

# 사람 적혈구 용해액과 마혈청을 첨가한 Columbia agar base에서 *Gardnerella vaginalis* 임상 분리주의 약제 내성

조선대학교 의과대학 미생물학교실  
양남웅 · 임 용 · 신성희

## Drug-resistant Profiles of Clinical Isolates of *Gardnerella vaginalis* on Columbia Agar Base Supplemented with Human Erythrocyte Lysate and Horse Serum

Nam-Woong Yang, M.D.\*, Yong Lim, M.D. and Sung-Heui Sin, M.D.

Department of Microbiology, Chosun University College of Medicine, Gwangju, Korea

**Background :** To the best of our knowledge, there has been no any report on the antibiotic susceptibility profile of *Gardnerella vaginalis*, determined in domestic area by the agar dilution method. Therefore, we studied on 49 strains of *G. vaginalis* by the agar dilution method.

**Methods :** One standard strain (ATCC 14018) and Forty-eight strains isolated from patients with increased vaginal discharge were included in this study. Columbia agar base containing 1% proteose peptone No. 3 was supplemented with horse serum (5%) and human erythrocyte lysate (5%) which was prepared by a new method, and this medium was used for the antibiotic susceptibility test.

**Results :** The MICs<sub>90</sub> of clindamycin and ciprofloxacin were 0.3 µg/mL and 0.6 µg/mL, respectively. Amoxicillin, cefazolin, doxycycline, and erythromycin were hardly effective against most strains of *G. vaginalis* (NCCLS, U.S.A., 2001). Especially, MICs<sub>90</sub> of both metronidazole and tinidazole were 80 µg/mL under micro-aerobic condition of 5% O<sub>2</sub>.

**Conclusion :** For the treatment of Bacterial vaginosis, it is suggested that clindamycin or ciprofloxacin should be combined with vaginal tablet or gel of metronidazole rather than single administration of metronidazole or tinidazole.

**Key Words :** Drug resistance, *Gardnerella vaginalis*, Bacterial vaginosis

## 서 론

*G. vaginalis*는 세균성 질증(bacterial vaginosis)환자의 90% 이상에서 다른 절대 혐기성 세균들과 함께 분리되는, 통성 혐기성, 호이산화탄소성, 그람 다양성 다 형태 단 간균이다. 세균성 질증환자의 질 분비물에서는 유산균이 크게 감소하거나 전혀 없으며 다른 혐기성 세균들과 더불어 *G. vaginalis*가 양적으로 크게 증가하기 때문에 세균성 질증의 주요 원인 균의 하나로 간주되고 있다(1). 현재 세균성 질증의 치료는 거의 metronidazole에 의존하고 있으나 *G.*

*vaginalis*에 효과적인 항생제로 치료할 경우 그 항생제에 내성이 있는 다른 절대 혐기성 세균들도 함께 감소한다는 보고가 있다(1-3). 그러나 국내에서는 *G. vaginalis*에 대하여 한천 희석법에 의하여 항균제 감수성 검사를 실시하여 보고한 바가 없다. 본 연구자들은 사람의 혈액을 한천 희석법에 적용할 수 있도록 적절히 처리하였고 이를 마 혈청과 함께 Columbia agar base에 첨가하여 실험에 사용하였다. 감수성 실험은 표준균주 1주와 임상 분리 주 48주에 대하여 한천 희석법으로 실시하였다.

본 연구는 2000년 "조선대학교 단백질 소재 연구 센터"의 지원으로 이루어졌음.

접수: 2003년 2월 8일, 승인: 2003년 4월 15일

교신저자: 양남웅, 광주 동구 서석동 375

조선대학교 의과대학 미생물학교실

Tel : 062)230-6350, Fax : 062)232-3125

E-mail : nwyang@mail.chosun.ac.kr

## 대상 및 방법

### 1. 공시균주

광주 시내 두 곳의 산부인과에 중등도 이상의 질 분비물

증가를 주소로 내원한 환자 104명에서 분리한 48주의 *G. vaginalis*와 1주의 표준균주(ATCC 14018)를 실험에 사용하였다.

