

## *Bacteroides fragilis* group 세균의 항균제 감수성 성적에 대한 Wilkins-Chalgren agar 사용의 영향

연세대학교 의과대학 임상병리과학교실, 백구은 의과대학 제 3 의학부 검험과\*

신혜정·서설송\*·이종욱·이경원·정윤섭·권오현

= Abstract =

### Effect on The Susceptibilities of *Bacteroides fragilis* Group Organisms by The Use of Wilkins-Chalgren Agar

Hea Jung Shin, Xue-Song Xu\*, Jongwook Lee,  
Kyungwon Lee, Yunsop Chong and Oh Hun Kwon

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea;

Department of Clinical Pathology, Norman Bethune University of Medical  
Science, Changchun, China\*

**Background :** Anaerobic bacteria are increasingly being recognized as clinically significant. *Bacteroides fragilis* group (BFG) organisms are the most frequently isolated anaerobes. A significant increase in resistance to antimicrobial agents among these organisms has been reported in worldwide as well as in Korea. Several media and methods for susceptibility testing of anaerobes have been published. This study was to determine the effect of media on the susceptibilities of BFG organisms.

**Methods :** Nonduplicate clinical isolates of 60 BFG organisms were collected during 1994 at Severance Hospital. Species identification was performed by ATB system or conventional methods. Antimicrobial susceptibility was tested by an agar dilution method using Wilkins-Chalgren agar and brucella agar supplemented with vitamin K<sub>1</sub> and 5% laked sheep blood (BBA).

**Results :** The MICs of all of the antimicrobial agents were slightly higher by BBA

교신저자 : 신혜정, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 임상병리과학교실(전화 : 02-361-6495)  
본 연구는 연세대학교 의과대학 1996년도 과별프로젝트 연구비에 의하여 이루어졌다.

— 신혜정 외 : *Bacteroides fragilis* group의 항균제 감수성에 대한 Wilkins-Chalgren agar의 영향 —

than by Wilkins-Chalgren agar. Except for metronidazole, 98% or more of the results were within two log<sub>2</sub> dilution. However, no significant difference was noted in resistance rate.

Conclusions : Wilkins-Chalgren agar is less expensive and simpler to prepare than BBA with comparable results for the antimicrobial susceptibility testing of BFG organisms.

Key Words : *Bacteroides fragilis*, Antimicrobial susceptibility, Anaerobe, Wilkins-Chalgren agar

## 서 론

혐기성세균은 인체 여러 부위에 상재균으로서 다수 존재하고 심한 감염의 혼란 원인이 되기도 한다. 그 중 *Bacteroides fragilis* group (BFG) 세균은 가장 중요한 혐기성 그람음성 간균으로서 임상검체에서 흔히 분리된다[1,2]. 근래 이 세균 중에는 내성균주가 증가하고 있고[3,4], 그 내성 양상은 지역에 따라 다름이 보고되었다[5-8]. 우리나라에서도 내성균주가 혼합이 이미 보고된 바 있다[9,10]. 그러므로 혐기성세균의 감수성을 정기적으로 시험하는 것은 혐기성세균 감염증 치료시 경험적인 항균제 선택에 있어서 매우 중요한 일이라고 하겠다.

혐기성 세균에 대한 항균제 감수성 시험에는 여러가지 방법이 이용되어 왔는데[11], 1993년 NCCLS[12]는 감수성시험 방법으로서 한천희석법, 액체배지희석법, 액체배지 미량희석법 등을, 기초 배지로는 한천희석법에는 Wilkins-Chalgren 배지와 brucella 배지를, 액체배지 희석법에는 Schaedler, West-Wilkins, brain-heart infusion 등의 액체배지를 사용하도록, 균종의 증식능에 따라 면양혈액, vitamin, hemin 등의 첨가물을 넣도록 권장하였다.

