

새로운 β -lactam계 항생물질 개발을 위한 검정용 균주의 개발

김대진·최금화·김숙경·최성숙·김병각·강창울·최응칠*
서울대학교 약학대학

(Received January 18, 1995)

Selection of Clinically Isolated Strains for Evaluation of the Newly Synthesized Antibiotics

Dae-Jin Kim, Keum-Hwa Choi, Sook-Kyung Kim, Sung-Sook Choi,
Byung-Kak Kim, Chang-Yuil Kang and Eung-Chil Choi*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Clinically isolated bacterial strains resistant to almost of all the clinically superior β -lactam antibiotics can be used to screen the promising ones among the newly synthesized β -lactam antibiotics. To select the resistant strains, the susceptibility of 389 strains of *S. aureus*, 144 strains of coagulase negative staphylococci, 509 strains of *E. coli*, 115 strains of *E. cloacae* and 187 strains of *P. aeruginosa* to methicillin, ampicillin, piperacillin and gentamicin was determined. The susceptibility of 19 bacterial strains selected through the first screening to cefixime, cefotiam, cefotaxime, flomoxef, ceftiofime, cefdinir, SCE-2787, panipenem and imipenem was determined. Four strains of *S. aureus* finally selected have high degree of resistance to almost of all β -lactam antibiotics used and also produce β -lactamases. These 4 strains of *S. aureus* can be used to screen effectively the promising β -lactam antibiotics among the numerous numbers of the newly synthesized β -lactam antibiotics.

Keywords □ β -lactam antibiotics, β -lactamase, Screening system, *S. aureus*

케니실린의 발견 이래로, 수많은 항생물질이 천연으로부터 분리되거나, 반합성 등에 의하여 급격한 수적인 증가를 보였으며, 그 활성면에서도 우수한 여러 계열의 항생물질이 개발되어 여러 감염증에 사용되었다. 광범위한 감염증에 여러 다양한 항생물질의 사용은 놀라운 치료효과를 보였지만, 사용빈도에 비례하여 내성을 획득한 균들도 증가하게 되었다.¹⁾ 항생물질의 내성이 현저히 증가하고 있는 이 시점에서 새로운 항생물질의 개발은 매우 시급하고 중요한 과제이다. 특히 일반적으로 널리 사용되고 있는 β -lactam계 항생물질에 대한 내성의 증가는 심각한 악영향을 초래하고 있다.^{2, 3)} 따라서 β -lactam계 항생물질의 항균력을 높이기 위해 세포내 투과성, 생체내 반감기, 교차내성면 등에서의 개선이 시도되어 여러 최

신의 항생물질들이 개발되어 왔다. 보다 우수한 항생물질을 개발하기 위해서는, 항균효과가 있으리라고 기대되어 쏟아져나오는 수많은 화합물과 그 유도체들의 항균효과를 좀 더 빠르게 경제적으로 확인하여야 하며, 그렇게하기 위해서는 효과적으로 항균효과를 검색할 수 있는 검색계가 가장 중요한 열쇠이다. 그 하나가 기존의 β -lactam계 항생제에 대해 내성을 가질뿐 아니라 가장 최신의 β -lactam계 항생물질에 대해서 내성을 가지는 임상 균주를 찾아내어, 그 균주를 새로 합성되거나 개발된 항생물질의 유효성여부를 확인하는데 적용하는 것이다. 그래서, 본 연구에서는 임상 분리 균주를 대상으로하여, 기존 또는 개발중인 우수 β -lactam계 항생물질에 내성을 나타내는 균주를 선별하는 실험을 실시하였다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

실험방법

시험 균주—본 실험에서는 고대부속병원, 영동 세브란스 병원, 신촌 세브란스 병원, 여의도 성모 병원, 이대 부속 병원, 서울대 부속 병원, 백병원 등에서 1988년부터 1992년 사이에 입원한 환자로부터 분리한 균주들인 *S. aureus* 389종, Coagulase(-) *Staphylococcus* 144종, *E. coli* 509종, *E. cloacae* 115종, *P. aeruginosa* 187종을 사용하였다. 그 외의 사용 균주로는 본 연구실에서 보존하고 있는 *S. aureus* SP-N2, *E. cloacae* GN 7471, *P. rettgeri* GN 4430, *P. vulgaris* GN 7919, *S. marcescens* GN 10857, *K. oxytoca* GN 10650을 사용하였다.