## 2. *Gardnerella vaginalis*의 분리 및 동정

Scott 등(4)의 방법에 의해 사람 혈액 5%, mycostatin (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA) 37.5 µg/mL, gentamicin (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA) 4 µg/mL, nalidixic acid (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA) 30 µg/mL을 함유한 Casman agar base (BECTON DICKINSON CO., SPARKS, USA)를 선택배지로 사용하여 질 분비물을 평판배지 한편에 집중 도말하고 백금이를 사용하여 회석 접종하였다. 평판 배지를 혐기 단지 (GasPak 100TM anaerobic system, BECTON DICKINSON CO., SPARKS, USA)에 넣고 미세호기 팩(CampyPak Plus, BECTON DICKINSON CO., SPARKS, USA)을 사용하여 미세 호기 및 5-12% 이산화탄소 상태를 유도하고 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 평판 배지에서 직경 0.5-0.7 mm의 무색 또는 옅은 흰색의 완전 용혈을 보이는 원형 집락을 백금으로 취하여 항균제가 들어 있지 않은 사람 혈액 5%를 함유한 Casman agar base에 재접종하여 상기와 동일한 조건에서 증균하였다. 증균된 균주를 그람 염색하여 그람 음성 염색상이 우세하면서 그람 양성균이 혼재된 상태, 즉 그람 다양성, 다 형태 구간균들이 혼재된 양상을 나타내며, oxidase test 음성, catalase test 음성일 경우, 일단 *G. vaginalis*로 동정하였다.

## 3. 사람 적혈구 용해액의 제조

이 등(5)의 결과를 본 실험에 응용하기 위하여 사람 적혈구를 pH 7.2 인산완충식염수로 3회 세척한 다음, 상청 액을 제거한 적혈구에 증류수를 부가하여 사람의 전혈 용량으로 환원하였다. 이 적혈구액을 유연한 플라스틱 용기에 넣고 -80℃ 냉동고에서 20분 동안 동결하고 다시 꺼내어 즉시 해동하는 과정을 5회 반복하였다. 용혈 된 적혈구액을 다시 증류수로 2.5배 희석한 다음, 이를 냉장 원심분리기(VISION SCIENTIFIC CO., VS-21SR, SEOUL, KOREA)에서 15,000 rpm으로 원침하여 상청액만 수합하였다. 수합된 적혈구 용해액은 0.45 µm Millipore 여과기로 여과 멸균하여 냉장보관하면서 필요시 사용하였다.

## 4. 사용된 항균제 및 회석

Amoxicillin (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA)은 pH 6.0 0.1M sodium phosphate buffer에 용해하고 생리식염수로 회석하였으며, Cefazolin sodium (DONGA PHARMACEUTICAL Co., SEOUL, KOREA), Ciprofloxacin (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA), Clindamycin phosphate (UPJOHN, SEOUL, KOREA), Doxycycline Hydrochloride (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA)는 증류수에 용해 및 회석하여 사용하였다. Erythromycin (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA)은 95% 에틸알코올에 용해하고 증류수에 회석하여 사용하였으며, Metronidazole (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA)과 Tinidazole (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, USA)은 100% 메틸알코올에 용해하고 증류수에 회석하여 사용하였다. 회석은 모두 2배 계단 희석으로 하였다.

## 5. 한천 회석법에 의한 감수성 검사

실험에 사용되는 균주들은 혐기 단지와 미세호기 팩을 사용하여 Casman blood agar에서 37℃, 5-10% CO<sub>2</sub>, micro-aerobic condition (5% 미만의 산소 농도)에서 48시간 배양하였다. 배양된 균주들의 집락을 액체 배지에서 증균하기 위하여 다음과 같이 하였다. 먼저 Casman agar base를 실온에서 증류수에 용해한 다음, 한천이 침전되도록 18시간 냉장 상태로 안치하고 나서 다시 실온에서 상청액만을 취했다. 상청액에 상기 3과 같이 제조한 사람 적혈구 용해액과 56℃에서 30분간 열처리하고 나서 여과 멸균한 마 혈청을 각각 5%되게 첨가하여 증균용 액체 배지로 사용하였다. 49개의 균주들을 증균용 액체 배지에 접종하고 상기와 같은 조건에서 48시간 배양하였다. 과립성으로 배양된 균액이 균질화 되도록 vortex mixer로 충분히 균질화한 다음,  $5 \times 10^8$  CFU/mL를 얻기 위해 생리 식염수로 균액을 200배 희석하였다. 희석한 균액을 multipoint inoculant (SAKUMA SEIKUSHO CO., TOKYO, JAPAN)에 0.8mL씩 분주하고 점종기로 취하여 2배 계단 희석한 항생제를 함유한 감수성 시험용 평판 배지에 접종하였다( $2.5 \times 10^6$  CFU/spot).

