

## Clarithromycin and Amoxicillin Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* by Disk Diffusion Method

Heungsup Sung<sup>1</sup>, Jung-Oak Kang<sup>2</sup>, Mi Ae Lee<sup>3</sup>, Jongwook Lee<sup>4</sup>, Hae Kyung Lee<sup>5</sup>,  
Mi-Kyung Lee<sup>6</sup>, Ji-Hun Lim<sup>1</sup>, Mi-Na Kim<sup>1</sup>, *Helicobacter* Study Group

Department of Laboratory Medicine, <sup>1</sup>University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, <sup>2</sup>Hanyang University Medical College, <sup>3</sup>Ewha Womans University College of Medicine, <sup>4</sup>Konyang University College of Medicine, <sup>5</sup>The Catholic University of Korea College of Medicine, <sup>6</sup>Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** CLSI provides a guideline only for a agar dilution method of testing clarithromycin susceptibility for *Helicobacter pylori*. This study was to evaluate a disk diffusion method for clarithromycin and amoxicillin.

**Methods:** One hundred and forty clinical isolates of *H. pylori* isolated from May 2005 to May 2007 were tested by the CLSI agar dilution method and a disk diffusion method using 2 µg (2CLR) and 15 µg (15CLR) clarithromycin disks and 2 µg (2AMX) and 10 µg (10AMX) amoxicillin disks. The interpretation criteria used for the disk diffusion method were established by linear regression and error rate-bounded method for disk diffusion zone of inhibition (DDZ) compared to MIC.

**Results:** Resistance and intermediate rates to clarithromycin were 21.4% and 1.4%, respectively. A number of isolates with MIC 0.5, 1, and 2 (µg/mL) to amoxicillin were 7, 2, and 1, respectively. For 2CLR and 15CLR, the coefficients of determination ( $R^2$ ) be-

tween MIC and DDZ were 0.931 and 0.923 ( $P < 0.001$ ), respectively, and the criteria for resistance/susceptibility were 12/28 mm for 2CLR and 23/39 mm for 15CLR. For 2AMX and 10AMX, the  $R^2$  between MIC and DDZ were 0.478 and 0.421 ( $P < 0.001$ ), respectively, and the criteria for resistance with breakpoint of 2 µg/mL were 21 mm for 2AMX and 32 mm for 10AMX. All isolates had DDZ < 60 mm with 2CLR and 2AMX, but 61.4% and 75.7% of the isolates had DDZ < 60 mm with 15CLR and 10AMX, respectively.

**Conclusion:** Excellent correlation and agreement between MIC and DDZ were found for clarithromycin and amoxicillin. With 2 µg disks, the susceptibility breakpoints were 28 mm or less; thus, two disks could be tested in one plate. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:30-36)

**Key Words:** *Helicobacter pylori*, Agar dilution, Disk diffusion, Clarithromycin, Amoxicillin

### 서 론

*Helicobacter pylori*는 소화성궤양이나 만성 전정부 위염의 원인 인자이며, 점막연관림프조직 림프종(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALToma) 및 위암 등과 연관된 그람 음성 만곡형 막대균이다[1,2]. *H. pylori* 감염 치료는 궤양의 치유를 촉진시킬 뿐만 아니라 재발을 감소시키기 때문에 *H. pylori* 제균은 소화성궤양 치료에 필수적이지만[3], 항균제 내성은 *H. pylori* 제균 실패의 주요 원인이다[4]. 2002년 European *H. pylori* Study Group에서는 초회 치료에 실패한 경우 항균제감수성 검사를 시행한 후에 재치료 약제를 결정할 것을 권장하였

다[5]. *H. pylori* 제균 치료 시 일반적으로 특정 지역이나 환자군에서 clarithromycin (CLR)에 대한 치료 전 내성률이 15%가 넘으면 경험적인 일차치료제로 CLR 사용이 어려운 것으로 알려져 있는데[6], 국내에서는 2001년부터 2006년까지 분리된 임상균주들에서 초회치료 시 CLR 내성이 16.7%라는 보고가 있고[7], 최근 우리나라 보고에서 초회치료 시 CLR 내성은 13.8%, 재치료 시 CLR 내성은 85.1%로 CLR 내성이 크게 증가하였다[8,9]. CLR에 대한 *H. pylori* 내성률로 볼 때 우리나라에서 *H. pylori* 치료 시 항균제 재치료 시 뿐만 아니라 초회 치료 시에도 CLR에 대한 감수성 검사가 필요함을 시사한다[4,7].

