	Disk EYE (mm)
2001-24	<0.125	<0.016	<0.016	74
2001-81	<0.125	0.19	0.125	41
2001-85	<0.125	0.023	<0.016	53
2002-14	<0.125	<0.016	<0.016	77
2002-26	<0.125	<0.016	<0.016	70
2003-40	<0.125	<0.016	<0.016	74
2003-41	<0.125	<0.016	<0.016	78
2003-42	<0.125	0.016	<0.016	61
1997-1122	0.125	0.047	<0.016	42
2001-128	0.125	<0.016	<0.016	59
2001-45	0.125	<0.016	<0.016	60
2001-49	0.125	<0.016	<0.016	63
2001-67	0.125	<0.016	<0.016	77
2001-77	0.125	<0.016	<0.016	78
2001-80	0.125	0.016	<0.016	42
2001-90	0.125	0.032	<0.016	48
2001-94	0.125	<0.016	<0.016	55
2002-003	0.125	0.016	<0.016	56
2002-009	0.125	<0.016	<0.016	70
2002-15	0.125	<0.016	0.016	64
2002-28	0.125	0.032	0.016	52
2002-49	0.125	<0.016	<0.016	70
2002-57	0.125	<0.016	<0.016	70
2003-004	0.125	<0.016	<0.016	62
2003-15	0.125	<0.016	<0.016	65
2003-29	0.125	<0.016	<0.016	68
2003-32	0.125	0.023	0.023	48
2001-145	0.25	<0.016	<0.016	65
2001-60	0.25	<0.016	<0.016	60
2001-64	0.25	<0.016	<0.016	60
2002-35	0.25	0.016	<0.016	58
2002-43	0.25	<0.016	<0.016	66
2001-133	0.5	<0.016	<0.016	66
2001-82	0.5	<0.016	<0.016	55
2002-42	0.5	<0.016	<0.016	60
2002-48	0.5	0.023	<0.016	48
2002-50	0.5	0.016	<0.016	54

액체배지미량회석법으로 최소억제농도가 32 mg/L이상이었던 네 균주의 경우 네 가지 방법의 결과가 모두 일치하였다. 최소억제농도가 4 mg/L이하로 MTZ 감수성이었던 20균주의 경우, 감수성 category 판정에서는 모두 감수성으로 일치하였으나 최소억제농도 결과는 상당한 불일치를 나타내었다. 변형 액체배지미량회석법으로 최소억제농도가 8 mg/L이었던 네 균주 및 16 mg/L이었던 네 균

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of clarithromycin

Strain No.	mBMD (mg/L)	Etest EYE (mg/L)	Etest MH-BAP (mg/L)	Disk EYE (mm)
2001-60	<0.125	<0.016	<0.016	63
2001-64	<0.125	0.064	<0.016	46
2001-67	<0.125	0.064	<0.016	40
2002-14	<0.125	0.047	0.016	51
2002-26	<0.125	<0.016	<0.016	40
2003-40	<0.125	0.016	<0.016	55
2003-41	<0.125	0.016	<0.016	61
2003-42	<0.125	0.016	<0.016	55
1997-1122	0.125	0.016	<0.016	52
2001-128	0.125	0.032	<0.016	41
2001-133	0.125	0.032	<0.016	42
2001-145	0.125	0.094	<0.016	44
2001-24	0.125	0.094	0.016	52
2001-45	0.125	<0.016	<0.016	63
2001-49	0.125	0.023	<0.016	60
2001-80	0.125	0.094	0.032	31
2001-81	0.125	0.125	0.032	44
2001-82	0.125	0.047	<0.016	42
2001-90	0.125	0.047	<0.016	39
2001-94	0.125	0.064	<0.016	34
2002-003	0.125	0.016	<0.016	48
2002-009	0.125	0.047	<0.016	48
2002-15	0.125	0.047	0.016	47
2002-28	0.125	0.047	0.016	40
2002-42	0.125	0.125	0.016	45
2002-43	0.125	0.094	0.016	51
2002-48	0.125	0.032	<0.016	39
2002-49	0.125	0.023	0.016	52
2003-004	0.125	0.064	<0.016	46
2003-15	0.125	0.256	<0.016	45
2003-29	0.125	0.094	<0.016	41
2001-77	0.25	0.032	0.016	44
2001-85	0.25	0.064	<0.016	37
2002-35	16	256	64	6
2002-57	16	256	64	6
2002-50	16	256	64	6
2003-32	64	64	32	6

주의 경우, 네 방법간에 상당한 차이를 나타내었다. 그러나 Etest EYE법과 Etest MH BAP법은 100%의 category 일치율을 나타내었다 (Table 4).

