

신 혐기성 배양 상자에서 질 트리코모나스 임상 분리주에 대한 항원충제의 내성 양상

조선대학교 의과대학 미생물학교실, 그린 산부인과병원*

양남웅·임 용·신성희·이강길·나윤정*·장하종*

Resistant Patterns of Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis* against Antiprotozoal Agents under A Newly Devised Anaerobic Box

Nam-Woong Yang, M.D., Yong Lim, M.D., Sung-Heui Shin, M.D.
Kang-Kil Lee, M.D., Yun-Jung Ra, M.D.* and Ha-Jong Jang, M.D.*

Department of Microbiology, Chosun University School of Medicine, Green Hospital*, Kwangju, Korea

Background : We thought that nitroimidazoles including metronidazole had been overused empirically for treatment of trichomoniasis in Korea. But there were not any reports about in vitro-drug susceptibility and distribution of resistant strains of *Trichomonas vaginalis* up to date. Therefore, we made an experiment in order to observe the susceptibility of clinical isolates of *T. vaginalis* to a variety of antiprotozoal agents.

Methods : Twenty-six strains of *T. vaginalis* isolated from 217 patients afflicted with the increased vaginal discharge were tested by Meingassner's microtiter plate method in newly devised anaerobic box, in which anaerobic and microaerobic conditions were more easily manipulated. The agents used in this study for testing the minimal lethal concentration (MLC) to the clinical isolates were as follows; nitroimidazoles, doxycycline, Zinc sulfate and gentian violet as chemotherapeutic agents and povidone-iodine as vaginal cleansing agents were studied.

Results : In anaerobic culture, according to anaerobic resistance cut-point (minimal lethal concentration $>3.1 \mu\text{g/mL}$) proposed by Müller etc., metronidazole (MTZ)-, tinidazole (TNZ)- and ornidazole (ONZ)-resistant strains were four (4/26, 15.4%), two (2/26, 7.7%) and two (2/26, 7.7%) strains, respectively. Among these resistant strains, two strains (G7 and G16) were resistant to two drugs and one strain (G20) resistant to three drugs concomitantly. Their resistance range

was narrow as $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/mL}$. MLC of clotrimazole was $\geq 2,000 \mu\text{g/mL}$ in all strains, econazole was as high as $62.5 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ and miconazole was also high as $62.5 \sim \geq 2,000 \mu\text{g/mL}$. In microaerobic culture (O_2 concentration $<5\%$), all strains showed lower MLC to MTZ, TNZ and ONZ than $>100 \mu\text{g/mL}$ (aerobic resistance cut-point proposed by Müller etc.). MLC of doxycycline ranged 62.5 to $250 \mu\text{g/mL}$ both in microaerobic and anaerobic conditions. All strains of *T. vaginalis* grew well in $3,000 \mu\text{g/mL}$ of povidone-iodine. 22 strains (84.6%) among 26 *T. vaginalis* strains showed MLCs of $3.5 \text{ mM} \sim 7.0 \text{ mM}$ to zinc sulfate. Gentian violet showed $15.6 \sim 62.5 \mu\text{g/mL}$ of MLC.

Conclusion : In absolute anaerobic culture, 4 strains (15.4%) among 26 *T. vaginalis* strains were resistant to metronidazole. But these 4 strains were not resistant in microaerobic culture depending on Müller's aerobic resistance cut-point ($>50 \sim 100 \mu\text{g/mL}$), the value decided in normal O_2 pressure. Vaginal PO_2 is $0 \sim 28 \text{ mmHg}$ (median 1 mmHg) at healthy or trichomonas-infected women. Therefore, we think that his aerobic resistance cut-point value is hard to be available in microaerobic condition and microaerobic resistance guide-line is to be established newly. (Korean J Infect Dis 32:41~48, 2000)