1999년 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서는 *H. pylori* 감수성 검사를 위한 표준법으로 한천희석법을 제시하였고, CLR에 대한 감수성 판정기준을 설정하였다[10]. Amoxicillin (AMX), metronidazole (MTZ), tetracycline에 대한 감수성 검사를 시행한 연구는 많지만 아직까지 표준화된 판정기준이 없으며, 약제 내성과 제균율 간의 상관 관계가 CLR 내

Received 10 November, 2008, Revised 9 December, 2008

Accepted 20 January, 2009

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, 388-1, Pungnap-2dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

성의 경우와는 달리 명확하지 않다[7,11]. CLSI에서 *H. pylori* 감수성 검사의 표준법으로 제시한 한천희석법은 여러 균주를 모아 감수성 양상을 모니터링하는 데는 유용하지만, 임상검체에서 분리된 균주를 실시간으로 검사하기에는 인력과 비용이 너무 많이 든다[12]. 따라서 한천희석법의 대안으로 E test, 디스크확산법 등을 이용한 감수성 검사법이 사용되고 있다[4,12]. E test의 경우 한천희석법과의 일치도가 우수한 것으로 알려져 있으나 MTZ에 대해서는 일치도가 낮고 가격이 비싼 단점이 있으며, 디스크확산법의 경우에는 항균제 종류에 따라 정확도가 떨어진다는 보고가 있다[12]. 하지만 CLR과 AMX의 경우 디스크확산법이 한천희석법이나 E test 결과와 잘 일치하여 *H. pylori*에 대한 실용적인 감수성 검사법으로 추천되고 있다[12,13]. 디스크확산법 검사에 통상적으로 사용되는 15  $\mu$ g의 CLR 디스크와 10  $\mu$ g의 AMX 디스크를 *H. pylori* 감수성 검사에 사용하면 억제대 지름이 너무 커서 직경 100 mm 배지에서 성장을 관찰할 수 없을 때가 있으며[14], 한 개의 배지에 한 가지 항균제감수성 검사만 실시해야 하는 불편함이 있었다. 본 연구에서는 2  $\mu$ g, 15  $\mu$ g CLR과 2  $\mu$ g, 10  $\mu$ g AMX 디스크를 사용한 디스크확산법을 CLSI 표준법인 한천희석법과 비교하여 감수성 검사로 사용할 수 있는지를 판단하고 감수성 판정기준을 설정하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 균주

2005년 5월부터 2007년 5월까지 서울아산병원 임상검체에서 분리된 135주와 한양대학교 구리병원 임상검체에서 분리된 5주 등 140주의 *H. pylori*를 대상으로 하였다. *H. pylori*는 15% glycerol과 5% 멸균혈구가 포함된 brain heart infusion (BHI) broth에 풀어서  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가 5% 혈액한천배지에 두 차례 계대배양하여 실험에 사용하였다. 정도관리 균주로 *H. pylori* ATCC 43504를 사용하여 검사일마다 함께 검사하였다.

### 2. 한천희석법

5% 멸균혈액을 첨가하여 자가 제조한 Mueller-Hinton 배지(Becton Dickinson, Cockeysville, Md., USA)에 CLR은 0.008  $\mu$ g/mL부터 32  $\mu$ g/mL까지, AMX는 0.008  $\mu$ g/mL부터 8  $\mu$ g/mL까지의 농도가 되도록 만들었다[10]. 3일간 배양한 집락을 Mueller-Hinton broth에 2.0 McFarland가 되도록 풀 다음 0.4  $\mu$ L씩 배지에 접종하였다. 미호기성 상태에서  $37^{\circ}\text{C}$ , 72시간 배양하였다.

### 3. 디스크확산법

한천희석법과 동일한 조건으로 2.0 McFarland에 맞춘 균액을 면봉에 적셔서 지름 100 mm인 5% 멸균혈액 Mueller-Hinton

배지에 퍼 바른 후 2  $\mu$ g CLR (OXOID, Basingstoke, UK) 디스크, 2  $\mu$ g AMX 디스크(OXOID), 15  $\mu$ g CLR (OXOID) 디스크, 10  $\mu$ g AMX 디스크(OXOID)를 배지 한 장당 하나씩 놓았으며, 다른 배지 한 장에는 2  $\mu$ g CLR (OXOID) 디스크와 2  $\mu$ g AMX 디스크(OXOID) 배지를 50 mm 간격으로 함께 놓아 두 항균제 디스크 억제대의 판독 용이성과 상호작용 여부를 관찰하였다. 미호기성 상태에서  $37^{\circ}\text{C}$ , 72시간 배양한 후 억제대의 지름을 측정하였다.

### 4. 감수성 판정기준 설정

CLR은 CLSI 기준에 따라 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 0.25  $\mu$ g/mL 이하를 감수성, 0.5  $\mu$ g/mL를 중간내성, 1.0  $\mu$ g/mL 이상을 내성으로 하였다[10]. AMX는 내성 판정기준이 정립되어 있지 않아서 0.5에서 8  $\mu$ g/mL까지의 기준을 각각 적용하였다[7,11,14-16].

각 항균제별로 MIC를 로그 변환하여 디스크 억제대 지름과 선형회귀분석하여 상관성을 구하였다. 내성기준인  $\log_2$  MIC와 교차점으로 억제대 지름의 판정기준을 설정하였다[13]. 또한, error-rate bounded 방법에서 위내성이 5% 이내, 위감수성이 최대 1% 이내가 되는 판정기준을 설정하였다[17]. 두 방법 중 위내성이나 위감수성이 가장 적은 판정기준을 최종적으로 결정하였다. 통계학적 계산은 MedCalc ver. 4.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)를 사용하였다.