고 찰

*H. pylori*의 일차 제균요법에 사용되는 AMX, CLR,

Table 4. Antimicrobial susceptibility results of metronidazole

Strain No.	mBMD (mg/L)	Etest EYE (mg/L)	Etest MH-BAP (mg/L)	Disk EYE (mm)
1997-1122	0.25	<0.016	<0.016	42
2001-60	0.25	<0.016	0.125	49
2001-64	1	0.75	0.023	19
2001-94	1	0.25	0.016	20
2002-42	1	0.38	0.125	26
2002-43	1	0.25	0.125	30
2001-145	2	0.38	0.064	23
2001-45	2	0.016	0.125	49
2001-49	2	0.047	0.032	40
2002-28	2	0.75	0.125	19
2002-35	2	1	0.19	25
2002-50	2	0.19	0.094	26
2001-77	4	0.19	0.094	33
2001-90	4	0.5	0.047	17
2002-49	4	6	0.64	20
2002-57	4	0.5	0.047	16
2003-29	4	0.125	0.125	19
2003-40	4	0.047	<0.016	35
2003-41	4	0.047	0.016	34
2002-26	4	0.38	0.064	20
2001-133	8	0.25	0.016	22
2001-24	8	0.50	0.023	23
2001-80	8	0.50	0.125	20
2001-81	8	4	1.5	25
2001-85	8	0.5	0.023	20
2002-14	8	4	1.5	23
2002-15	8	0.5	0.064	28
2002-48	8	0.38	0.094	18
2003-42	8	0.5	0.5	30
2001-82	16	4	0.5	6
2002-003	16	0.125	0.016	17
2003-15	16	0.5	0.094	28
2003-32	16	0.25	0.094	21
2001-128	32	>256	>256	6
2001-67	32	>256	>256	6
2002-009	32	64	64	6
2003-004	64	>256	64	6

MTZ에 대하여 내성이면 소화성 궤양의 치료 성공률이 상당히 낮아지므로, *H. pylori*가 검출되는 소화성 궤양 환자를 치료하는 임상 의사들은 이 세 항균제에 대한 감수성검사를 임상미생물검사실에서 일상적으로 해 주기를 요청하고 있다. 그러나 임상미생물검사실에서 환자에게서 분리된 몇 개의 균주를 대상으로 사용할 수 있는 표준화된 실용적인 감수성검사법이 없고, CLR이외에는 내성 기준치도 표준화되어 있지 않은 상황이므로 *H. pylori*의

항균제감수성검사를 일상적으로 해 주기는 어려운 현실이다. 연구자는 *H. pylori* 균의 실용적인 항생제감수성검사법을 개발하기 위하여 수년 전부터 연구를 수행해 왔으나[15], 성장이 매우 까다로운 *H. pylori* 균을 대상으로 실용적인 감수성검사법을 찾아내는 것이 쉽지 않았다. 일차 치료에 사용되는 세 가지 항생제 중, MTZ 감수성 검사가 특히 어려웠으며 많은 연구자들의 연구 보고에서도 이 약제에 대한 감수성검사 결과는 표준법과 일치율이 좋지 않은 편이었다[13, 15]. 이번 연구에서는 구입하기 쉬운, 상품화되어있는 MH BAP를 사용하여 Etest 및 디스크확산법을 사용할 수 있는지 평가하고자 하였고, 이를 보다 영양분이 풍부하여 *H. pylori* 균이 잘 자라고 성장여부를 배지의 색깔 변화를 통하여 쉽게 알 수 있는 EYE배지를 사용한 결과와 비교하였다. 또한 같은 배지를 사용하여 CLR과 AMX에 대하여 우수한 일치율을 보여주는 디스크확산법을 Etest법과 비교하였다.