배지—각 균주들의 생육 배지로는 Difco사에서 만든 tryptic soy broth를 사용하였고, 보관 및 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 측정을 위해서는 Mueller-Hinton Broth(MHB, Difco)와 Mueller-Hinton Medium(MHM, Difco)을 사용하였다.

항생물질—Penicillin G, ampicillin, methicillin (Sigma Chemical Co.), cefixime(동아 제약), cefotiam, cefotaxime(한일약품), flomoxef(일동제약), cefpirome(한독약품), cefdinir(Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. Japan), SCE-2787, imipenem(Takeda Chemical Industries. Ltd. Japan), pamipenem(Sankyo Chemical Co. Japan) 등을 사용하였다. Nitrocefin disc는 BBL사에서 만든 제품을 사용하였다.

최소 저지 농도 (MIC) 측정⁷⁾—MIC 측정은 NCCLS에 의한 고체 배지 희석법으로 실시하였다. 사용 균액은 MHB배지, 37°C에서 하룻밤 전 배양한 균액을 10⁶ cells/ml이 되도록 MHB에 희석하였다. 항생물질이 함유된 배지는 최고농도를 128 µg/ml로 하여 2배 연속 희석하여 13단계로 만들었다. 37°C에서 18~20시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

β-lactam계 항생물질에 내성인 균주 선발—분양 받은 균주들 중에서 1차적으로 β-lactam계 항생물질에 내성인 균주들만 선발하기 위해 *S. aureus* 389종, Coagulase(-) *Staphylococcus* 144종, *E. coli* 509종, *E. cloacae* 115종은 ampicillin과 methicillin에 대한 MIC를 측정하였고, *P. aeruginosa* 187종의 경우 piperacillin과 gentamicin에 대한 MIC를 측정하였다. 1차 screening에 의해 선발된 균주들에 대하여 2차

검색으로 최신 β-lactam계 항생물질인 cefixime, cefotiam, cefotaxime, flomoxef, cefpirome, cefdinir, SCE-2787, pamipenem, imipenem에 대한 MIC를 측정하여 내성인 균주들을 선발하였다.

선발된 균주들의 동정—β-lactamase assay 실시전에 기존의 균과 동일성 여부를 확인하기 위하여 β-lactam계 항생물질에 내성을 보이는 균주들의 동정 실험을 실시하였다. 동정하기 위한 실험으로 그람 염색, 인돌생성 실험, methyl-red 실험, Voges-Proskauer 반응, citrate 이용성, gelatin 액화, oxidase 반응, coagulase 반응⁸⁾을 실시하였다.

β-lactamase 분리^{4,9-11)}—2차 선발 균주들에 대한 β-lactamase의 형성여부는 nitrocefin disc(BBL)를 사용하여 확인하였다. β-lactamase를 생성하는 균주의 하룻밤 전 배양한 시험균액 1ml을 tryptic soy broth 20ml에 접종한 후 2~3시간 동안 37°C에서 진탕 배양했다. 그 후 유도인자로 penicillin G 50 µg/ml를 가하고 다시 3~4시간 동안 37°C에서 진탕 배양했다. 배양액은 7,500 xg에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 0.01M phosphate buffered saline (pH 7.0) 1ml에 현탁시켰다. 현탁된 균액을 5분간 초음파처리하여 균체를 파괴시킨 후 35,000 xg에서 45분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

선발된 균주들의 β-lactamase에 의한 항생물질 불활성을 측정¹³⁻¹⁵⁾—최종 선발된 4종의 균주들로부터 분리한 β-lactamase로 최신 β-lactam계 항생물질인 cefotiam, cefotaxime, flomoxef, cefpirome, SCE-2787, pamipenem, imipenem 등을 반응시켜 spectrophotometry로 항생물질 불활성율을 측정하였다. 이때, 모든 항생물질의 농도는 항생물질의 종류에 따라 50 µg/ml에서 500 µg/ml 사이의 50, 100, 200, 500 µg/ml에서 실시하였다.

결 과

β-lactam계 항생물질에 대해 내성인 균주 선발—분양받은 균주들인 *S. aureus*, Coagulase(-) *Staphylococcus*, *E. coli*, *E. cloacae*의 경우 ampicillin, methicillin에 대한 MIC가 8 µg/ml 이상인 균주를 선발하였고, *P. aeruginosa*의 경우 piperacillin, gentamicin에 대한 MIC가 8 µg/ml 이상인 균주를 1차적으로 선발하였으며, 결과는 Table I에 나타내었다.