## 결 과

### 1. *H. pylori* ATCC 43504의 감수성 검사 결과

CLR과 AMX에 대하여 한천희석법을 사용하여 MIC를 검사한 결과 CLR 0.015~0.03  $\mu$ g/mL, AMX 0.03~0.06  $\mu$ g/mL로 모두 표준균주의 허용범위에 들었다[10]. 디스크확산법의 경우 10회 반복한 2  $\mu$ g CLR 억제대의 직경은  $38.8 \pm 5.0$  mm, 15  $\mu$ g CLR 억제대의 직경은  $50.2 \pm 5.8$  mm, 2  $\mu$ g AMX 억제대의 직경은  $48.0 \pm 5.2$  mm, 10  $\mu$ g AMX 억제대의 직경은  $58.3 \pm 6.3$  mm였다. 2  $\mu$ g CLR와 2  $\mu$ g AMX 디스크를 함께 놓았을 때 판독한 억제대 지름은 단독으로 놓았을 때와 차이가 없었고, 두 억제대의 상승작용이나 길항작용도 없었다.

### 2. CLR 감수성 결과

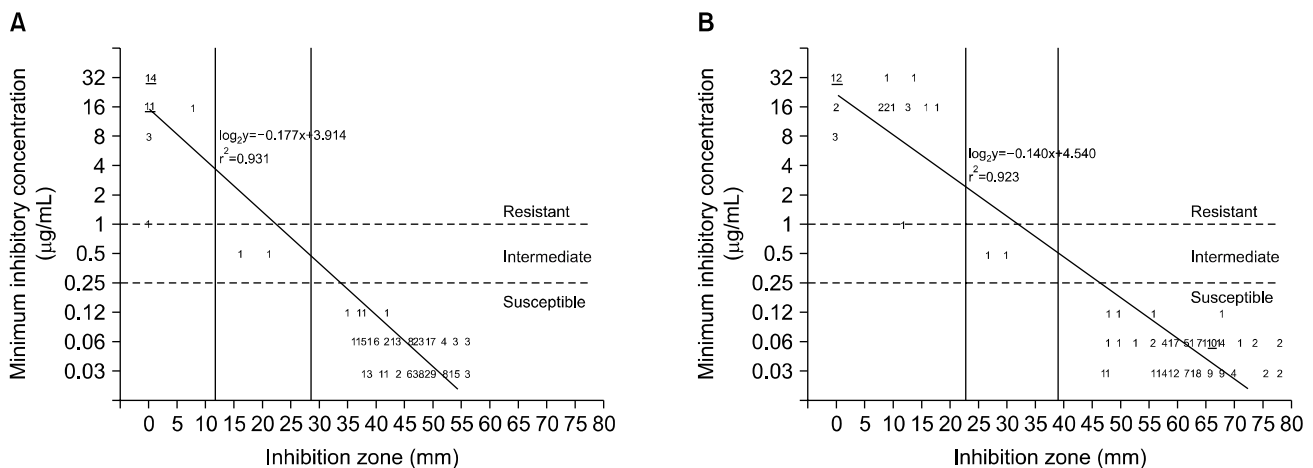
한천희석법으로 검사한 결과 CLR에 감수성인 균주가 108주(77.1%), 중간내성인 균주는 2주(1.4%), 내성 균주는 30주(21.4%)였다. 내성을 보인 30균주 중 MIC가 1  $\mu$ g/mL인 균주는 1주(3.3%), 8  $\mu$ g/mL인 균주는 3주(10.0%), 16  $\mu$ g/mL인 균주는 12주(40.0%), 32  $\mu$ g/mL인 균주는 14주(46.7%)였다(Fig. 1). 2  $\mu$ g CLR 디스크를 사용했을 때 억제대 지름은 0~56 mm였으며, 감수성인 균주의 억제대 지름은 35~56 mm, 중간내성인

균주의 억제대 지름은 16~21 mm, 내성인 균주의 억제대 지름은 0~8 mm였다(Fig. 1A). 한천희석법으로 측정된  $\log_2$  MIC와 2  $\mu$ g CLR 디스크 억제대의 지름( $\Phi$ )은  $\log_2$  MIC =  $-0.177\Phi + 3.914$  ( $R^2 = 0.931$ ,  $P < 0.001$  by  $F$ -test)의 높은 상관관계를 보였다. 15  $\mu$ g CLR 디스크를 사용했을 때 억제대 지름은 0~78 mm였으며, 감수성인 균주의 억제대 지름은 48~78 mm, 중간 내성인 균주의 억제대 지름은 27~30 mm, 내성인 균주의 억제대 지름은 0~18 mm였다(Fig. 1B). 억제대 지름이 60 mm 이상인 경우가 61.4% (86/140)였는데, 억제대 지름이 아주 클 때는 균 성장을 명확하게 관찰하기 힘들었다. 한천희석법으로 측정된  $\log_2$  MIC와 15  $\mu$ g CLR 디스크 억제대의 지름은  $\log_2$  MIC =  $-0.140\Phi + 4.540$  ( $R^2 = 0.923$ ,  $P < 0.001$  by  $F$ -test)의 높은