감수성 시험용 평판 배지는 다음과 같이 제조하였다. Columbia agar base (BECTON DICKINSON CO., SPARKS, USA)에 proteose peptone No. 3 (BECTON DICKINSON CO., SPARKS, USA)를 1%가 되게 첨가한 후, 습열 멸균한 다음, 수조에서 50℃로 유지하면서 마 혈청과 상기 3과 같이

제조한 사람 적혈구 용해액을 각 각 5%가 되게 부가하였다. 이어서 2배 계단 희석한 항균제들이 1 mL씩 들어있는 멸균된 병에 각 각 100 mL씩 분주하여 잘 혼합한 다음, 즉시 평판 접시 3개에 20 mL씩 분주하여 실온에서 응고시키고 4°C에서 보관하다가 접종 전에 1시간 이상 건조한 후 실험에 사용하였다. 접종한 배지들은 자체 제작한 원통형 아크릴 상자에 넣었다(Figure 1). 이어서 sodium borohydride 2.5 g이 들어있는 비커에 증류수 50mL을 스톱밸브를 통하여 주입하여 수소가 발생하게 하였다. 발생된 수소는 팔라듐 촉매에 의하여 상자 내의 산소와 결합하여 물이 된다. 이렇게 하여 산소 농도 5% 미만의 미세호기 상태를 유도하였다. 마찬가지로 5% 이산화탄소를 발생시키기 위하여 sodium bicarbonate 7.3 g과 citric acid 18.45 g을 상자 내의 비커에 넣고 증류수 50 mL을 주입하였다. 상자 내의 산소의 농도는 일회용 가스 검지기(GASTEC, No. 31B, KITAGAWA CO., JAPAN)를 사용하였고, 이산화탄소의 농도 역시 일회용 가스 검지기(GASTEC, 400S, KITAGAWA CO., JAPAN)를 사용하여 측정하였다. 팔라듐 촉매가 식을 때 까지 약 10분 정도 기다린 후에 원통형 아크릴 상자들을 일반 배양기에 넣고 37°C에서 48시간 배양한 다음, 최소발육억제 농도(MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>)를 결정하였다.

## 결 과

### 1. 항균제 내성 양상

표준 균주를 포함해서 최종적으로 선정된 *G. vaginalis* 49주에 대한 항균제 감수성 결과이다. Clindamycin과 ciprofloxacin에 대한 감수성이 비교적 높았으나(NCCLS, U.S.A, 2001. 참조) 기타 약제들에 대해서는 높은 내성을 나타내었다.

Table 1. Comparative *in vitro* Activity of Several Antimicrobial Agents to 49 Strains of *G. vaginalis*

Compound	Range	MIC ( $\mu$ g/ml)*		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Geometric mean
Amoxicillin	>17.5		>17.5	
Doxycycline	0.6->5	>5	>5	
Erythromycin	>10		>10	
Cefazolin	>15.6		>15.6	
Clindamycin	<0.04-0.3	0.15	0.3	0.16
Ciprofloxacin	0.3->5	0.6	0.6	0.56
Gentamicin	<0.8->50	12.5	25.0	10.15
Metronidazole	5->80	20	80	25.8
Tinidazole	2.5->80	10	80	11.2

\* Minimal Inhibitory Concentration

## 고 찰

세균성 질증 (bacterial vaginosis)은 성적 활동이 활발한 여성에서 많이 발생되고 있다. 이 질환은 명백한 염증반응이 없이 질 분비물이 증가하며, 젖산균과 비 병원성 연쇄상구균 같은 질 내 정상 세균 총이 *Gardnerella vaginalis*와 절대 혐기성 세균들(*Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*)로 바뀔으로써 발생하는 비 특이적 질염의 일종이다. 세균성 질증에서 *G. vaginalis*의 병원론적 역할은 아직 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 이 균이 세균성 질증 환자의 질 분비물 내에서 정상인에 비하여 100-1,000배 많고, 거의 대부분의 환자에서 분리된다는 보고들로 미루어 세균성 질증과 병원론적 관계가 있을 것이라고 추정하는 것은 무리가 아니다(6-8). 세균성 질증은 *G. vaginalis*와 다른 혐기성 세균들이 함께 복합적으로 질병을 일으키므로 *G. vaginalis*에 대하여 효과적인 약제만으로는 완치를 기대하기가 어렵고 재발이 빈번하다. 그러나 *G. vaginalis*에 효과적인 항생제로 치료할 경우 다른 혐기성 세균들도 크게 감소한다는 보고들(1-3)이 있기 때문에 국내에서 분리된 *G. vaginalis*균주들에 대



Figure 1. A photograph of the anaerobic jar devised for many plates culture of *G. vaginalis* in this study.