Table I—Frequency of resistance of clinical isolates to β -lactam antibiotics and gentamicin

Strain	Resistance (%)			
	Ampicillin	Methicillin	Piperacillin	Gentamicin
<i>S. aureus</i> (389) ^a Coagulase (-)	53.7	43.9	NT	NT
<i>Staphylococcus</i> (144)	47.2	32.6	NT	NT
<i>E. coli</i> (509)	88.6	85.1	NT	NT
<i>E. cloacae</i> (115)	97.4	93.9	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i> (187)	NT	NT	51.9	46.5

^aNo. of tested strains

NT: Not tested

Table II—Antibacterial activities of β -lactam antibiotics against clinical isolates selected by the first screening

Strain	MIC ^a (μ g/ml)				
	Cefixime	Cefotiam	Flomoxef	Cefpirome	Cefdinir
<i>S. aureus</i> 1	128	128	64	64	128
<i>S. aureus</i> 2	128	128	128	64	128
<i>S. aureus</i> 3	128	128	128	128	128
<i>S. aureus</i> 4	128	128	128	64	128
<i>S. aureus</i> 5	128	128	128	64	128
<i>S. aureus</i> 6	128	128	128	64	128
Coagulase (-)					
<i>Staphylococcus</i> 1	128	128	128	128	128
Coagulase (-)					
<i>Staphylococcus</i> 2	128	128	128	64	128
<i>E. coli</i> 1	128	128	128	64	128
<i>E. coli</i> 2	128	128	128	128	128
<i>P. aeruginosa</i> 1	128	128	128	64	128
<i>P. aeruginosa</i> 2	128	128	128	64	128
<i>P. aeruginosa</i> 3	128	128	128	64	128
<i>P. aeruginosa</i> 4	128	128	128	64	128
<i>P. aeruginosa</i> 5	128	128	128	32	128
<i>P. aeruginosa</i> 6	128	128	128	64	128
<i>E. cloacae</i> 1	128	128	128	16	128
<i>E. cloacae</i> 2	128	128	128	4	128
<i>E. cloacae</i> 3	128	128	128	16	128

^aMIC: 10⁶ CFU/ml

최신 β -lactam계 항생물질인 cefixime, cefotiam, cefotaxime, flomoxef, cefpirome, cefdinir, SCE-2787, pampipenem, imipenem에 대한 1차 검색으로 선발된 균주들의 최소 저지 농도는 Table II에 나타내었다. 9가지 모두에 대해 128 μ g/ml 이상의 강한 내성을 보이는 균주는 없었고, 7가지 이상의 항생물질에 대해서 64 μ g/ml 이상의 내성을 보이는 균주는 모두 19종이었다.

선발된 균주들의 동정—2차 검색 결과 선발된 19 종에 대한 그람 염색, 인돌 생성 실험, methyl-red 실험, Voges-Proskauer 반응, citrate 이용성, gelatin 액화, oxidase 반응, coagulase 반응 결과를 Table III에 나타내었다. 위의 동정 실험 결과로부터 모두 기존의 각 균주들과 일치함을 확인하였다.

β -lactamase에 의한 항생물질 불활성화—선발된 4종의 균주들로부터 분리한 β -lactamase에 의한 β -

Table II—continued

Strain	MIC ^a (μ g/ml)			
	Cefotaxime	SCE-2787	Panipenem	Imipenem
<i>S. aureus</i> 1	128	64	32	32
<i>S. aureus</i> 2	128	64	32	64
<i>S. aureus</i> 3	128	64	64	64
<i>S. aureus</i> 4	128	64	64	64
<i>S. aureus</i> 5	128	64	32	32
<i>S. aureus</i> 6	128	64	32	64
Coagulase (-) <i>Staphylococcus</i> 1	128	64	64	64
Coagulase (-) <i>Staphylococcus</i> 2	128	128	64	64
<i>E. coli</i> 1	128	32	8	16
<i>E. coli</i> 2	128	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i> 1	128	128	64	64
<i>P. aeruginosa</i> 2	128	128	32	128
<i>P. aeruginosa</i> 3	128	64	16	32
<i>P. aeruginosa</i> 4	128	64	16	32
<i>P. aeruginosa</i> 5	128	32	16	16
<i>P. aeruginosa</i> 6	128	64	32	32
<i>E. cloacae</i> 1	128	16	8	16
<i>E. cloacae</i> 2	16	4	4	16
<i>E. cloacae</i> 3	128	32	4	8

^aMIC: 10⁶CFU/ml

lactam계 항생물질 불활성을 측정을 spectrophotometry로 실시한 결과는 100 μ M cephalothin의 hydrolysis rate를 100으로 하여 각 농도별 상대치를 구하여 Table IV에 나타내었다. 동시에 2가지 이상의 항생물질을 불활성화하는 경우는 없었고, *S. aureus*의 경우 flomoxef, cefotaxime, SCE-2787을 가수분해하는 효소를 지닌 균주들이 있었다.