Key Words : *Trichomonas vaginalis*, Antimicrobial agents

접수: 2000년 1월 10일, 승인: 2000년 2월 10일

교신저자: 양남웅. 조선대학교 의과대학 미생물학교실

Tel : 062)220-3662, Fax : 062)232-3125 E-mail : nwyang@mail.chosun.ac.kr

서론

질 트리코모나스증은 세계적으로 가장 흔한 비 바이러스 성 성인성 질환으로서¹⁾, 그 증상이 통증과 악취나는 거품 모양의 대하를 동반한 심한 염증부터 비교적 무증상의 보균 상태까지 다양하다²⁾. 질 트리코모나스증은 세계적으로 매년 1억 7천만명이 이환되고 북미에서만 8백만 이상이 새로 감염되며³⁾ 이중 50% 정도가 무증상 보균자로 추정되고 특히 임신부에서 더 보균율이 높다^{4, 5)}. 이 질환은 임신부들에서 조기 양막 파수, 저체중아, 조산 등^{6, 7)}의 유인이 되며, 자궁 경부암, 비정형 골반내 염증 질환, 불임 등과도 관계가 있다고 한다^{1, 8)}. 질 트리코모나스는 또한 세균성 질증의 발병과 관계가 있으며⁹⁾, 바이러스 등 다른 병원체의 감염 매개체가 된다고 한다^{10, 11)}. 1979년 Meingassner 등¹²⁾이 처음으로 사람에서 metronidazole에 내성을 가진 원충주를 분리한 이후, 이 원충에 대한 nitroimidazoles 내성 보고들이 계속되어 치료가 복잡해지고 있는 양상을 띠고 있다^{13, 14)}. 질 트리코모나스에 대한 관심은 80년대 이후 높아지기 시작하여 병인론적 연구, 새로운 진단법의 개발, 역학적인 조사, 새로운 치료제의 개발, 개선된 배양방법의 고안, 내성충주의 출현에 대한 많은 보고들이 있다. 그러나 국내에서는 이환률에 대한 규모있는 역학 조사가 이루어져 있지 않으며, 임상가들은 질 트리코모나스의 진단을 육안적인 진찰소견이나 민감도가 떨어지는 생리 식염수 도말법을 사용하는 정도에 머무르고 있다. 또한 질 트리코모나스에 선택적인 약제인 nitroimidazole 계열의 약제들을 경험적으로 남용하고 있어서 nitroimidazole계 약제들에 내성인 원충주들이 현재 어느 정도 분포해 있으며 내성의 정도는 어떠한지 모르고 있다. 이 질환에 효과적인 약제들이 현재로서는 5-nitroimidazole 계열의 약제들 뿐이라는 점에서 볼 때, 국내에서 분리된 질 트리코모나스의 약제 감수성 실험은 반드시 필요하다. 저자는 광주 지역 개인 병원에서 분리된 질 트리코모나스 원충 26주의 여러 가지 약제에 대한 내성 양상을 실험하여 그 결과를 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 가검물의 채취 및 원충의 활성 유지

광주 시내에 소재한 산부인과 병원에 질 분비물 증가나 동통 또는 소양감을 주소로 내원한 외래 환자 217명에서 질

경을 통해 질 후와부에서 면봉으로 채취한 가검물들을 New modified diamond medium^{15, 16, 29)} (tryptose or trypticase 20 g, yeast extract 10 g, maltose 5 g, ascorbic acid 200 mg, L-cysteine · HCl · H₂O 1 g, KH₂PO₄ anhydrous 800 mg, K₂HPO₄ · 3H₂O 800 mg, Distilled water 900 mL, pH 6.2; 필요한 양만큼 분주하여 고압 습열 멸균한 후, 배지를 식힌 다음, 56℃ 30분 열처리하여 여과 멸균한 말 혈청을 10% 되게 부가하고 배지 1 mL당 vancomycin HCl 100 µg/mL, streptomycin sulfate 1,200 µg/mL, clindamycin phosphate 150 µg/mL, mycostatin 37.5 µg/mL 첨가²⁸⁾)을 1 mL씩 분주한 미세 원침 튜브에 접종하여 이를 Figure 1과 같이 자체 제작한 혐기 상태 유지용 50 cc cornical tube에 넣어 증류수 3 cc를 첨가하여 혐기 상태로 만들고 35℃ 배양기에서 유지하다가, 병원 일과 후에 실험실로 옮겼다. 「50 cc cornical tube transport method」는 다음과 같다. Sodium borohydride (H₂ 발생용) 35 mg을 튜브의 맨 아래쪽에 넣고, 그 위에 탈지면을 적당량 덮은 후, 탈지면 위에 각 1분자량씩 섞은 sodium bicarbonate plus citric acid (CO₂ 발생용)를 80 mg을 넣은 다음, 다시 적당량의 탈지면을 넣었다. 백금촉매에서 발산되는 열로부터 보호하기 위하여, 뚜껑의 안쪽에 양면 테이프를 3겹으로 잘라 붙이고 백금 촉매 알갱이 1개를 부착하였다. 이어서 증류수 3 cc를 붓고 즉시 마개를 밀폐하여 혐기 상태를 유도하였다.



Figure 1. A photograph of the anaerobic pack devised for the transfer of *T. vaginalis* in this study. *Cap of microcentrifuge tube is pierced by needle for ventilation.

2. 질 트리코모나스 원충의 분리 및 순수 배양

실험실로 옮긴 샘플은 wet smear를 하여 400× 현미경으로 운동성이 있는 원충과 yeast, 및 clue cell의 유무를 확인하였으며, 남은 샘플을 vancomycin HCl 100 µg/mL, streptomycin sulfate 1,200 µg/mL, clindamycin phosphate 150 µg/mL, mycostatin 37.5 µg/mL을 첨가한 5 mL modified Diamond medium에 접종하여 anaerobic jar (BBL, Gaspak 100 TM system)에 넣어 섭씨 37도에서 48시간 배양하고 두 차례 동일한 배지에 계대 배양하여 세균 오염을 없앴다.