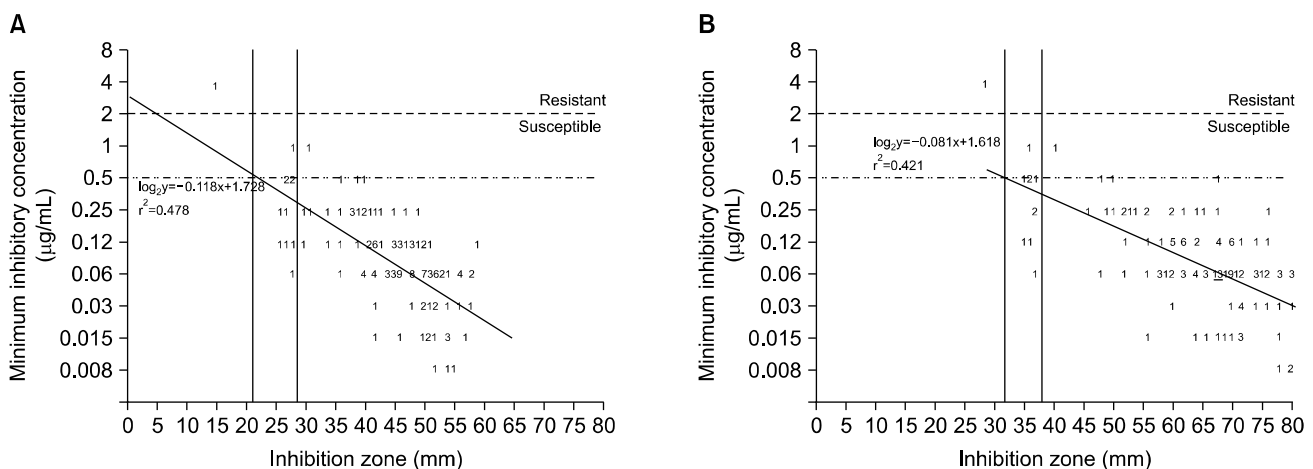
상관관계를 보였다.

### 3. AMX 감수성 결과

한천희석법으로 검사한 결과 AMX MIC가 0.25  $\mu$ g/mL 이하 130주(92.9%), 0.5  $\mu$ g/mL 7주(5.0%) 1  $\mu$ g/mL 2주(1.4%), 4  $\mu$ g/mL 1주(0.7%)였다(Fig. 2). 2  $\mu$ g AMX 디스크를 사용했을 때 억제대 지름은 15~59 mm였으며, MIC 0.25  $\mu$ g/mL 이하인 균주의 억제대 지름은 26~59 mm, MIC 0.5  $\mu$ g/mL인 균주의 억제대 지름은 27~40 mm, 1  $\mu$ g/mL인 균주의 억제대 지름은 28~31 mm, 4  $\mu$ g/mL인 균주의 억제대 지름은 15 mm였다(Fig. 2A). 한천희석법으로 측정된  $\log_2$  MIC와 2  $\mu$ g AMX 디스크 억제대의 지름은  $\log_2$  MIC =  $-0.118\Phi + 1.728$  ( $R^2 = 0.478$ ,  $P <$



**Fig. 1.** Error rate-bounded analyses of agar dilution MIC versus disk diffusion zone diameter for clarithromycin against 140 *H. pylori* clinical isolates. There was no major or minor error with resistance and susceptibility criteria of 12 mm and 28 mm for 2  $\mu$ g disk (A) and 23 mm and 34 mm for 15  $\mu$ g disk (B). The number of isolates more than 10 was indicated with underline.



**Fig. 2.** Error rate-bounded analyses of agar dilution MIC versus disk diffusion zone diameter for amoxicillin against 140 *H. pylori* clinical isolates. Dotted line and dotdash lines were for the breakpoint of 2  $\mu$ g/mL and 0.5  $\mu$ g/mL, respectively. At the resistance breakpoint of 2  $\mu$ g/mL, there was no major or minor error when 21 mm for 2  $\mu$ g disk (A) and 32 mm for 10  $\mu$ g disk (B) was applied for resistance criteria. The number of isolates more than 10 was indicated with underline.

0.001 by *F*-test)의 상관관계를 보였다. 10 µg AMX 디스크를 사용했을 때 억제대 지름은 28~80 mm였으며, MIC 0.25 µg/mL 이하인 균주의 억제대 지름은 35~80 mm, MIC 0.5 µg/mL 인 균주의 억제대 지름은 35~68 mm, 1 µg/mL인 균주의 억제대 지름은 37~42 mm, 4 µg/mL인 균주의 억제대 지름은 28 mm였다(Fig. 2B). 억제대 지름이 60 mm 이상인 경우가 75.7% (106/140)였다. 한천희석법으로 측정된  $\log_2$  MIC와 10 µg AMX 디스크 억제대의 지름은  $\log_2 \text{MIC} = -0.081\Phi + 1.618$  ( $R^2 = 0.421$ ,  $P < 0.001$  by *F*-test)의 상관관계를 보였다.