세브란스 병원에서는 BFG 세균에 대한 감수성 시험을 위한 배지로서 5% 용혈 면양혈액과 vitamin K<sub>1</sub>을 넣은 brucella 배지를 사용하여 왔다. 그러나 BFG 군 세균이나 *Clostridium* spp.는 혈액 등의 첨가물 없이도 증식이 잘 되므로 감수성시험에 있어서 혈액이 없는 배지도 사용할 수 있다고 하겠다. 그러나 항균제 감수성 결과는 시험방법, 사용배지 등에 따라 차이가 있는데[11], 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 없다. 따라서 이 연구에서는 기존에 사용하던 면양혈액을 넣은 brucella 배지와 면양혈액을 넣지 않은 Wilkins-Chalgren 배지

에서 BFG 세균에 대한 항균제 감수성을 한천희석법으로 시험하여, 그 결과에 대한 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

1994년 세브란스병원 환자의 각종 임상 검체에서 분리된 BFG 세균 중 일부를 대상으로 시험하였다. 분리된 세균은 ATB 32A (API System SA, Montalieu, France)로 동정하였고 균종에 따라서는 전통적인 생화학적 동정 방법을 이용하였다[13, 14]. 시험세균은 총 60주이었고, 이 중 *B. fragilis* 가 45주, *B. thetaiotaomicron* 6주, *B. uniformis* 5주, *B. ovatus* 2주, *B. vulgatus* 1주, *B. distasonis* 1주이었다.

시험항균제는 ampicillin(종근당), ampicillin/sul-bactam(한국 Pfizer), piperacillin(유한), cefotaxime(한독), cefotetan(Yamanouchi, Tokyo, Japan), cefoxitin(한국 중외), imipenem(Merck Sharp & Dohme, West Point, Pa, U.S.A.), clindamycin(한국 Upjohn), tetracycline(종근당), chloramphenicol(종근당), metronidazole(근화)로 총 11종이었다.

배지는 Wilkins-Chalgren 배지 (Difco)와 vitamin K<sub>1</sub> (10 µg/mL)과 5% 용혈 면양혈액이 첨가된 brucella 배지 (BBA, BBL)를 사용하였다. 시험 세균은 vitamin K<sub>1</sub>과 hemin이 첨가된 thioglycollate medium에 접종하여 McFarland nephelometer의 제 0.5관 탁도에 맞추어 Steers replicator를 이용하여 10<sup>5</sup> CFU를 접종하였다. 접종한 배지는 혐기성 상자 (Forma Scientific Co., Marietta, OH, U.S.A.) 속의 35°C 항온기에서 48시간 배양한 후 판독하였다. 항균제의 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)는 항균제를 넣지 않은 대조 배지에서의 증식보다 현저히 억제된 증식을 보인 배지의 항균제 농도로 하였고, 이 경우 여러개의 독립

Table 1. Comparison of antimicrobial activities against the *Bacteroides fragilis* group organism depending on the use of brucella blood agar and Wilkins-Chalgren agar

Antimicrobial agent	Media*	Range	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Susceptibility (%)**			
			50%	90%	S	I	R	ME
Ampicillin/sulbactam		>128	0	3.3	96.7	5.0		
		>128	1.7	1.7	96.7			
		8	93.3	3.3	3.3	1.7		
Piperacillin		4	93.3	5.0	1.7			
		256	80.0	1.7	18.3	6.7		
		128	78.3	8.3	13.3			
Cefotaxime		128	28.3	25.0	46.7			
		128	46.7	21.7	31.7			
		128	70.0	6.7	23.3	11.7		
Cefotetan		64	70.0	18.3	11.7			
		32	76.7	23.3	0	8.3		
		32	78.3	21.7	0			
Imipenem		0.5	98.3	1.7	0	1.7		
		0.5	100.0	0	0			
Clindamycin		>256	55.0	8.3	36.7			
		>256	56.7	6.7	36.7			
		>128	10.0	0	90.0	1.7		
Tetracycline		64	10.0	1.7	88.3			
		8	98.3	1.7	0	1.7		
		8	100.0	0	0			
Chloramphenicol		4	100.0	0	0	0		
		2	100.0	0	0			
Metronidazole								

\* BRU, brucella blood agar with 5% sheep blood and vitamin K<sub>1</sub>; W-C, Wilkins-Chalgren agar without 5% sheep blood.