3. 질 트리코모나스 원충의 보관

일단 무균 상태로 배양된 원충은 탁상형 원심 분리기(동양 과학)에서 4,000 rpm으로 원심 분리하고 인산 완충 식염수 (pH 7.2)로 2회 원심 세척하여 10% dimethyl sulfoxide, 10% 마혈청을 함유한(v/v) 증류수에 원충액이 15%가 되게 부유하고 이를 냉동 보관용 튜브(NALGENE CRYOWARE, Nalge Company, Rochester, NY, U.S.A.)에 0.5 mL씩 분주하여 4℃에서 4시간, -20℃에서 1시간, -80℃에서 1시간 냉동한 후 액체 질소 탱크에 넣어 장기 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

4. 항원충제 감수성 실험

세균 오염이 전혀 없는 원충 26주를 액체 질소 탱크에서 꺼내어 해동하고 vancomycin HCl 100 µg/mL, streptomycin sulfate 1,200 µg/mL, clindamycin phosphate 150 µg/mL을 함유한 modified Diamond medium (pH 6.5) 10 mL이 들어 있는 screw cap tube에 혼합하여 anaerobic jar에서 48시간 증균 배양하였다. 증균된 원충주들을 슬라이드 글라스 위에서 운동성 및 세균 오염 여부를 확인한 다음, 동일한 배지 5 mL에 각 100 µL씩 접종하고 36시간 혐기 배양하여 지수적 성장기에 꺼내어 감수성 실험에 사용하였다. 방법은 Meingassner¹²⁾의 microtiter plate method를 사용하였으며 다음과 같이 시행하였다. 지수 성장기의 원충주들을 Neubauer improved haemocytometer (Marienfeld, Germany)로 원충수를 계산하고, 동일한 배지로 50,000 cells/mL이 되게 희석하였다. Microplate의 1번 well에 각 항원충제의 stock solution 100 µL를 넣고 2번부터 12번까지 배지 50 µL씩 분주하고 11번까지 multichannel micropipette을 사용하여 2배 계단 희석하였으며 12번 well은 대조로 삼았다. 이어 희석한 원충액을 150 µL씩 동일하게 분주한 다음, 자체 제작한 혐기성 상자에 넣고 24시간 절대 혐기 상태에서 배양하였고, 미세 호기

상태(산소농도 5% 이하)에서도 위의 과정을 반복하였다. 배양이 끝난 microplate를 도립 현미경(Olympus)으로 200×에서 각 well들을 관찰하여 전체 시야에서 원충의 운동성이 전혀 없는 well의 약제 희석 배율을 해당 원충주의 해당 약제에 대한 최소 치사 농도(minimal lethal concentration)로 판정하였다.

5. 혐기 상자의 사양 및 사용법

흔히 사용되는 BBL사 제품인 anaerobic jar는 용량이 적고 일회용 혐기 팩의 가격이 고가여서 자체 제작한 혐기 상자를 실험에 사용하였다(Figure 2). 상자내의 산소의 농도는 sodium borohydride의 양을 가감하여 조절하였다. 절대 혐기 상태를 유도하기 위해서는 sodium borohydride 6 g을, 미세 호기 상태(5% 이하의 산소 농도)가 되도록 하기 위해서는 2.1 g을 사용하였다. 원충의 성장을 촉진하기 위한 5~12% 이산화탄소 농도를 유지하기 위하여 sodium bicarbonate 6.3 g과 citric acid 15.7 g을 혼합하여 사용하였다. 가스를 발생시키기 위해 사용된 물은 각 20 mL이었다. 완전 혐기 상태를 확인하기 위하여 anaerotest strip (MERCK, Germany)을, 산소 및 이산화탄소의 농도를 확인하기 위하여 KITAGAWA aspirating pump set (Model 400S, 光明理化學工業株式會社, JAPAN)을 사용하였다.

6. 사용된 항원충제 및 희석제

실험에 사용된 항원충제는 Table 1과 같다. 약제의 원액은 필요시에는 새로 제조하였고 일회용 여과기로 여과 멸균하여 사용하였다.

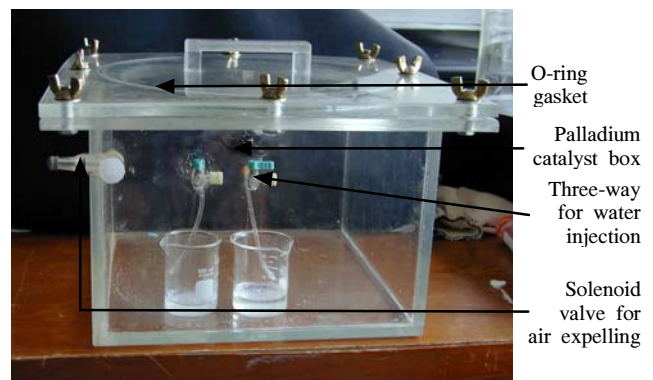


Figure 2. A photograph of anaerobic box for control of O₂ and CO₂ concentration. Sodium bicarbonate plus citric acid (each 1 molecular weight) and sodium-borohydride were placed in each beaker.

