

# Staphylococcus aureus에 의한 유방염에 대한 $\beta$ -lactamase 저해제/ $\beta$ -lactam계 항균제 치료 효과

임숙경\*, 임재향<sup>1</sup>, 주이석, 문진산, 이애리<sup>2</sup>, 고흥범<sup>1</sup>  
국립수의과학검역원·전남대학교 동물의학연구소<sup>1</sup> 상명대학교<sup>2</sup>  
(게재승인: 2003년 1월 3일)

## Antimicrobial effects of $\beta$ -lactamase inhibitor/ $\beta$ -lactam antibiotics on staphylococcal mastitis

Suk-Kyung Lim\*, Jae-Hhyang Lim<sup>1</sup>, Yi-Seok Joo, Jin-San Moon, Ae-Ri Lee<sup>2</sup>, Hong-Bum Koh<sup>1</sup>  
National Veterinary Research & Quarantine Service · Research Institute of Veterinary Medicine,  
<sup>1</sup>Chonnam National University, <sup>2</sup>Sangmyung University  
(Accepted: January 3, 2003)

**Abstract:** The antimicrobial effect of  $\beta$ -lactam antibiotics, which had  $\beta$ -lactamase inhibitor activity, on *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis was investigated in this study. Out of 166 isolates, 99 isolates (59.6%) produced  $\beta$ -lactamase, and 98 isolates of 99 were  $\beta$ -lactamase positive in above 12.5  $\mu$ g/ml MIC of penicillin. In the providence distribution,  $\beta$ -lactamase production rate of 4 providence, Gangwon, Gyeonggi, Chungcheong, and Jeolla was 100%, 65.7%, 58.8%, and 50.0%, respectively. Antibiotic activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against lactamase positive isolates also were investigated. Antimicrobial effects of ampicillin/sulbactam or amoxicillin/clavulanic acid treated group were better than ampicillin or amoxicillin treated group. In antimicrobial effects on intracellular *S. aureus*, there was no difference 1 hour and 4 hour treatment in control, ampicillin, and amoxicillin group, but in 18 hours treatment, ampicillin/sulbactam or amoxicillin/clavulanic acid had a better effect than ampicillin or amoxicillin ( $p < 0.05$ ).

**Key words:**  $\beta$ -lactam,  $\beta$ -lactam inhibitor, lactamase, *Staphylococcus aureus*, mastitis, antimicrobial

## 서 론

$\beta$ -lactam계 항균제는 다른 항균제에 비하여 부작용이 적고 안전성이 있기 때문에 단독 또는 다른 항균제와 병용하여 오랫동안 유방염 치료제로 사용되어 왔다.  $\beta$ -lactam계 항균제는 세균의 세포벽 합성을 억제함으로써 항균 작용을 나타내며 이 항균제의 내성 기전은  $\beta$ -lactamase라는 효소를 산생하여  $\beta$ -lactam환의 amide 결합을 가수분해함으로써 penicillin이나 cephalosporine 등의 항균제를 무력화시키는 것으로 보고하고 있다<sup>1,2</sup>. 이러한 내성은  $\beta$ -lactamase 산생에 관여하되 plasmid가 transformation,

conjugation에 의하여 균체 간에 전달되는 것으로 알려져 있다<sup>3-5</sup>. 이러한 내성균의 출현으로  $\beta$ -lactamase에 저항하는 methicillin, oxacillin, nafcillin 등의 항균제가 개발되었으나 곧 이에 대한 내성균이 증가하고 있다<sup>6,7</sup>.

*Staphylococcus aureus*에 의한 유방염 발생 시 치료율이 높지 않기 때문에 목장에서 항균제를 남용해 온 결과, 국내 유방염 유래 *S. aureus*의 약 75%가 penicillin이나 ampicillin에 내성을 나타내며 다른 항균제 등과 중복 내성, 교차 내성으로 다약제 내성균의 출현 빈도가 점차 증가하고 있는 실정이다.<sup>8</sup> 그러나  $\beta$ -lactam계 항균제는 광범위 항균제로 streptococci나 다른 staphylococci 유방

\* Corresponding author: Suk-Kyung Lim  
National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 6 dong, Anyang 430-016, Korea  
Tel: 031-467-1770, Fax: 031-467-1778, E-mail: imsk@nvrqs, go.kr

염 세균에는 효능이 높기 때문에,<sup>9</sup> 유방염 치료 시 ampicillin이나 amoxicillin 등의  $\beta$ -lactam계 항균제 사용을 완전히 배제할 수 없는 실정이다. 따라서 유방염 치료에  $\beta$ -lactam계 항균제를 사용하기 위해서는 이 항균제의 주된 내성 기전으로 알려진  $\beta$ -lactamase 작용을 억제할 수 있는 저해제의 도입이 필요할 것으로 생각된다.