고 찰

환자들로부터 분리한 임상 분리 균주들중에서 내성균을 선별하기 위하여 *S. aureus*, Coagulase(-) *Staphylococcus*, *E. coli*, *E. cloacae*는 ampicillin과 methicillin에 대해, *P. aeruginosa*는 piperacillin과 gentamicin에 대해 감수성 시험 결과 *S. aureus*는 MRSA의 비율이 40%를 넘었고, 이 결과는 우리나라의 다른 병원에서 같은 기간 동안에 수집된 *S. aureus*중에서 MRSA의 비율이 40~60% 이상으로 내

성이 증가한 것으로 보고된 것¹⁰⁾과 일치하는 결과를 보였으며, 1992년 이후에는 60% 이상으로 MRSA의 비율이 증가한 것을 볼때, 현재에는 MRSA가 훨씬 더 많이 증가했으리라고 추정할 수 있다. MRSA는 특히, Protein Binding Proteins(PBP) 등에 의하여 내성을 나타내어 결국, penicillin, cephalosporin, carbapenem 등의 모든 β -lactam계 항생제에 대하여 내성을 가지게 되므로,¹³⁾ MRSA의 증가는 감염증의 치료를 위한 약물의 선택을 어렵게 할 것이다. Coagulase(-) *Staphylococcus*(CNS)는 ampicillin에 47.2%, methicillin에 32.6%의 내성을 보였다. CNS에서도 점차 내성이 증가하고 있지만, 아직은 *S. aureus*와 비교해서는 내성 출현 빈도가 덜하다고 말할 수 있다. *E. coli*는 ampicillin에 대한 감수성이 10%를 넘지 못했으며, methicillin에서는 15% 정도의 감수성을 보였다. *E. cloacae*는 ampicillin에는 본태성 내성으로, 감수성 균주는 3% 미만이었으며, methicillin에 대해서는 7% 미만의 감수성을 보였다. 이러한 균들은 특히 원내감

Table III—General characterization and identification of selected strains

Strain	Gram staining	Indole test	MR test	VP test	Citrate test	Gelatin test	Oxidase test
<i>S. aureus</i> 1	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> 2	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> 3	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> 4	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> 5	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> 6	+	-	-	-	+	-	-
Coagulase (-)							
<i>Staphylococcus</i> 1	+	-	-	-	+	-	-
Coagulase (-)							
<i>Staphylococcus</i> 2	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> 1	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 2	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 1	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 2	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 3	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 4	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 5	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 6	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. cloacae</i> 1	-	-	-	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i> 2	-	-	-	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i> 3	-	-	-	+	+	+	-

+: positive - : negative

Table IV—Hydrolysis rates^a of antibiotics against selected strains

Strain	antibiotics	V _{max} ^b	K _m ^b (μM)
<i>S. aureus</i> 1	Flomoxef	82.3	104.1
<i>S. aureus</i> 2	Cefotaxime	28.9	199
<i>S. aureus</i> 5	SCE-2787	33	17.2
<i>S. aureus</i> 6	SCE-2787	78	21

^ahydrolysis rate of 100 was assigned to cephalothin, the standard

^bby Lineweaver-Burk plot

염의 원인균으로 알려져 있으며, 따라서 여러 항균제에 대해 본태성 내성, 혹은 획득 내성을 가진 균들이 대부분이므로 효과적인 치료를 위해 새로운 항생제가 필요하다고 할 수 있다. *P. aeruginosa*는 gentamicin에 대해 55%, piperacillin에 대해서는 50% 정도의 감수성을 보여, 이미 보고된 다른 연구결과의 50~60%와 별 차이가 없었다. 전체적인 균주들의 내성 출현 빈도를 다른 연구결과와 비교해 볼때,¹⁶⁾ 내성균의 출현은 짧은 기간에 광범위하게 증가하고 있음을 알 수