결 과

1. 질 트리코모나스의 분리율

질 분비물 증가를 주소로 내원한 환자에서 채취한 가검물 217개 중에서 400× 현미경하에서 wet smear로 운동성이 확인된 샘플은 28 (12.9%)개였으며, 순수 배양에 성공한 것은

Table 1. Antiprotozoal Agents Used in This Study

Agents*	Diluents	pH
Metronidazole	10% DMSO + 0.2% tween 80 in D.W	6.52
Tinidazole	"	6.23
Ornidazole	"	6.0
Econazole	"	3.9
Clotrimazole	"	6.54
Miconazole	"	4.0
Gentian violet	D.W	6.0
Zinc sulfate	D.W	5.52
Doxycycline HCl	D.W	2.53
Povidone-iodine (Zinobetadine®)	D.W	2.47

*All agents except povidone-iodine (Hyundae Pharmaceutical Co.) were purchased from SIGMA Co.

Table 2. Isolation Rate of *Trichomonas vaginalis* in 217 Vaginal samples

	No. (%) of positive wet smear	No. (%) of positive culture in modified Diamond medium
<i>T. vaginalis</i>	28 (12.9%)	26 (12%)
Clue cell	60 (27.6%)	ND*
Yeast	21 (10%)	ND

*not done

26주(12%)였다. 전형적인 clue cell이 확인된 경우는 60 (27.6%), 효모를 확인한 경우는 21 (10%)케이스였다(Table 2).

2. 혐기 상태에서 nitroimidazoles에 대한 최소 치사 농도

절대 혐기 상태에서 Müller 등이 제시한, 질 트리코모나스에 대한 metronidazole 내성 판정 기준인 3.1 µg/mL을 초과한 원충주는 4주로서 metronidazole, tinidazole, ornidazole에 대하여 약한 내성을 가지고 있었으며, 이들 균주들은 서로 교차 내성을 보였다. 다른 nitroimidazole 즉 econazole, clotrimazole, miconazole에는 전체 원충주가 매우 높은 내성을 보였으며, 카네스텐이라는 상품명으로 많이 상용되고있는 clotrimazole은 전체 원충주가 실험 최고 농도에서도 죽지 않았다(Table 3).

3. 혐기 상태에서 기타 항원충제들에 대한 최소 치사 농도

Doxycycline은 92%의 원충주들에 대하여 125 µg/mL 이하의 MLC를 보였다. Gentian violet도 95%의 원충주가 62.5 µg/mL 이하에서 완전 사멸하였다. 이 두 약제는 nitroimidazoles에 대한 내성의 정도가 높은 원충주에 의한 감염을 치료할 경우, 대체약이 될 수 있다는 것을 의미한다. 황산아연에 대해서 84%의 원충주가 7 mM 이하의 농도에 감수성이 있었다. 아연은 전립선 분비액 내에서 4.5~7 mM로 높게 함유되어 있다. 황산아연의 농도로 다수의 원충주들이 7 mM 이하에서 사멸되므로 대부분의 원충주들이 아연에 감수성이 있는 것으로 추정되었다. Povidone-iodine은 지노베타딘이라는 질 세정액으로 판매되고 있으나, 권장량인 3,000 µg/mL의 농도로는 원충이 전혀 죽지 않았다(Table 4).

Table 3. Minimal Lethal Concentrations (MLCs) of Nitroimidazoles to 26 Strains of *Trichomonas vaginalis* in Absolute Anaerobic Condition

Compound	Range of MLC (µg/mL)*	mean of MLC (µg/mL)	No. of resistant strains (%)	Name of strains
Metronidazole	0.78 ~ 12.5	2.67	4/26 (15.4)	G6, G7, G16, G20
Tinidazole	0.78 ~ 6.25	2.37	2/26 (7.7)	G16, G20
Ornidazole	0.78 ~ 6.25	1.95	2/26 (7.7)	G7, G20
Econazole	62.5 ~ 250		26/26 (100)	
Clotrimazole	2,000 ~ >2,000		26/26 (100)	
Miconazole	62.5 ~ 2,000		26/26 (100)	

*Resistant cut-point is >3.1 µg/mL determined by Müller et al.