*H. pylori*균은 액체배지에서 배양하기가 어려우므로 액체배지회석법은 감수성검사법으로 추천되지 않고 있으나 fetal calf serum을 첨가한 Brucella 액체배지나 MH 액체배지를 사용한 액체배지회석법의 결과는, AMX과 CLR의 경우 Etest법의 최소억제농도와 일치도가 매우 높다고 보고되었다[13, 15]. 그러나 MTZ의 경우에는 Etest법과의 일치도가 낮고 major error가 허용기준 내에 들지 못하므로 표준법이나 일상적인 감수성 검사법으로 사용하기 어려운 것으로 보고되었다[13]. 이번 연구에서도 AMX와 CLR의 경우에는 변형액체배지회석법과, Etest EYE, Etest MH BAP, 디스크확산법의 네 결과가 감수성 카테고리 판정에서는 100% 일치하였다. 그러나 AMX의 경우 37균주 모두 감수성인 균주였고, CLR의 경우에는 감수성인 균주 33균주와 내성인 4균주의 최소억제농도가 큰 차이가 있었으므로 일치도가 100%로 높았던 것으로 생각된다(Table 2, 3). 향후 AMX 및 CLR의 최소억제농도가 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 등인 균주들이 수집되면 이번 연구에 사용된 네 방법을 다시 평가해야 할 것으로 판단된다.

디스크확산법은 기술적으로 가장 쉽고 경제적인 감수성검사법이나, *H. pylori*와 같이 배양에 24 시간 이상이 필요한 경우에는, 디스크에서 항생제가 확산되어 나오는 양상이 불안정하여 이 방법을 사용하기 어렵다. *H. pylori*의 경우에도 디스크확산법은 정확도가 떨어진다는 보고가 많으나, 항생제에 따라서 그 결과가 다양하며, 디스크 확산법에 사용된 항생제 디스크의 역가 및 배지 등도 연구자마다 다르다[2, 13, 14]. 이번 연구에 사용된 항생제 디스크의 역가는 AMX 10 µg, CLR 15 µg, MTZ 5 µg이었는데, 표준균주의 AMX 억제대 직경은 평균 67.0 mm, CLR의 억제대 직경은 평균 51.6 mm로 상당히 큰 편이었다.

AMX의 경우 *H. pylori*에 대한 표준화된 내성 판정 최소억제농도 기준이 없으며 대부분의 균주들의 최소억제농도가 0.03 mg/L 미만으로 매우 낮다. 최소억제농도가

0.25~0.5 mg/L인 균주도 드물게 발견되나 치료 결과에는 별다른 차이가 없었다고 한다[2]. 그러므로 검사간 오차를 고려하여 내성 기준을 1 mg/L로 할 경우, 환자에게서 분리된 37 균주 중 내성인 균주는 없었고, 따라서 디스크법의 내성 기준 직경을 결정할 수 없었으며 세계적으로도 AMX 내성 균주는 드물므로 내성을 판정하는 최소억제농도를 정하기는 상당 기간 어려울 것 같다. Hachem 등 [13]은 CLR 15 µg 디스크 및 MH BAP를 사용하여 디스크확산법으로 감수성검사를 시행하여 억제대의 직경이 18 mm 미만인 경우 내성으로 판정하였는데, 이번 연구에서는 CLR의 최소억제농도가 0.5, 1, 2 mg/L 인 균주가 분리되지 않아서 CLR의 디스크확산법에서도 내성을 판정할 수 있는 억제대 크기를 결정할 수 없었다. 환자에게서 분리된 37 균주 중 CLR 내성균은 10.8%였으며 내성과 감수성 결과는 네 가지 방법 모두 100% 일치하였다. 내성인 네 균주 모두 최소억제농도가 16 mg/L 이상이었으며, 디스크의 억제대는 전혀 생기지 않았다.

