

나. 항생제 감수성 검사

분리된 세균에 대한 항생제 감수성 검사는 최소억제농도(minimum inhibitory concentrations, MICs)법으로 실시하였다. 대장균/살모넬라균은 항생제가 농도별로 coating된 plate를 균종별로 주문제작(Thermo Trek Diagnostics, USA)하여 사용하였다. 대장균/살모넬라균은 KRVN5F plate, 장알균(*E. faecium*/*E. faecalis*)은 KRVP2F plate를 사용하였다. 황색포도알균은 EUST plate(Thermo Trek Diagnostics)와 캄필로박터균은 CAMPY2 plate(Thermo Trek Diagnostics), 가축의 호흡기 병원성세균은 Bovine/Porcine with tulathromycin BOPO6F(Thermo Trek Diagnostics)을 이용하였다. 반려동물에서 분리한 대장균은 COMPGN1F, 포도알균은 COMPGP1F(Thermo Trek Diagnostics), 장알균은 KRVP2F, 클로스트리듐은 ANO2B(Thermo Trek Diagnostics)를 이용하여 검사하였다.

- 1) 균 배양 : *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *S. aureus* 등은 일반 증균 배지에서, *Campylobacter* spp., *P. multocida*, *S. suis*는 혈액배지에서, *A. pleuropneumoniae*는 Chocolate agar 배지에 배양하였다.
- 2) 탁도 조정 : *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *P. multocida* 는 증균배지 집락을 5ml 멸균 증류수에 현탁하여 0.5 McFarland로 조정하였다. *Campylobacter* spp., *A. pleuropneumoniae*, *S. suis*, *G. parasuis*, *Clostridium* spp.는 5ml CAMHBT(cation adjusted Mueller-Hinton broth with TES) broth에 현탁하여 0.5 McFarland로 조정하였다. *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *P. multocida*는 조정된 균액 10 μ l를 11ml의 CAMHBT(cation adjusted Mueller-Hinton broth with TES) broth에, *Campylobacter* spp.와 *S. suis*는 조정된 균액 100 μ l를 11ml의 MHB+lysed horse blood(5%). *A. pleuropneumoniae*와 *G. parasuis*는 조정된 균액 50 μ l를 11ml VFM(Veterinary Fastidious Medium), *Clostridium* spp.는 조정된 균액 100 μ l를 11ml의 brucella broth에 접종하였다.
- 3) 균 접종 및 배양 : 검사 항생제가 농도별로 coating된 MIC용 plate에 농도를 조정된 접종액을 자동분주기(Thermo Trek Diagnostics)를 이용하여 50 μ l씩 분주하였다. 단 *Campylobacter* spp., *S. suis*, *Clostridium* spp.는 100 μ l씩 접종하였다. 접종한 plate는 밀봉한 후 균종별 배양 조건에 따라 배양하였다(Table A.11).
- 4) 판 독 : 배양이 완료된 MIC plate를 판독하여 완전히 균의 증식이 억제된 가장 낮은 농도를 최소억제농도(MICs)로 판정하였다. KRVN5F, KRVP2F, BOPO6F, COMPGN1F, COMPGP1F MIC plate는 Autoreader(Thermo Trek Diagnostics)를 이용하여 판독하였으며 CAMPY2, EUST, ANO2B는 육안으로 판독하였다. 내성과 감수성의 breakpoints는 CLSI(Clinical Laboratory Standards Institute) 기준에 따라 판정 하였으며, CLSI에 명시되지 않은 항생제의 breakpoints는 DANMAP, NARMS, SVARM(Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring)에 정해진 기준에 따라 판정하였다.
- 5) 정도관리(Quality control) : MICs 방법에서 사용한 정도관리 균주는 *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218(β -lactam/ β -lactamase inhibitor), *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. jejuni* ATCC 33560, *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090. *H. somni* ATCC 700025, *Cl. difficile* ATCC 700057 균주를 이용하여 CLSI에서 제시한 표준균주 허용 범위와 비교하였다.

Table A.11. 균종별 Sensititre MIC Panel 및 검사 방법

Strains	Panel	McFarland Suspension (5ml)	Inoculum transfer	Final inoculum	Broth (11ml)	Plate reconstitution	Incubation conditions	Sealing	APQA****	Incubator hours
<i>E. coli, Salmonella</i> spp.	KRNV5F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	18H	18 ~ 24h
<i>E. faecium/E. faecalis</i>	KRVP2F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	20H (VA:24h)	18 ~ 24h
<i>Campylobacter</i> spp.	CAMPY2	CAMHB*	100ul	5x10 ⁵ cfu/ml	MHB+LHB(5%)**	100ul	42°C, Campypak	perforate seal	24H	24h
<i>A. pleuropneumoniae</i>	BOPO6F	CAMHB	50ul	5x10 ⁵ cfu/ml	VFM	50ul	35°C, CO ₂	perforate seal	22H	20 ~ 24h
<i>B. bronchiseptica</i>	BOPO6F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	20H	18 ~ 24h
<i>S. suis</i>	BOPO6F	CAMHB	100ul	5x10 ⁵ cfu/ml	MHB+LHB(5%)	100ul	35°C, CO ₂	perforate seal	22H	20 ~ 24h
<i>G. parasuis</i>	BOPO6F	CAMHB	50ul	5x10 ⁵ cfu/ml	VFM***	50ul	35°C, CO ₂	perforate seal	22H	20 ~ 24h
<i>P. multocida</i>	BOPO6F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	20H	18 ~ 24h
<i>S. aureus</i>	EUST	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	18H (OX:24H)	18 ~ 24h
<i>E. coli from companion animals</i>	COMPGN1F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	18H	18 ~ 24h
<i>Staphylococcus spp. from companion animals</i>	COMPGP1F	Water	10ul	1x10 ⁵ cfu/ml	MHB	50ul	35°C, O ₂	adhesive seal	18H	18 ~ 24h
<i>Clostridium</i> spp.	ANO2B	CAMHB	100ul	1x10 ⁶ cfu/ml	Brucella broth	100ul	34 ~ 36°C, CO ₂	perforate seal	48H	46 ~ 48h

* CAMHB: cation-adjusted Mueller-Hinton broth
 ** MHB+LHB: Mueller-Hinton broth+lysed horse blood
 *** VFM: veterinary fastidious medium
 **** APQA: Animal and Plant Quarantine Agency