Table 4. Minimal Lethal Concentration of Several Anti-protozoal Agents in Anaerobic Condition

Compound	MLC ($\mu\text{g/mL}$)	No. (%) of strains
Doxycycline	62.5	4/26 (15.38)
	125	20/26 (76.92)
	250	1/26 (3.85)
	500	1/26 (3.85)
Gentian violet	15.6	5/20 (15.4)
	31.25	8/20 (40.0)
	62.5	6/20 (30.0)
	125	1/20 (5.0)
Zinc sulfate*	3.5 mM	3/26 (11.54)
	7.0 mM	19/26 (73.0)
	>7.0 mM	4/26 (15.4)
Povidone-iodine [†]	>3,000	26/26 (100)

*Zinc concentration in prostatic secretion of normal men range from 4.5 to 7 mM.

[†]Usual dosage of Zinobetadine recommended by pharmaceutical Co. is 3,000 $\mu\text{g/mL}$.

Table 5. Minimal Lethal Concentration (MLC) of Nitroimidazoles and Doxycycline in Microaerobic Condition*

Compound	MLC ($\mu\text{g/mL}$) [†]	No. (%) of strains	mean of MLC ($\mu\text{g/mL}$) [‡]
Metronidazole	<1.95	1/26 (3.8%)	20.05
	3.9	5/26 (19.2%)	
	7.8	4/26 (15.4%)	
	15.6	4/26 (15.4%)	
	31.25	11/26 (42.3%)	
	62.5	1/26 (3.85%)	
Tinidazole	<1.95	16/26 (61.54%)	3.3
	3.9	6/26 (23%)	
	7.8	4/26 (15.4%)	
Ornidazole	<1.95	11/26 (42.3%)	4.27
	3.9	9/26 (34.6%)	
	7.8	5/26 (19.2%)	
	15.6	1/26 (3.85%)	
Doxycycline	125	15/26 (57.7%)	187.5
	250	10/26 (38.5%)	
	500	1/26 (3.85%)	

*O₂ concentration is <5%.

[†]Aerobic resistans cut-point proposed by Müller *etc.* is >100 $\mu\text{g/mL}$, but this cut-point was determined in normal air pressure.

[‡]Arithmetic mean of minimal lethal concentration to *T. vaginalis* 26 strains.

4. 미세 호기 상태에서 nitroimidazole과 doxycycline의 최소 치사 농도

혐기 상태에서 낮은 MLC를 보인 metronidazole, tinidazole, ornidazole에 대하여 산소 농도 5% 이하의 미세 호기 상태에서 최소 치사 농도를 측정하였다. Metronidazole의 경우 본래 질내의 산소 분압은 미세 호기 상태이며 측정자에 의하면 중간값이 1 mmHg 정도이다. 그러나 지금까지의 호기성 내성실험들은 대부분 완전 대기압하의 호기성 상태에서 이루어졌고 그 결과 호기성 상태의 내성 기준이 >100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 인정했다. 다시 말해서 질내 산소 분압에 유사한 상태에서의 내성 기준이 없었다. Table 5에서 보는 바와 같이 호기성 내성 기준을 초과하는 경우는 없지만, metronidazole의 경우 12 주가 미세 호기성 배양에서 절대 호기성 내성 기준인 3.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 10배 이상의 MLC를 보였으며, tinidazole과 ornidazole의 MLC는 상대적으로 낮았다. Doxycycline의 경우는 혐기성 상태와 큰 차이를 보이지 않았다.

고 찰

질 트리코모나스는 세계적으로 가장 흔한 비바이러스성 성인성 질환으로써¹⁾, 면역이 잘 성립되지 않아서 재감염되는 일이 흔하다²⁾. 세계적으로 매년 1억 7천만명이 이환되고 무증상 보균자가 많으며 특히 임신부들에서 그렇다^{4, 5)}. 질 트리코모나스증은 여러 가지 주산기 합병증들 즉 저체중아, 조기 진통, 조기 양막파수, 세균성 질증 유발, 비뇨 생식기 감염, 바이러스 등 다른 병원체의 전파와 관계가 있다고 보고되고 있다^{1, 6-8, 10, 11)}. 질 트리코모나스의 metronidazole에 대한 내성 원충주가 1979년 Meingassner¹²⁾에 의해 처음 분리된 이후, metronidazole을 비롯한 nitroimidazoles 계통의 약제들에 대한 내성에 관한 보고들이 많지는 않으나 꾸준히 이어지고 있다¹³⁻¹⁷⁾. Nitroimidazole 계통의 약제들은 그 자체가 질 트리코모나스에 세포 독성이 있는 것이 아니고 세포 내에 확산되어 들어가면 혐기적으로 세포내의 pyruvate-ferredoxin oxidoreductase에 의해 약제의 nitro-group이 환원되고 세포 독성이 강한 nitro radical 이온 중간산물을 생성하여 DNA strands에 손상을 줌으로써 약효를 나타낸다고 한다¹⁸⁾. 치료가 실패하는 요인은 여러 가지이며 대부분 치료에 순응하지 않거나 재감염에 기인한다고 한다¹⁾. 1989년 CDC 통계에 의하면 metronidazole 내성 질 트리코모나스의 비율은 전체 환자의 5%에 이르는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