한 항균제 감수성 검사는 반드시 필요하다고 생각된다. 문헌 조사에 의하면 지금까지 감수성 시험을 위하여 한천 회석법을 사용한 연구자들은 보통 5% lysed horse blood를 첨가한 DST agar (Oxoid) 혹은 Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)를 주로 사용하였고(9, 10) 일부는 Columbia agar base (Oxoid)에 용해시키지 않은 5% sheep blood나 5% human blood를 1% proteose peptone No. 3과 함께 첨가하여 사용하는 등(11, 12) 일관성이 없었다. *G. vaginalis*는 혈액 성분을 배지에 넣어주어야 성장하는 호혈성 세균이다. 그러나 적혈구를 그대로 넣어주면 항균제가 적혈구에 흡착하여 항균 효과를 온전히 나타내지 못할 가능성이 있다. 따라서 본 연구자들은 구하기 쉽고 값이 저렴한 사람 적혈구를 인산완충식염수로 세척하고, 냉동과 해동을 반복하여 얻은 사람 적혈구 용해액(human erythrocyte lysate)을 앞에서 서술한 바와 같이 제조하여 5% horse serum과 함께 Columbia agar base에 첨가하여 한천 회석법에 사용하였다. *G. vaginalis* 49주에 대한 항균제 감수성 실험에서 혐기성 세균 감염 치료에 흔히 사용되는 clindamycin은 MIC<sub>90</sub>이 0.3 µg/mL로써 King 등(10)의 0.6 µg/mL과 유사하고, Croco 등(13)의 Etest에 의한 1 µg/mL과도 큰 차이가 없었다. Ciprofloxacin의 MIC<sub>90</sub>은 0.6 µg/mL으로 King 등(10)의 0.6 µg/mL과 같았으나, 5% Human blood를 배지에 그대로 사용한 Mikamo 등(11)은 *G. vaginalis* 26주를 대상으로 한천 회석법을 적용한 결과, MIC<sub>90</sub>을 6.25 µg/mL으로 보고하였다. 본 연구자들과 King 등의 결과에 비하여 약 10배의 차이가 난 것은 Mikamo 등이 사람 혈액을 그대로 사용한 데서 비롯한 것으로 추정된다. Erythromycin의 경우, 본 연구자들의 표준 균주를 포함한 균주 49주 모두에 대하여 >10 µg/mL의 높은 MIC를 보였다. 이 결과는 King 등의 MIC<sub>90</sub> 0.3 µg/mL과 현저한 차이를 나타내었는데 지금으로서는 이러한 차이를 설명할 수 없다. 기타 amoxicillin, doxycycline, cefazolin에 대하여 모든 균주가 비교적 높은 내성을 보였으나(Table 1) 비교할 만한 다른 문헌들을 찾을 수 없었다. 세균성 질증의 치료에 많이 사용되는 metronidazole은 미세호기 상태인 5%이하 O<sub>2</sub> 농도에서 *G. vaginalis*에 대하여 5-80 µg/mL (MIC<sub>90</sub> 80 µg/mL)의 항균 범위를 보였고, tinidazole의 경우도 2.5-80 µg/mL (MIC<sub>90</sub> 80 µg/mL)의 비교적 높은 내성을 나타내었다. 이 결과는 *G. vaginalis*가 metronidazole disc (5 µg/ea)에 중등도의 감수성을 나타낸다는 기준을 Scott 등(4)이 *G. vaginalis*의 동정의 한 기준으로 사용하는 것이 무의미한 것임을 시사한다. Gentamicin의 MIC 범위는 <0.8-50 µg/mL이었으며 MIC<sub>90</sub>은 25 µg/mL

이었다. 이 결과는 gentamicin이 선택 배지의 한 성분으로 사용될 수 있음을 재 확인해 주고 있다.

박 등(14)은 clindamycin 질 크림으로 104명의 세균성 질 증환자들을 치료한 결과, 94.2%의 치료율을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구자들의 *G. vaginalis*에 대한 in vitro test는 본 연구자들 고유의 방식으로 제조한 첨가물을 사용하여 국내에서 처음 시도된 것이다. 본 연구자들이 만든 사람 적혈구 용해액은 한천 회석용 및 시험관 회석용 항균제 감수성 배지로 사용하는데 적절하다고 생각한다. 본 연구의 결과로 미루어볼 때, 세균성 질증의 치료에 metronidazole 혹은 tinidazole 단독 요법보다는 *G. vaginalis*에 현저한 효과가 있는 것으로 보이는 clindamycin cream을 병용하거나, ciprofloxacin을 metronidazole 크림이나 질 좌제와 병용하는 것이 치료에 더 많은 도움이 될 것으로 추정된다. 다만 이 결과는 임상적으로 환자의 치료를 통하여 검증되어야 할 것이다.