\*\* S, Susceptible; I, intermediate; R, resistant; ME, minor error.

된 접락이나 아주 얇은 접락도 무시하였다. 감수성 시험의 정도관리를 위해서는 *B. fragilis* ATCC 25285와 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741을 사용하였다. MIC는 NCCLS[12]의 breakpoint에 따라 해석하였다.

두 배지에서 시험한 결과는 MIC 값, 즉 MIC 범위, MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, 감수성, MIC의 log<sub>2</sub> 값의 차이를 비교하여 분석하였다.

## 결 과

BBA와 Wilkins-Chalgren 배지에서 시험한 각 항균제의 MIC를 비교해 보면 Table 1과 같다. Ampicillin/sulbactam, tetracycline 및 metronidazole

의 MIC 범위, MIC<sub>50</sub> 및 MIC<sub>90</sub>, ampicillin과 chloramphenicol의 MIC 범위와 MIC<sub>50</sub>, cefotetan의 MIC 범위와 MIC<sub>90</sub>, imipenem의 MIC 범위 및 piperacillin의 MIC<sub>90</sub>가 BBA에서 시험한 것이 Wilkins-Chalgren 배지에서 시험한 값보다 2~4배 높았다. 반면에 cefoxitin의 MIC 범위와 MIC<sub>50</sub>과 cefotaxime의 MIC 범위는 Wilkins-Chalgren 배지에서 시험한 것이 2배 높았고, clindamycin은 차이가 없었다.

Ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefotaxime, cefotetan 및 tetracycline 내성균주의 비율은 BBA에서 시험한 경우 높았고, 그 밖의 항균제는 차이가 없었다.

감수성 해석 결과를 비교해 보면, 모든 약제에 대하여 major discrepancy를 보인 예는 없었고, minor

—신혜정 외 : *Bacteroides fragilis* group의 항균제 감수성에 대한 Wilkins-Chalgren agar의 영향—

Table 2. Difference between brucella blood agar and Wilkins-Chalgren agar in testing susceptibility of the *B. fragilis* group organisms

Antimicrobial agent	No. of strain with							Percentage within: ±2 dilution
	<-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	
Ampicillin		4	32					
Ampicillin/sulbactam		1	32					
Piperacillin		2	37					
Cefotaxime		9	20					
Cefotetan		14	33					
Cefoxitin		15	41					
Imipenem		0	24					
Clindamycin		3	33					
Tetracycline		0	8					
Chloramphenicol		0	27					
Metronidazole		1	1					
Total	49	288						

\* $\log_2$  values which were subtracted MICs( $\log_2$ ) of Wilkins-chalgren agar from that of brucella blood agar.

discrepancy를 보인 예는 0-33.3%였다. Metronidazole 감수성은 모두 일치하였고, ampicillin/sulbactam, imipenem, tetracycline 및 chloramphenicol 감수성에 있어서는 1주만이 불일치를 보였으나, cefotaxime 감수성에 있어서는 20주 (33.3%)가 불일치를 보였다(Table 1).

두 배지에서 시험한 MIC의  $\log_2$  값의 차이를 비교하였다(Table 2). 두 배지에서 결과가 일치했던 경우는 288예 (44%)였고, 1 회석배수 범위에 든 경우가 601예로 91%였으며, 2 회석배수 범위에 든 경우는 651예로 99%였다. 두 배지에서 시험한 MIC에 차이가 많았던 경우는 metronidazole로 2 회석배수 범위 이상의 차이가 있었던 경우가 34예였고, 그 다음으로는 tetracycline의 MIC가 차이가 많았다.