Metronidazole에 대한 직접적인 내성은 여러 가지 돌연 변

이에 기인하며 호기성 내성은 ferredoxin 유전자의 전사 감소로 질 트리코모나스가 약제를 활성화시키는 능력의 감소에 기인한다고 하며¹⁹⁾, 혐기성 내성은 pyruvate-ferredoxin oxidoreductase와 hydrogenase의 활성이 없거나 감소에 기인하는 것으로 보고되었다²⁰⁾. Metronidazole 내성 원충주의 출현은 nitroimidazole 계열의 약제들 상호간의 교차내성으로 인하여 중요한 의의를 갖는다. 본 연구자의 결과에서 보는 바와같이 혐기 상태에서 metronidazole 내성인 4개 원충주가 tinidazole 또는 ornidazole에 교차 내성을 보이고 있다(Table 3). Metronidazole의 복용에 따른 발암 및 태아의 기형 유발 위험은 낮은 것으로 보고되었다^{21, 22)}. 그러나 오심, 구토, 금속미각, 백혈구 감소증, 말초 신경 장애, 두통, 현기증, 질 칸디다증 유발 등과 같은 비교적 흔한 부작용과 극히 일부에서 나타나는 췌장염, 피부 발진, 위막성 장염, 용혈성 요독 증후군 등, 약물 복용에 따른 부작용²³⁾이 만만치 않음을 고려하면, 약제 내성이 큰 원충주의 치료에 nitroimidazoles을 대량 투여할 때, 그 부작용의 우려가 크지 않을 수 없다. 일부 nitroimidazoles, 즉 econazole, clotrimazole, miconazole은 질 트리코모나스에 거의 또는 전혀 약효를 나타내지 못하였다(Table 3). 특히 국내에서 카네스텐이라는 상품명으로 판매되는 clotrimazole은 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 이라는 높은 농도에서도 원충이 증식하였다. Table 4에서 보는 바와 같이, doxycycline은 최소 치사 농도가 다소 높기는 하지만, 혐기 상태에서 92%의 원충들이 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서, 그리고 마찬가지로 미세호기 상태에서 57.7%가 완전히 사멸하였다. 따라서 내성이 심한 원충주에 대하여 대체 요법으로 doxycycline을 일회 대량 사용해 보는 것도 치료의 한 방법이 될 수 있을 것이다. Gentian violet도 95%의 원충주들이 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 완전 사멸하였다. 본래 좌약으로 사용되는 약제들은 원충을 함유한 Skene's gland, 또는 Bartholin's gland를 침투하지 못하므로²⁴⁾ 완치를 기대하기는 어렵지만, 다른 약제와 함께 사용시, 유용하게 사용될 수 있다고 생각한다²⁸⁾. Zinobetadine (질세정액)이라는 상품명으로 판매되는 povidone-iodine은 권장 사용량인 3,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 모든 원충주들이 증식하여 살균 세정액으로써의 기능을 전혀 못하였다. 황산 아연에 대해서 84%의 원충주들이 7 mM 이하의 농도에 감수성을 나타냈다. 아연은 남성 전립선 분비액 내에 아연만의 농도로 4.5~7 mM로 함유되어 있으므로²⁵⁾, 대부분의 원충주들이 아연에 감수성이 있을 것으로 추정된다. 이러한 사실은 질 트리코모나스가 남성에 감염이 되어도 아연에 의해 억제되거나 죽음으로써 거의 증상을 초래하지 않고, 감염된 남성이 질 트리코모나스의 전파 매개체 역할을 한다는 것을 확실히 증명해 준다. 여성의 질은 미