#### 4. 디스크확산법의 감수성 판정기준

선형회귀분석에서 CLR MIC 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL에 해당하는 2 µg CLR 디스크 억제대 지름은 각각 33 mm, 28 mm, 22 mm였다. 이 경우 중간내성인 2주가 모두 내성으로 판정되었다. Error rate-bounded 방법에서 내성 기준은 9~15 mm에서, 감수성 기준은 22~34 mm에서 MIC 판정 결과와 100% 일치하였다(Fig. 1A). Error rate-bounded 방법에서 얻은 판정 범위의 중앙값을 적용할 때 2 µg CLR 디스크확산법에서 감수성과 내성의 판정기준은 각각 28 mm, 12 mm였다(Fig. 1A).

선형회귀분석에서 CLR MIC 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL에 해당하는 15 µg CLR 디스크 억제대 지름은 각각 47 mm, 40 mm, 32 mm였다. 이 경우 중간내성인 2주가 모두 내성으로, 감수성인 1주가 중간내성으로 판정되었다. Error rate-bounded 방법에서 내성 기준은 19~26 mm에서, 감수성 기준은 31~46 mm에서 MIC 판정 결과와 100% 일치하였다(Fig. 1B). Error rate-bounded 방법에서 얻은 억제대 지름 범위의 중앙값을 적용할 때 15 µg CLR 디스크확산법에서 감수성과 내성의 판정기준은 각각 39 mm, 23 mm였다(Fig. 1B).

선형회귀분석에서 AMX MIC 0.5 µg/mL에 해당하는 2 µg 디스크 억제대 지름은 23 mm였으며, 이 기준을 적용했을 때 위내성률과 위감수성률은 각각 0%, 1.4% (2/140)였다. Error rate-bounded 방법을 적용하여 감수성 기준을 28 mm로 하였을 때 위내성률과 위감수성률은 각각 7.1% (10/140)와 0.7% (1/140)로 MIC 판정 결과와 일치율이 가장 높았다(Fig. 2A). 선형회귀분석에서 AMX MIC 2 µg/mL에 해당하는 2 µg 디스크 억제대 지름은 6 mm였으며, 이 때 MIC 4 µg/mL인 균주의 억제대 지름이 15 mm로 위감수성을 나타내었으며 위내성은 없었다. Error rate-bounded 방법에서 2 µg AMX 디스크확산법에서 억제대 지름의 기준을 21 mm로 하였을 때 위내성이나 위감수성 없이 MIC 판정 결과와 100% 일치하였다(Fig. 2A).

선형회귀분석에서 AMX MIC 0.5 µg/mL에 해당하는 10 µg 디스크 억제대 지름은 32 mm였으며, 이 기준을 적용했을 때 MIC 1 µg/mL에 해당하는 2주가 감수성으로 분류되었다(Fig. 2B). Error rate-bounded 방법에서 억제대 지름의 기준을 38

mm로 하였을 때 위내성률과 위감수성률은 각각 6.4% (9/140)와 0.7% (1/140)였다(Fig. 2B). 선형회귀분석에서 AMX MIC 2 µg/mL에 해당하는 10 µg 디스크 억제대 지름은 7.6 mm였으며, 이 때 MIC 4 µg/mL인 균주의 억제대 지름이 15 mm로 위감수성을 나타내었으며 위내성은 없었다. Error rate-bounded 방법에서 10 µg AMX 디스크확산법에서 억제대 지름의 기준을 32 mm로 하였을 때 위내성이나 위감수성 없이 MIC 판정 결과와 100% 일치하였다(Fig. 2B).