## 고 찰

첨기성세균에 대한 항균제 감수성시험에는 여러 가지 방법이 이용되고 있으나[11,15-17], 방법에 따라 감수성 결과에 차이가 있을 수 있다. 즉, 시험 항균제에 따라 정도의 차이는 있으나, 한천회석법에 의한 MIC는 액체배지 회석법에 의한 MIC보다 2배 정도 높고[12,18,19], 한천회석법에 있어서는 혈액을 첨가한 배지에서 시험한 MIC는 첨가하

지 않은 배지에서의 MIC보다 2배 정도 높을 수 있다고 하였다[12]. 혈액을 첨가한 배지에서 시험한 MIC가 높은 이유는 혈액이 첨가성세균의 증식을 촉진하고[12], 다른 한편으로는 혈액에 있는 단백질이 시험 항균제와 결합하여 항균력을 저하시킬 수 있는 것이 원인일 수 있다[20]. 한편 두 배지의 감수성 결과 중 어느 것이 임상효과와 잘 일치하는지는 알 수 없다.

본 연구에서도 여러 가지 항균제의 MIC가 BBA에서 시험한 경우 높았는데, 대부분 2배 정도의 차이가 있었고, 8배 이상 차이가 있었던 경우는 없었다. 두 배지에서 시험한 clindamycin에 대한 감수성 결과는 minor discrepancy는 8.3%였으나, MIC가 1 회석배수 범위에 든 경우가 97%였고, MIC 범위,  $MIC_{50}$ ,  $MIC_{90}$  및 내성을은 같았다. Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefoxitin, imipenem 및 chloramphenicol에 대한 감수성 결과는 MIC 범위,  $MIC_{50}$  혹은  $MIC_{90}$ 에서 2배의 차이가 있었으나, 내성을, 1 회석배수 범위, 감수성 해석결과에서의 일치율은 높았다. 두 배지에서 시험한 cefotaxime과 cefotetan 내성을의 차이는 각각 15%와 11.6%로 비교적 차이가 많았고, minor discrepancy도 각각 33.3%와 11.7%로 높았으나, MIC 범위,  $MIC_{50}$ ,  $MIC_{90}$  및 1 회석배수 범위에서의 일치율에서는 별 차이가 없었고, major discrepancy

도 없었다.

Tetracycline과 metronidazole의 MIC 범위, MIC<sub>50</sub> 및 MIC<sub>90</sub>는 BBA에서 시험한 것이 2~4배 높았는데, tetracycline의 MIC는 1 회석배수 범위에서의 일치율이 80%였으나, 2 회석배수 범위에서는 100% 일치하였고, 내성율이나 감수성 해석 결과에서도 별 차이가 없었다. Metronidazole의 MIC가 가장 차이가 많아서 1 회석배수 범위에서의 일치율이 42%, 2 회석배수 범위에서의 일치율이 90%였으나, 내성율과 감수성 해석결과에 있어서 불일치를 보인 예는 없었다. 이것은 metronidazole의 항균력이 우수하여 시험 세균 중 내성균수가 없었기 때문으로 생각되는데, 이러한 결과는 다른 연구자의 보고와 비슷하였다[21].

Gill 등[22]은 면양혈액을 넣은 Wilkins-Chalgren 배지와 넣지 않은 Wilkins-Chalgren 배지에서 BFG 세균에 대한 항균제 감수성을 한천회석법으로 시험하였는데, 대부분의 감수성 결과는 유의한 차이가 없었다고 하였다.