세 호기성 상태이며, 산소 분압이 중간 값으로 1 mmHg 정도이다²⁷⁾. 저자의 경험에 의하면, 질 트리코모나스는 산소에 내성을 가진 혐기성 미생물이지만 정상 대기압의 산소 농도에서는 성장이 크게 위축되며, 접종량이 적을수록 사멸하기 쉽다. 즉 질 트리코모나스는 여성의 질내와 같은 혐기 또는 미세호기성 상태에서 최적 성장을 하는 것이다. 따라서 Meingassner¹²⁾가 제 시한 완전 호기성 배양시 내성 기준인 >50 $\mu\text{g/mL}$ 이나 Müller¹³⁾가 제시한 >100 $\mu\text{g/mL}$ 을 미세 호기성 상태의 내성 실험 결과에 그대로 적용하기에는 무리가 있다고 생각된다. *In vitro* 결과로 판정한 내성 또는 감수성 원충주가 *In vivo*에서도 내성 또는 감수성일 것이라고 단언하는 것도 성급한 일이다. 질 트리코모나스증의 치료 실패의 요인은 여러 가지이고 지금까지 제시된 기준들도 여러 각도에서 고려되어야 하기 때문이다. 본 저자가 미세 호기성 상태에서 내성의 정도를 실험한 결과, metronidazole에 대한 최소 치사 농도의 평균이 20.05 $\mu\text{g/mL}$ 로써 절대 혐기 상태의 평균치인 2.67 $\mu\text{g/mL}$ 보다 전반적으로 증가한 반면, tinidazole은 미세 호기성의 경우 3.3 $\mu\text{g/mL}$, 절대 혐기의 경우 2.37 $\mu\text{g/mL}$, ornidazole은 미세 호기 4.27 $\mu\text{g/mL}$, 절대 혐기 1.95 $\mu\text{g/mL}$ 로써 두 약제는 미세 호기 상태와 절대 혐기 상태에서 큰 차이를 보이지 않았다(Table 3, 5). 또한 절대 혐기성 내성 기준에 의한 내성 균주는 metronidazole의 경우, G6, G7, G16, G20 등 4주였으나 완전 호기성 기준에는 G6 주가 31.25, G7 31.25, G16 15.6, G20 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 로써 모두 내성이 아닌 것으로 판정되었다. 절대 호기성 상태와 미세 호기성 상태(modified Diamond medium에서 cysteine과 ascorbate를 제거하지 않았고, 산소농도는 5% 이하를 유지한)에서 최소 치사 농도가 약제간에 확실한 차이를 보임으로써, 완전 호기성 상태의 기준을 미세 호기성 상태에 적용하기 어렵다고 추정할 수 있다. 따라서 향후 약제 내성이 있는 질 트리코모나스에 대하여 동물 실험이나 환자의 치료시 약제의 혈중 농도, 치료 효과 등을 고려하여 미세 호기성 상태에서의 새로운 약제내성 기준이 정립되어야 할 것이다.

요 약

목 적 : Metronidazole을 비롯한 nitroimidazoles에 대하여 내성을 가진 원충주들이 점차 증가하고 있는 가운데 국내에서는 내성 원충주들의 분포 및 내성의 정도에 관한 보고가 아직 없다. 저자들은 질 트리코모나스 원충 26주를 순수 분리 배양하여 여러 가지 약제들의 항원충 효과를 실험하였다.

방 법 : 원충의 분리는 50 cc cornical tube transport me-

thod 및 New modified Diamond medium을 사용하였으며, 항원층 실험은 저자들이 새로 고안한 혐기 상자에서 절대 호기상태와 미세 호기상태로 Meingassner의 microtiter plate method를 사용하여 실험하였다.

결 과 : 질 분비물 증가로 내원한 환자 217명중 질 트리코모나스 환자의 분포는 28명으로 13% 정도였다. 절대 혐기 배양시 metronidazole, tinidazole, ornidazole에 내성이 있는 약제는 각 4, 2, 2주로써 비교적 적었고 내성 원충주들은 3 약제에 대해 상호 교차 내성을 보였다. 3약제간에 최소 치사 농도(Minimal Lethal Concentration)의 평균에 큰 차이가 없었으나 미세 호기성 배양에서는 tinidazole과 ornidazole이 metronidazole에 비하여 약효가 더 우수하였다. Clotrimazole, econazole, miconazole은 절대 혐기성 상태에서 항원층 작용이 약하거나 거의 없었다. Zinobetadine이라는 상품명으로 시판되는 질 세정액인 povidone-iodine제재의 사용 권장량은 질 트리코모나스 원충에 전혀 약효가 없었다. Doxycycline은 혐기 또는 미세 호기 상태에서 비슷한 약효를 나타내며 nitroimidazoles 내성 원충주에 대체약으로써 1회 대량요법으로 사용이 가능하며, gentian violet도 약제 내성 원충주에 대한 질 좌약으로 유용성이 있다고 사료된다. 원충 26주 가운데 22주(84.5%)가 zinc sulfate로 7 mM 이하에서 사멸되었으며 남성 전립선내 아연 농도인 4.5~7 mM에 대부분 감수성이 있을 것으로 추정된다. 미세 호기성 배양에서 호기성 내성 판정 기준인 >50~100 µg/mL 이상을 초과한 원충은 없었으나 미세 호기상태에서의 새로운 내성 판정 기준이 필요하다고 생각한다.

결 론 : 절대 혐기성 배양에서 metronidazole, tinidazole, ornidazole에 대한 내성 원충주는 26주 가운데 총 4주(15.4%)였으며, 상호 교차내성을 나타냈다. 미세 호기성 배양에서는 완전 호기성 내성 기준인 >50~100 µg/mL을 초과한 원충주가 없었다. 그러나 이러한 결과는 여성의 질이 미세 호기 상태임을 비추어 볼 때, 미세 호기성 상태에서의 새로운 내성 기준을 정립해야 한다는 것을 의미한다.