## 고 찰

*H. pylori* 항균제감수성 검사에서 2 µg과 15 µg 함량의 CLR 디스크 모두 디스크확산법의 억제대 지름은 한천희석법의 MIC와 높은 상관성을 보였다. 하지만 선형회귀분석 방법에서 MIC 0.25 µg, 1 µg에 해당하는 억제대 지름에서 위감수성과 위내성이 많았다. 이전 연구에서도 *H. pylori*에서는 MTZ를 제외하고 error rate-bounded 방법을 적용하는 것이 더 적합하였다는 보고가 있다[18]. CLR의 경우 디스크확산법은 한천희석법 또는 Etest 결과와 일치율이 매우 높았는데[13,14,18-21], 대부분의 연구에서 15 µg CLR 디스크를 사용하였고, error rate-bounded 방법을 적용하여 MIC >1 µg/mL와 MIC >2 µg/mL을 내성 기준으로 했을 때 억제대 지름의 판정기준은 <21~22, <18~30 mm로 보고하였다[22,23]. 이에 비해 2 µg의 CLR 디스크를 사용한 경우 MIC >2 µg/mL를 판정기준으로 하면 억제대가 전혀 없을 때를 내성으로 판정할 수 있다고 보고하였다[21]. 본 연구에서 error rate-bounded 방법의 중앙값에 의해 MIC 1 µg/mL에 해당하는 내성 판정기준은 2 µg CLR 디스크에서 12 mm, 15 µg CLR 디스크에서 22 mm로 이전의 보고들과 큰 차이를 보이지 않았다[13,14,18-21]. 2 µg CLR 디스크의 경우 error rate-bounded 방법에서 내성을 판정할 때 9~15 mm, 감수성을 판정할 때 22~34 mm에서 MIC 판정과 100% 일치도를 보였는데, CLR에 대한 판정기준이 되는 MIC 0.5~1 µg/mL 범위의 균주가 3군주만 포함되었기 때문일 가능성이 있다. 이 점은 본 연구의 제한점이 된다. 본 연구에서는 140주의 *H. pylori* 임상분리주를 대상으로 하여 CLSI에서 통상 디스크확산법의 평가에 100주 이상을 권장하는 것에 비하면 군주수는 충분하였다[24]. 하지만, CLR MIC가 0.25~2 µg/mL 범위의 균주는 충분하지 못했는데, 국내의 다른 연구에서도 이 범위의 균주는 0~4.4%로 드물었으며[7,12,25], 외국의 보고에서도 0.8~5.3%에 불과하였다[13,14]. 향후 이 범위의 균주를 더 포함시킨 평가가 필요할 것으로 생각된다. CLR 감수성 판정기준은 2 µg과 10 µg 디스크를 사용했을 때 28 mm와 39 mm로 CLSI에서 권장하는 디스크확산법의 감수성 판정기준인 15~25 mm [24]를 벗어나지만 15 µg 디스크는 억제대가 지나치게 큰데 비해 2 µg 디스크는 비교적 이 범위에 근접하였다.

2  $\mu$ g와 10  $\mu$ g 함량의 AMX 디스크의 억제대 지름은 한천희석법의 MIC와 유의한 상관성을 보였다. 이전 보고들에서 2  $\mu$ g와 10  $\mu$ g AMX 디스크확산법이 한천희석법 또는 Etest의 결과와 유의한 상관성이 있었다[13,20,26]. 10  $\mu$ g AMX 디스크의 경우 MIC >0.5  $\mu$ g/mL를 내성기준으로 했을 때 디스크법의 내성기준을 24 mm로 설정한 보고[13]가 있지만, 2  $\mu$ g의 AMX 디스크의 경우 디스크법의 내성기준을 설정한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서 2  $\mu$ g와 10  $\mu$ g AMX 디스크를 사용하였을 때 AMX MIC 0.5  $\mu$ g/mL를 내성 판독 기준으로 하면 위내성이 5% 이내, 위감수성이 최대 1% 이내가 되는 디스크 억제대의 지름을 설정할 수 없었지만, MIC 2  $\mu$ g/mL를 내성 판독 기준으로 하면 디스크 억제대의 지름을 각각 21 mm, 32 mm로 설정할 수 있었다. AMX의 경우 *H. pylori*에 대한 표준화된 내성 판정 MIC 기준이 없으며, 연구자에 따라 내성 판독 기준을  $\geq 1$   $\mu$ g/mL [7,13], >2  $\mu$ g/mL [16], 또는 >8  $\mu$ g/mL [27] 등으로 다양하게 설정하였다. 본 연구에서 내성 판정 MIC 기준을 >2  $\mu$ g/mL로 적용하면 error rate-bounded 방법에 의한 2  $\mu$ g와 10  $\mu$ g AMX 디스크 억제대 지름의 기준은 각각 16~26 mm, 29~34 mm 사이가 되며, 이 경우 한천희석법과 디스크확산법의 결과가 100% 일치하게 된다. Bang 등[7]은 144개의 *H. pylori* 임상분리주를 대상으로 변형액체배지희석법과 Etest법으로 AMX에 대한 MIC를 측정된 결과 MIC  $\leq 2$   $\mu$ g/mL인 균주가 85.4%, MIC  $\geq 16$   $\mu$ g/mL인 균주가 14.6%로 CLR와 유사하게 이중 봉우리 형태였다고 보고하였다. 국내에서 AMX에 대한 감수성이 저하된 MIC 0.5  $\mu$ g/mL 이상인 균주가 증가하고 있지만[28], 여전히 MIC 2  $\mu$ g/mL 이상인 균주는 드물기 때문에 디스크확산법의 판정기준을 설정하는 데 충분한 수의 내성 균을 포함시키기 어렵다[20]. 본 연구에서도 AMX MIC 0.5  $\mu$ g/mL 이상인 균주가 10주(7.1%)밖에 포함되지 않아 디스크확산법의 억제대 기준을 설정하는 데 한계가 있었으며, 향후 정확한 억제대 기준을 설정하기 위해 이 범위의 균주를 더 많이 확보하여 추가적인 실험이 필요할 것이다.