Clavulanic acid와 sulbactam은 광범위  $\beta$ -lactamase 저해제로  $\beta$ -lactam계 항균제와 병용하여 사용시 *S. aureus*를 포함하여 다양한 세균에 효능이 있는 것으로 보고되었다<sup>10,13</sup>.

본 실험에서는 유방염에서 분리한 *S. aureus*를 대상으로  $\beta$ -lactamase의 산생 여부를 조사하고  $\beta$ -lactamase를 산생하는 균에 대하여  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용한  $\beta$ -lactam계 항균제 효능을 검사하여 유방염 치료에 적용 가능성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주

1997년 3월부터 10월까지 전국 5개 지역 26개 목장의 유즙에서 분리한 *S. aureus*를 실험에 사용하였다.

### 2. 항균제

항균물질은  $\beta$ -lactam계 항균제인 ampicillin (Sigma, USA), amoxicillin (Sigma, USA)과  $\beta$ -lactamase 저해제인 clavulanic acid (Pfizer, USA), sulbactam (Pfizer, USA)을 제조사의 추천방법에 따라 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 3. 최소발육억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) 기준<sup>14</sup>에 따라 microdilution 법으로 실험하였다. 즉 항균제는 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)에 희석하여 96 well microplate (Costar, USA)에서 2진 희석하였으며 시험균은 brain heart infusion broth (BHI; Difco, USA)에서 하룻밤 배양하여 Mueller-Hinton broth (Difco, USA)에 최종 균의 수가  $5 \times 10^7$  CFU/ml이 되도록 조정하여 항균제 첨가배지에 접종하고 37°C에서 18~24시간 배양한 후 가장 낮은 농도의 약제가 함유된 배지에서 균 발육이 억제된 농도를 시험균의 약제에 대한 최소발육억제농도로 하였다.

### 4. $\beta$ -lactamase 산생능 조사

Cefinase disk (BBL, USA)에 멸균 증류수를 한 방울

떨어뜨리고 혈액배지에서 하룻밤 배양한 균의 집락을 도말한 후 실온에서 30분간 방치하여 적색 혹은 분홍색으로 변색한 것을  $\beta$ -lactamase 산생능 양성으로 판정하였다.

## 5. 호중구내 감염 시험

### 1) 호중구 분리

호중구는 소의 경정맥으로부터 채혈하여 항응고제인 acid citrate dextrose 용액에 잘 흔들여 준 후 Roth와 Kaerberle<sup>15</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 즉 혈액을 1,000×g에서 20분간 원심분리하고 buffy coat층을 제거한 다음 20 ml lysing액으로 용혈시킨 후 10 ml의 restoring액을 가하여 등장액이 되게 하였다. 이것을 1,500×g에서 5분간 원심분리하여 상청액을 제거하고 lysing액과 restoring액으로 다시 1회 이상 반복 처리한 후 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)으로 세포수를  $5 \times 10^6$ /ml 되도록 부유시켰다.

### 2) *S. aureus*의 세포 내 감염

소의 호중구 내 *S. aureus* 감염 실험은 Craven과 Anderson<sup>16</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 *S. aureus*는  $\beta$ -lactamase를 산생하면서  $\alpha$ 와  $\beta$  hemolysin을 산생하는 야외분리주를 사용하였다. 시험균은 혈액배지에 도말하여 하룻밤 배양한 후 수확하여 HBSS로 2회 세척한 후  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  CFU/ml 되도록 부유시켜, 균액을 호중구 부유액에 1 : 1의 비율로 혼합한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 세포 외에 존재하는 균을 제거하기 위하여 lysostaphin (5  $\mu$ g/ml, Sigma, USA)을 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 잔존하는 lysostaphin을 제거하기 위하여 HBSS로 3회 세척하고 12 well tissue culture plate (Costar, USA)에 37°C에서 30분간 정치하여 단층을 형성하였다. 부착되지 않는 세포를 제거하기 위하여 상층액은 제거하고 2 ml의 HBSS에 각각의 항균제를 희석하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간, 4시간, 18시간 반응시켰다. 단층은 HBSS로 2회 세척한 후 0.01% triton X-100 (Sigma, USA) 1 ml를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 BHI agar (Difco, USA)에 접종배양 하여 살아있는 세균의 집락수를 계산하였다.

## 6. 통계 분석

호중구 내 *S. aureus*에 대한 항균제의 효능은 repeated ANOVA를 이용하여 분석하였다. 세포 내 살아있는 *S. aureus*는 각각의 group당 4개의 plate에서 산출한 CFU/ml로 분석하였으며 감소율은 검사 시점의 대조군과 비교하여 산출하였다.