## 요 약

**목적 :** 국내에서 아직 보고가 없는 *G. vaginalis*에 대한 항균제 감수성 시험 결과를 얻기 위하여 실험하였다.

**방법 :** 악취가 나는 질 분비물의 증가를 주소로 내원한 여성 환자들에서 분리한 *G. vaginalis* 48주와 표준균주 1주(ATCC 14018)에 대하여 한천 회석법에 의한 항균제 감수성 시험을 하였다. 본 연구자들이 새로 고안한 방식으로 제조한 사람 적혈구 용해액을 마 혈청과 함께 columbia agar (1% proteose peptone No. 3함유)에 각 5%씩 첨가하여 한천 회석법의 시험 배지로 사용하였다.

**결과 :** Clindamycin과 ciprofloxacin의 MIC<sub>90</sub>은 각 각 0.3 µg/mL, 0.6 µg/mL로 감수성이 높았다. 기타 amoxicillin, doxycycline, erythromycin, cefazolin, gentamicin, metronidazole, tinidazole은 비교적 높은 내성을 보였다 (NCCLS, U.S.A., 2001).

**결론 :** 세균성 질증의 치료를 위하여 metronidazole 혹은 tinidazole 단독 투여하기 보다는 clindamycin 또는 ciprofloxacin의 병용효과를 환자들에서 검증할 필요가 있다고 사료된다. 아울러 본 연구자들이 고안한 첨가물인 사람 적혈구 용해액은 *G. vaginalis*의 항균제 감수성 시험용 한천 회석 배지 및 시험관 회석 배지로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감 사 문

본 연구는 2000년 8월 조선대학교 단백질 소재 연구 센터(ERC)의 재정적 지원을 받아 이루어졌음.

## 참 고 문 헌

- 1) Spiegel CA : *Bacterial vaginosis*. Clin Microbiol Rev 4: 485-502, 1991
- 2) Secor RMC : *Bacterial vaginosis: A comprehensive review*. Nursing Clinics of North America 23:865, 1988
- 3) Sobel JD : *Bacterial vaginosis: An ecologic mytery*. Annals of Internal Medicine 111:551-553, 1989
- 4) Scott G, Smith CJ, Keane CT : *In vitro adhesiveness and biotype of Gardnerella vaginalis strains in relation to the occurrence of clue cells in vaginal discharges*. Genitourin Med 63:47-53, 1987.
- 5) 이정규, 이길형, 김병수, 한세준, 양남웅, 신성희 : *Gardnerella vaginalis*의 성장 조건과 biotypes. 대한산부인과 학회잡지 36:837-846, 1993
- 6) Borchardt KA, Saleh AH, Nino M : *Importance of Gardnerella vaginalis as an aetiological agent in bacterial vaginosis*. Genitourin Med (letter) 65:285, 1989
- 7) Hill GB : *The microbiology of bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol 169:450-454, 1993
- 8) Yang NW, Sin SH, Chang JS : *Diagnosis of bacterial vaginosis with relation to isolation of Gardnerella vaginalis*. Journal of Bacteriology and Virology (Korea) 32:109-114, 2002.
- 9) Jones BM, Willcox LM : *The susceptibility of organisms associated with bacterial vaginosis to spermicidal compounds, in vitro*. Genitourin Med 67:475-477, 1991
- 10) King A, Phillips I : *A comparison of the in-vitro activity of clarithromycin, a new macrolide antibiotic, with erythromycin and other oral agents*. Journal of Hospital Infection 19(Supplement A):3-9, 1991
- 11) Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, Kawazoe K, Tamaya T : *In vitro activities of pazufloxacin, a novel injectable quinolone, against bacteria causing infections in Obstetrics and Gynecological patients*. Chemotherapy 45:154-157, 1999
- 12) Kato N, Kato H, Tanaka Y, Bando K, Watanabe K, Ueno K : *In vitro activity of FK037, a new parenteral cephalosporin, against anaerobic bacteria*. Antimicrob Agents Chemother 37:957-961, 1993
- 13) Croco JL, Erwin ME, Jennings JM, Putnam LR, Jones RN : *Evaluation of the Etest for antimicrobial spectrum and potency determinations of anaerobes associated with bacterial vaginosis and peritonitis*. Diagn Microbiol Infect Dis 20:213-219, 1994
- 14) 박문일 : 임신부의 세균성질증에서 Clindamycin 질 크림의 임상효과. 대한산부회지 38:230-238, 1995