15  $\mu$ g CLR 디스크와 10  $\mu$ g AMX 디스크를 사용했을 때 각각 61.4%와 75.7%의 균주에서 억제대 지름이 60 mm 이상이었다. 억제대 지름이 아주 크면 100 mm 평판배지에서 균 성장을 쉽게 관찰할 수 없어서 억제대 지름을 정확히 측정하기 힘든 경우가 있다. 이전 연구에서도 15  $\mu$ g CLR 디스크와 10  $\mu$ g AMX 디스크를 사용한 디스크확산법은 억제대가 커서 정확한 억제대 지름을 측정하기 힘들었다고 보고된 바 있다[14,20]. CLSI에서는 디스크의 항균제 함량을 결정할 때 감수성 균주의 억제대 지름이 15~25 mm 범위에 들도록 권장하고 있는데 [24], 15  $\mu$ g CLR이나 10  $\mu$ g AMX의 경우에는 억제대가 너무 커 2  $\mu$ g 함량의 디스크를 사용하는 것이 더 바람직하였다. 2  $\mu$ g CLR 디스크와 AMX 디스크를 사용하였을 때는 모두 60 mm 미만으로 억제대 판독이 용이하였고, 두 항균제 사이에는 상승

작용이나 길항작용이 없어 두 가지 항균제 디스크를 한 평판에서 검사할 수 있을 것으로 판단하였다.

ATCC 43504 균주를 10번 반복하여 검사하였을 때 2  $\mu$ g CLR, 15  $\mu$ g CLR, 2  $\mu$ g AMX, 10  $\mu$ g AMX 억제대의 지름은 각각  $38.8 \pm 5.0$  mm,  $50.2 \pm 5.8$  mm,  $48.0 \pm 5.2$  mm,  $58.3 \pm 6.3$  mm였다. 정도관리 범위를 평균  $\pm 2$ SD로 한다면 2  $\mu$ g 디스크의 억제대 범위는 60 mm 미만이지만 15  $\mu$ g CLR과 10  $\mu$ g AMX 디스크는 60 mm 이상으로 억제대를 정확하게 측정하기 어려울 수 있다. 따라서 2  $\mu$ g 디스크를 사용하는 것이 정도관리에 도움이 될 것으로 생각된다.

결론적으로, *H. pylori* 항균제감수성 검사에서 CLR과 AMX 디스크를 사용한 디스크확산법은 한천희석법과 상관성이 좋았으며, MIC 판정과 100% 일치하는 억제대 기준을 설정할 수 있었다. 2  $\mu$ g 디스크를 사용하면 억제대가 더 작아서 CLR과 AMX를 한 평판배지에서 감수성 검사할 수 있는 장점이 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 2006년도 대한임상미생물학회 *Helicobacter* 연구회 지원 연구비에 의하여 연구되었음. *Helicobacter* 연구회 회원은 가톨릭의대 이해경, 연세의대 용동은, 울산의대 김미나, 성홍섭, 이화의대 이미애, 중앙의대 이미경, 한나로의료재단 이종욱, 한양의대 강정옥 등임(소속의 가나다 순).

## 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. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. J Infect Dis 1999;179:1523-30.
3. Kim JG. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. Korean J Gastroenterol 2005;46:172-80.
4. Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical usefulness of antimicrobial susceptibility test for *Helicobacter pylori*. Korean J Lab Med 2006;26:179-84.
5. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:167-80.
6. Eun CS, Han DS, Park JY, Jeon YC, Hahm JS, Kim KS, et al. Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean patients with peptic ulcer diseases. J Gastroenterol 2003;38:436-41.
7. Bang SY, Han DS, Eun CS, Kim JE, Ahn SB, Sohn JH, et al. Changing patterns of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease. Korean J Gastroenterol 2007;50:356-62.
8. Kim JM. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from