참 고 문 헌

- 1) Petri D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G: *Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 11:300-317, 1998
- 2) Brown MT: *Trichomoniasis*. Practitioner 209:639-644, 1972
- 3) World Health Organization: *An overview of selected curable sexually transmitted diseases*. In Global program on AIDS. WHO, Geneva, Switzerland. 2-27, 1995
- 4) Fouts AC, Kraus SJ: *Trichomonas vaginalis; reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis*. J Infect Dis 141:137-143, 1980
- 5) Heine P, McGregor JA: *Trichomonas vaginalis: A reemerging pathogen*. Clin Obstet Gynecol 36:137-144, 1993
- 6) Cotch MF et al.: *Trichomonas vaginalis associated with low birth weight and preterm delivery*. Sex Trans Dis 24:353-360, 1997
- 7) Minkolf H, Grunebaum AN, Schwarz RH, et al.: *Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: A prospective study of the vaginal flora in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 150:965-972, 1984
- 8) Hume JC: *Trichomoniasis: Eight reasons why you should take it seriously*. Medical Times 106:59-63, 1978
- 9) James JA, Thomason JL, Gelbart SM, Osipowski P, Keiser P, Hanson L: *Is trichomoniasis often associated with bacterial vaginosis in pregnant adolescents*. Am J Obstet Gynecol 166:859-63, 1992
- 10) Keith LG, Friberg J, Fullan N, Bailey R, Berger GS: *The possible role of Trichomonas vaginalis as a "vector" for the spread of other pathogens*. Int J Fertil 31:272-277, 1986
- 11) Pindak FF, Pindak MM, Hyde BM, Gardner JR WA: *Acquisition and retention of viruses by Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 65:366-371, 1989
- 12) Meingassner JG, Thurner J: *Strain of Trichomonas vaginalis resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles*. Antimicrob Agents Chemother 15:351-7, 1979
- 13) Müller M, Lossick JG, Gorrell P TE: *In vitro susceptibility of Trichomonas vaginalis; Metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis*. Antimicrob. Agents Chemother 15:17-24, 1988
- 14) Grossman III JH, Galask RP: *Persistent vaginitis caused by metronidazole resistant trichomonas*. Obstet Gynecol 76:521-522, 1990
- 15) Lossick JG, Müller M, Gorrell TE: *In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis*. J Infect Dis 153:948-955, 1986
- 16) Narcisi EM, Secor WE: *In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother 40:1121-1125, 1996
- 17) Saurina G, DeMeo L, McCormack WM: *Cure of metronidazole and tinidazole-resistant trichomoniasis with use of high-dose oral and intravaginal tinidazole*. Clin Infect Dis 26:1238-1239, 1998
- 18) Tocher JH, Edwards DI: *Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with*

- DNA bases. *Biochem Pharmacol* 48:1089-1094, 1994
- 19) Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ: *Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4402-4406, 1992
 - 20) Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A: *In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 40:262-269, 1993
 - 21) Beard CM, Noller KL, O'Fallon WM, Kurland LT, Dockerty MB: *Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole*. *N Engl J Med* 301:519-522, 1979
 - 22) Czeizel AE, Rockenbauer M: *A population based case-control teratologic study of oral metronidazole treatment during pregnancy*. *Br J Obstet Gynecol* 105:322-327, 1998
 - 23) Moldwin RM: *Sexually transmitted protozoal infections*. *Uro Clin North America* 19:93-101, 1992
 - 24) Lossick JG, Kent HL: *Trichomoniasis: Trends in diagnosis and management*. *Am J Obstet Gynecol* 165:1217-1222, 1991
 - 25) Krieger JN, Rein MF: *Zinc sensitivity of Trichomonas vaginalis: In vitro study and clinical implications*. *J Infect Dis* 146:341-345, 1982
 - 26) Bouma MJ, Snowdon D, Fairlamb AH, Ackers JP: *Activity of disulfiram (bis (diethylthiocarbamoyl)disulfide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus*. *J Antimicrob Chemother* 42:817-820, 1998
 - 27) Rashad AL, Toffler WL, Wolf N, Thornberg K, Kirk EP, Ellis G, Whitehead WE: *Vaginal PO₂ in healthy women and in women infected with Trichomonas vaginalis: Potential implications for metronidazole therapy*. *Am J Obstet Gynecol* 166:620-624, 1992
 - 28) 양남웅, 정석진, 임 용: 질 트리코모나스증의 치료에 효과적인 약제의 탐색. *감염* 28:329-341, 1996
 - 29) 양남웅, 임용, 신성희, 박종훈, 이강길, 나윤정, 장하중: 질 트리코모나스의 분리에 선택적인 배지의 조성. "미 발표자료"