MTX의 경우에는 환자에게서 분리된 37균주 중, 최소억제농도가 32 mg/L 이상이었던 네 균주 외에는 네 가지 감수성검사법의 일치도가 낮았고, 디스크 확산법의 억제대 크기도 최소억제농도와 상관없이 다양하였다(table 4). MTZ 디스크법을 연구하였던 김 등이 제시한 억제대 직경 15 mm미만을 내성으로 판정하면, 최소억제농도가 4 mg/L 이하인 감수성 균주의 Etest와 디스크법의 카테고리 일치도는 100%였으나, Etest EYE와 Etest MH BAP의 최소억제농도는 상당히 차이가 있었다. 변형 액체배지회석법으로 최소억제농도가 8 mg/L이었던 아홉 균주의 경우에는 변형액체배지회석법과 Etest의 최소억제농도에 상당한 차이가 있었으며 디스크법으로는 모두 감수성이었다. 변형액체배지회석법으로 최소억제농도가 16 mg/L이었던 네 균주의 경우에도 네 방법이 모두 일치하지 않았으며 균주 2001-82의 경우, 변형액체배지회석법과 디스크확산법은 내성 카테고리로 일치하였고, 나머지 세 균주는 Etest와 디스크법이 감수성 카테고리로 일치하였다. MTX의 경우, 최소억제농도가 32 mg/L이상인 고농도 내성균 및 최소억제농도가 4 mg/L이하인 감수성 균인 경우에는 네 방법의 카테고리 일치도가 우수하였으나, 최소억제농도가 8 및 16 mg/L인 균주에서는 MTZ의 감수성 검사에 신뢰할 만한 방법을 찾지 못하였다. Hachem 등도 MTZ의 최소억제농도가 16 mg/L인 경우에는 다른 방법으로 확인 검사를 할 필요가 있다고 하였다[13]. 그러므로 MTZ의 감수성검사는 현재로서는 Etest와 디스크확산법의 두 가지 방법을 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단되며 내성기준농도를 8 mg/L로 정하는 것 보다는 8~16 mg/L를 중간내성으로 판정하는 것이 보다 유연한 판정 기준이 될 것으로 생각된다. 또한 일차치료에 실패하여 MTZ을 사용하는 이차 치료를 받는 환자를 대상으로 MTZ에 중간 내성인 환자의 치료 실패율과 32 mg/L 이상인 환자들의 치료 실패율에 차이가 있는지에 대한 임상

적인 연구가 필요할 것이다. MTZ의 항균제감수성검사를 위하여 Etest만을 사용하기보다 디스크법을 중복하여 사용하도록 권장하는 이유는 첫째, *H. pylori* 균의 성장이 밝혀지지 않은 여러 변수에 의하여 많은 영향을 받을 수 있고 둘째, CLR 및 AMX와는 달리 MTZ의 항균제감수성검사 결과가 연구자에 따라 다르므로[17-19], 한 가지 방법 보다는 제 2의 방법을 동시에 사용하는 것이 검사의 신뢰도를 보다 높일 수 있을 것이다.

이번 연구에서 항균제감수성검사의 정도관리를 위하여 사용된 ATCC 43504 균주의 경우, AMX, CLR, MTZ에 대하여, 네 가지 항균제감수성검사법으로 5회 반복 검사한 결과, 모든 결과가 각 항균제에 대한 표준 균주의 허용범위 내에 들었다. MTZ의 경우에는 Etest MH BAP법에 의한 최소억제농도가 약간 낮게 나타났으나 허용범위 내에 들었다. 디스크법의 경우, AMX 억제대의 직경은 평균 67.0 mm, CLR 억제대의 직경은 평균 51.6 mm로 상당히 컸으므로, 이번 실험에 사용된 AMX 10 µg 대신 2 µg 디스크를, CLR 15 µg 대신 5 µg 디스크를 사용하는 실험을 다시 하여, 보다 적절한 크기의 억제대를 알아 볼 필요가 있을 것 같다. 표준 균주를 사용하여 반복 시행한 *H. pylori* 균의 항균제감수성검사 결과는 항균제감수성검사법의 평가에는 별다른 도움이 되지 않는다고 생각된다. 향후 AMX 및 CLR에 보다 다양한 최소억제농도를 가진 균주들이 수집되면 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1994; 272:65-9.
2. Megraud F, Stuart H, Glupczynski Y. Antibiotic susceptibility and resistance. In: Mobley HLT, Mendz GL, and Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. Washington, DC: ASM press, 2001;511-30.
3. Boyanova L, Mentis A, Gubina M, Rozynek E, Gosciniak G, Kalenic S, et al. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. Clin Microbiol Infect 2002;8:388-96.
4. Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JG, El-Zaatari FA, Osato MS, et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2001;47:459-61.
5. Lee DH. Current status and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Korea. Korean J Gastroenterol 2002;39: 153-60.
6. Nam SW, Roe IH, Kim SB, Lee BS, Hwang YJ, Park HJ, et al. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. Kor J Gastroenterol