- Korean patients. Korean J Gastroenterol 2006;47:337-49.
9. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim SG, Jung HC, Song IS. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. Int J Antimicrob Agents 2006;28:6-13.
  10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. M100-S9. Wayne, PA; NCCLS, 1999.
  11. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2747-52.
  12. Kang JO, Han D, Choi TY. Evaluation of four methods for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in routine practice. Korean J Clin Microbiol 2005;8:82-9.
  13. Lang L and Garcia F. Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of *Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. Int J Antimicrob Agents 2004;24:572-7.
  14. 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.
  15. 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.
  16. Mishra KK, Srivastava S, Garg A, Ayyagari A. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. Curr Microbiol 2006;53: 329-34.
  17. Metzler CM and DeHaan RM. Susceptibility tests of anaerobic bacteria: statistical and clinical considerations. J Infect Dis 1974; 130:588-94.
  18. Iovene MR, Romano M, Pilloni AP, Giordano B, Montella F, Caliendo S, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in eighty clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Chemotherapy 1999;45: 8-14.
  19. Weiss K, Laverdière M, Restieri C. Comparison of activity of 10 antibiotics against clinical strains of *Helicobacter pylori* by three different techniques. Can J Gastroenterol 1998;12:181-5.
  20. Midolo PD, Bell JM, Lambert JR, Turnidge JD, Grayson ML. Antimicrobial resistance testing of *Helicobacter pylori*: a comparison of Etest and disk diffusion methods. Pathology 1997;29: 411-4.
  21. Smith C, Perkins J, Tompkins D. Comparison of Etest and disc diffusion for detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. PHLS Microbiol Dig 1997;14:21-3.
  22. Grignon B, Tankovic J, Mégraud F, Glupczynski Y, Husson MO, Conroy MC, et al. Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Microb Drug Resist 2002;8:61-6.
  23. McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, et al. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. J Antimicrob Chemother 2002;49:601-9.
  24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. M23-A3. Wayne, PA; CLSI, 2008.
  25. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim N, Kim YJ, Song IS. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4843-7.
  26. Franzin L, Pennazio M, Cabodi D, Paolo Rossini F, Gioannini P. Clarithromycin and amoxicillin susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from adult patients with gastric or duodenal ulcer in Italy. Curr Microbiol 2000;40:96-100.
  27. 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.
  28. Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 1999; 12:19-26.

=국문초록=

## 디스크확산법에 의한 *Helicobacter pylori*의 Clarithromycin과 Amoxicillin 항균제감수성 검사

<sup>1</sup>울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과, <sup>2</sup>한양대학교 의과대학 진단검사의학교실,  
<sup>3</sup>이화여자대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>4,\*</sup>건양대학교 의과대학 진단검사의학교실,  
<sup>5</sup>가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실, <sup>6</sup>중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

성홍섭<sup>1</sup>, 강정옥<sup>2</sup>, 이미애<sup>3</sup>, 이종욱<sup>4,\*</sup>, 이혜경<sup>5</sup>, 이미경<sup>6</sup>, 임지훈<sup>1</sup>, 김미나<sup>1</sup>, *Helicobacter* 연구회

**배경:** *Helicobacter pylori* 항균제감수성 검사는 clarithromycin에 대한 한천희석법만 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 지침이 정해져 있다. 본 연구에서는 임상검사실에서 *H. pylori*의 clarithromycin과 amoxicillin 항균제감수성 검사를 위해 디스크확산법을 평가하고자 하였다.

**방법:** 2005년 5월부터 2007년 5월까지 임상검체에서 분리된 140균주의 *H. pylori*를 대상으로 하였다. CLSI 지침에 따라 한천희석법으로 clarithromycin과 amoxicillin에 대한 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC)를 구했으며, 디스크확산법은 2 µg과 15 µg의 clarithromycin, 2 µg과 10 µg의 amoxicillin 디스크를 사용하여 5% 면양혈액 Mueller-Hinton 한천배지에서 검사하였다. 최소억제농도와 디스크 억제대를 선형회귀분석과 error rate-bounded 방법으로 비교하여 디스크확산법의 감수성 판독 기준을 설정하였다.

**결과:** 한천희석법 MIC 결과 clarithromycin 내성과 중간내성의 비율은 각각 21.4%, 1.4%였으며, amoxicillin MIC가 0.5, 1, 2 µg/mL인 균주는 각각 7주, 2주, 1주였다. 디스크확산법에서 clarithromycin 2 µg과 15 µg 디스크 억제대는 log<sub>2</sub> MIC와 R<sup>2</sup>값이 각각 0.931, 0.923이었으며(P<0.001), 내성/중간내성 기준은 각각 12/28 mm와 23/39 mm로 설정하였다. Amoxicillin 2 µg과 10 µg 디스크 억제대는 log<sub>2</sub> MIC와 R<sup>2</sup>값이 각각 0.478과 0.421이었으며(P<0.001), 억제대의 판독기준은 MIC 내성 기준을 2 µg/mL로 하면 21 mm와 33 mm였다. 2 µg 디스크에서는 억제대 지름이 모두 60 mm 미만인데 비해 15 µg clarithromycin 디스크에서는 61.4% (86/140), 10 µg amoxicillin 디스크에서는 75.7% (106/140)가 억제대 지름이 60 mm 이상이였다.

**결론:** Clarithromycin, amoxicillin 디스크확산법은 억제대의 지름이 MIC와 높은 상관성을 보였으며, MIC에 의한 감수성 판정과 100% 일치하는 억제대 지름의 판정기준을 설정할 수 있었다. 2 µg 디스크의 감수성 판정기준이 28 mm 이하로 더 적절하였으며 두 디스크를 하나의 평판배지에서 검사할 수 있었다. [대한임상미생물학회지 2009;12:30-36]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 풍납2동 388-1  
 서울아산병원 진단검사의학과  
 Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884  
 E-mail: mnkim@amc.seoul.kr

\*현주소: 하나로 의료재단(Hanaro Medical Foundation)