Wilkins-Chalgren 배지는 면양혈액 등의 첨가물을 넣지 않은 경우 색소형성 *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. 등의 혐기성세균의 증식이 잘 안되어 이들 세균에 대한 감수성을 시험할 수 없는 것이 단점이다[12]. BBA는 분말 배지의 가격은 약간 저렴하지만, 면양혈액을 넣는 것이 단점이다. 따라서 증식능이 좋은 BFG 세균과 *Clostridium* spp.의 감수성 시험을 위해서는 가격이 비교적 저렴하고, 제조가 간편한 Wilkins-Chalgren 배지를 사용하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

### 참 고 문 현

1. Finegold SM, Wexler HM. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:611-6.
2. 이경원, 장인호, 송원근, 김영진. 최근 임상검체에서 분리된 혐기성세균에 관한 고찰. 대한임상병리학회지 1991;11:615-25.
3. Curchural GJ, Tally FP, Jacobus NV, Cleary T, Finegold SM, Hill G, Iannini P, O'Keefe JP, Pierson C. Comparative activities of newer  $\beta$ -lactam agents group. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:479-80.
4. Pelaez MT, Cercenado E, Rodridguez-Creixems M, Bousa E. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents. Letter. *Rev Infect Dis* 1991;13:183.
5. de Almeida AECC, de Uzeda M. Susceptibility to five antimicrobial agents of strains of the *Bacteroides fragilis* group isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:617-8.
6. Betriu C, Campos E, Cabronero C, Rodriguez-Avial C, Picazo. Susceptibilities of species of the *Bacteroides fragilis* group to 10 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:671-3.
7. Dubreuil L, Devos J, Neut C, Romond C. Susceptibility of anaerobic bacteria from several french hospitals. *Antimicrob Agent Chemother* 1984;25:764-6.
8. Suata K, Watanabe K, Ueno K, Homma M. Antimicrobial susceptibility patterns and resistance transferability among *Bacteroides fragilis* group isolates from patients with appendicitis in Bali, Indonesia. *Clin Infect Dis* 1993;16: 561-6.
9. Lee K, Jang IH, Kim YJ, Chong Y. In vitro susceptibilities of the *Bacteroides fragilis* group to 14 antimicrobial agents in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:195-7.
10. Lee K, Chong Y, Jeong SH, Xu XS, Kwon OH. Emerging resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in South Korea. *Clin Infect Dis* 1996;23(S1):73-7.
11. Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: Myth, Magic, or Method?. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:470-84.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria-3rd edition; Approved standard M11-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1993.
13. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong

— 신혜정 외 : *Bacteroides fragilis* group의 항균제 감수성에 대한 Wilkins-Chalgren agar의 영향 —

- C, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star publishing Co., Belmont, Calif., 1993.
14. Holdeman LV, Cato CP, Moore WFC. Anaerobe laboratory manual, 4th ed, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
15. Jones RN, Barry AL, Cotton JL, Sutter VL, Swenson JM. Collaborative evaluation of the Micro-Media systems anaerobe susceptibility panel: Comparisons with reference methods and test reproducibility. *J Clin Microbiol* 1982;16: 245-9.
16. Baron EJ, Bruckner DA. Comparison of susceptibilities of anaerobic bacteria determined by agar dilution and by a microbroth method. *Rev Infect Dis* 1984;6S:249-53.
17. Bremmelgaard A, Jansen JE, Justesen T, Gottschau A. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group. *APMIS* 1994;102:446-50.
18. Aldridge KE, Wexler HM, Sanders CV, Finegold SM. Comparison of in vitro antibiograms of *Bacteroides fragilis* group isolates: Differences in resistance rates in two institutions because of differences in susceptibility testing methodology. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:179-81.
19. Aldridge KE, Schiro DD. Major methodology-dependent discordant susceptibility results for *Bacteroides fragilis* group isolates but not other anaerobes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;20:135-42.
20. Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility test. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:1-51.
21. Aldridge KE, Sanders CV. Antibiotic- and method-dependent variation in susceptibility testing results of *Bacteroides fragilis* group isolates. *J Clin Microbiol* 1987;25:2317-21.
22. Gill CJ, Shungu DL, Ponticas S. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of a special panel of 74 *Bacteroides fragilis* group isolates in Wilkins-Chalgren agar with and without sheep blood. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:394-5.