- 2000;36:450-6.
7. Kang JO. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*. J Korean Soc Chemother 2002;18:289-98.
 8. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 14th Informational Supplement for NCCLS document M7-A6. 2004;24(1): M100-S14 p127.
 9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 14th Informational Supplement for NCCLS document M7-A6. 2004;24(1): M100-S14 p133.
 10. Boyanova L. Comparative evaluation of two methods for testing metronidazole susceptibility of *Helicobacter pylori* in routine practice. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35:33-6.
 11. Piccolomini R, Di 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Midolo PD, Turnidge J, Lambert JR, Bell JM. Validation of a modified Kirby-Bauer disk diffusion method for metronidazole susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Diagn Microbiol Infect Dis 1995;21:135-40.
 15. Kim ES, Kang JO, Han DS, Park PW, Park IK, Choi TY. Comparison of modified broth microdilution method, E test, and disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Korean J Clin Pathol 1998;18:559-64.
 16. Westblom TU, Madan E, Midkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1991;29:819-21.
 17. DeCross AJ, Marshall BJ, McCallum RW, Hoffman SR, Barrett LJ, Guerrant RL. Metronidazole susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: Comparison of disk, broth, and agar dilution methods and their clinical relevance. J Clin Microbiol 1993;31:1971-4.
 18. 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.
 19. Henriksen TH, Brorson O, Schoyen R, Thoresen T, Lia A. A simple method for determining metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1997;35: 1424-6.

Evaluation of Four Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* in Routine Practice

Jung Oak Kang^{1*}, Dongsoo Han², and Tae Yeal Choi¹

Departments of Laboratory Medicine¹, and Internal Medicine², College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background: We compared currently available four antimicrobial susceptibility test methods for *H. pylori* to find out a practical method suitable for testing a few strains of *H. pylori* at a time in the clinical microbiology laboratory.

Methods: With 37 clinical isolates of *H. pylori*, antimicrobial susceptibility tests were performed against amoxicillin (AMX), clarithromycin (CLR), and metronidazole (MTZ) using disk diffusion method with egg yolk emulsion (EYE) media, E test with EYE and Mueller Hinton blood agar plate (MH BAP), and modified broth microdilution methods (mBMD).

Results: The results of AMX and CLR showed a complete agreement between the four methods. For MTZ, however, a significant discrepancy was observed between the results obtained by the four methods. In four strains exhibiting high minimal inhibitory concentrations (MIC, ≥ 32 mg/L) to MTZ, category agreement was excellent, but correlation was not good in 13 strains with the MTZ MICs of 8 to 16 mg/L. In 20 strains with MTZ MICs between 0.25 mg/L and 4 mg/L, category agreement was excellent, but correlation between MICs or inhibitory zone diameters was not good. Etest EYE and Etest MH BAP methods showed a 100% agreement in the susceptibility category of MTZ.

Conclusion: In routine practice, the most practical method for testing susceptibility of *H. pylori* to AMX and CLR seems to be the disk diffusion method with EYE or MH BAP. But for MTZ, a duplicate test using both Etest and disk diffusion test is recommended until more standardized, economical, and technically easier test methods become available. (*Korean J Clin Microbiol* 2005;8(1):82-89)

Keywords: *Helicobacter pylori*, Antimicrobial susceptibility test, Modified broth microdilution, E test, Disk diffusion, Amoxicillin, Clarithromycin, Metronidazole

Address reprint requests to : Jung Oak Kang, M.D., Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Guri Hospital, 249-1 Gyonun-Dong, Guri-si, Gyeonggi-do 407-701, Korea.
Tel. 82-31-560-2572 Fax. 82-31-560-2585 E-mail: jokang@hanyang.ac.kr