있다. 이러한 항생물질에 대한 1차 검색을 통하여 선발된 균주들을 대상으로하여 가장 최신의 β-lactam계 항생물질 9종에 대한 내성 정도로, *S.aureus* 6종, Coagulase(-) *Staphylococcus* 2종, *E. coli* 2종, *E. cloacae* 3종, *P. aeruginosa* 6종을 선발하였다. 최신의 항생물질에 대해 내성을 보이는 균주들의 비율이 1차 검색에서의 내성 비율과 일치하는 것을 볼 수 있다. 선발된 19종의 균주들로부터 β-lactamase를 분리하여 β-lactam계 항생물질에 대한 불활성화율을 확인하였을때, 각 균주들이 7종의 항생물질에 대해 높은 MIC 값을 보임에도 불구하고, β-lactamase에 의한 불활성화 정도가 항생물질의 종류에 따라 다양하게 나타났으며, 2개 이상의 항생물질을 불활성화시키는 균주는 없었다. 또한, nitrocefim test에서 양성반응이었는데도 β-lactamase를 생성하지 않는 균주도 있었다. 이 경우 nitrocefim test에서 양성 반응이었음에도 불구하고 β-lactamase를 분리할 수 없었던 것은 nitrocefim에 대한 양성 반응이 반드시 β-lactamase에 의해서 뿐만 아니라, 다른 원인에 의해서도 유사반응이

나타날 수 있다는 보고^{18, 19)}를 고려하면 타당한 것으로 생각된다. 이 결과로부터, β -lactam계 항생물질에 대한 균주들의 내성 여부는 β -lactamase 뿐만 아니라, 세포 투과성의 변화, PBP 변형 등 여러 다른 기전에 의해 성립된 것임을 추정할 수 있다.¹⁷⁾ 19 종 균주들의 내성 정도, β -lactamase의 type, 그리고 최신의 항생물질에 대한 불활성화율과 감수성 시험의 결과로부터 *S. aureus* 4종을 최종적으로 선발하였다. 이 균주들은 검정용 균주의 요건이라 할 수 있는 최신의 β -lactam계 항생물질에 내성을 가질 뿐만 아니라, β -lactamase에 의해 항생물질을 가수분해 시킬 수 있다. 따라서, 1,000여개의 임상분리 균주들을 대상으로 하여, 최종적으로 선발된 4종의 *S. aureus* 균주들은 새로운 β -lactam계 항생물질의 개발시 그 항생물질의 항균력을 효과적으로 빠르게 검색할 수 있는 검정용 균주로서 적용 가능성이 대단히 크다고 볼 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구센터의 지원에 의해 수행된 것으로, 지원에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) Harold, C. N.: The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064 (1992).
- 2) Sanders, C. C.: Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 573 (1987).
- 3) Nikaido, H and Vu, H.: Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Ent. cloacae* to expanded-spectrum β -lactams. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27**, 393 (1991).
- 4) Bennet, P. M. and Chopra, I.: Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37**, 153 (1993).
- 5) Bush, K.: Characterization of β -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**, 259 (1989).
- 6) Bush, K. and Sykes, R. B.: Methodology for the study of β -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **30**, 6 (1986).
- 7) NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards): *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria*. NCCLS document MI-3A Vol. 13 (1993).
- 8) Simbert, R. M. and Krieg, N. R.: *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington. 409 (1981).
- 9) Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Ps. maltophilia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **22**, 564 (1982).
- 10) Gootz, T. D. and Sander, C. C.: Characterization of β -lactamase induction in *Ent. cloacae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **23**, 91 (1983).
- 11) Cullman, W., Dalhoff, A. and Dick, W.: Nonspecific induction of β -lactamase in *Ent. cloacae*. *J. Gen. Microb.* **130**, 1781 (1984).
- 12) Neu, H. C., Novelli, A. and Chin, N. X.: *In vitro* activity and β -lactamase stability of a new carba-penem, SM-7338. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**, 1009 (1989).
- 13) Hamilton-Miller, J. M. T., Smith, J. T. and Knox, P. R.: Interaction of cephaloridine with penicillinase-producing gram-negative bacteria. *Nature* **208**, 235 (1965).
- 14) Waley, S. S.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action. *Biochem. J.* **139**, 789 (1974).
- 15) Eisenthal, R. and Danson, M. J.: *Enzyme assays*. Oxford University, 275 (1992).
- 16) Lee, K. W., Chong, Y. S., Kwon, O. H., Park, H. S. and Kim, J. M.: Antimicrobial susceptibilities of bacteria isolates during 1988-1992. *J. Korean. Soc. Chemother.* **11**: 158 (1993).
- 17) Waxman, D. J. and Strominger, J. L.: Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 825 (1983).
- 18) Kirby, W. M.: Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* **99**, 452 (1944).
- 19) Markowitz, S. M.: Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase producing strain of *H. influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 302 (1980).