## 결 과

### $\beta$ -lactamase 산생능 조사

본 실험에 사용한 166주에 대해  $\beta$ -lactam계 항균제에 대한 내성과  $\beta$ -lactamase와의 상관성을 조사하기 위해  $\beta$ -lactamase 산생능을 조사한 결과 penicillin의 최소발육억제농도가 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상인 균주 중에서 1개 균주를 제외한 모든 균주가  $\beta$ -lactamase를 산생하였으며, 전체 166주 중 99주가  $\beta$ -lactamase를 산생하여 전체 균주의 59.6%가 산생하였다 (Table 1). 지역별로  $\beta$ -lactamase 산생능을 비교하여 보았을 때 강원 지역은 모든 균주가, 경기 지역은 65.7%가  $\beta$ -lactamase를 산생하였으며, 경상도를 제외한 4개 지역에서 50% 이상이  $\beta$ -lactamase를 생산하였다 (Table 2).

**Table 1.**  $\beta$ -lactamase production of *Staphylococcus aureus* isolates in relation to minimum inhibitory concentration of penicillin

MIC* for penicillin	$\beta$ -lactamase production (%)
$\leq 0.78$	0/57** (0)
1.56	0/5 (0)
3.13	1/6 (16.7)
12.5	1/1 (100)
50.0	8/8 (100)
100	9/10 (90.0)
>100	80/80 (100)
Total	99/166 (59.6)

\* MIC, Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

\*\* Positive strains/Tested strains.

**Table 2.**  $\beta$ -lactamase production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in geographic locations

Province	$\beta$ -lactamase production (%)
Gyeonggi	23/35* (65.7)
Chungcheong	63/107 (58.8)
Jeolla	7/14 (50.0)
Gyeongsang	0/4 (0)
Gangwon	6/6 (100)
Total	99/166 (59.6)

\* Positive strains/Tested strains.

### $\beta$ -lactamase저해제/ $\beta$ -lactam계 항균제의 최소발육억제농도

$\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus* 균주에 대하여  $\beta$ -lactamase 저해제를 사용함으로써  $\beta$ -lactam계 항균제 사용여가의 감소 효과를 조사하였다. 먼저 *S. aureus*에 대한  $\beta$ -lactamase 저해제의 최소발육억제농도를 검사한 결과 본 실험에서 sulbactam과 clavulanic acid는 MIC가 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상으로 *S. aureus* 균주에 대한 항균능은 인정되지 않았다. Ampicillin 단독 처리군에서 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 MIC를 나타낸 균들은 ampicillin/sulbactam으로 처리 시 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 MIC를 나타내었으며, MIC가 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상인 균들은 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 MIC를 나타내어 전반적으로 ampicillin 단독으로 처리한 군에 비하여 log<sub>2</sub> base로 계산하여 2 ~ 6 배 이상의 항균 효과가 있었다 (Table 3).

또한 amoxicillin의 MIC가 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하인 균들은 amoxicillin/clavulanic acid로 처리하였을 때 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 MIC를 나타내었으며, MIC가 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 나타낸 균들은 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 MIC를 나타내어 Log<sub>2</sub> base로 amoxicillin 단독으로 처리한 군에 비해 2 ~ 6 배 이상의 항균 효과가 있었다 (Table 4).

### 호중구 내 *S. aureus*에 대한 $\beta$ -lactamase 저해제/ $\beta$ -lactam계 항균제 효능

호중구 내 *S. aureus*에 대한 항균능을 조사하기 위하여 ampicillin과 ampicillin/sulbactam의 MIC 농도를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과 4시간 처리 시에 ampicillin/sulbactam 처리군은 대조군에 비하여 각각 14.0%와 12.8%가 감소하여 ampicillin 단독으로 처리한 군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 18시간 처리 시에는 대조군에 비해 각각 31.1%와 30.1% 감소하여 단독 처리군에 비하여 항균효과가 인정되었다 (Table 5). Amoxicillin과 amoxicillin/clavulanic acid의 MIC 농도를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과 4시간 처리 시에 amoxicillin을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서 15.9%가 감소하였으며, 18시간 처리 시에는 amoxicillin/clavulanic acid 처리군에서는 대조군에 비하여 35.7%와 37.8% 감소하여 단독 처리군에 비하여 유의성이 있는 차이가 인정되었다 (Table 6).

## 고 찰

$\beta$ -lactamase는  $\beta$ -lactam계 항균제 모핵 구조중의  $\beta$ -lactam환을 가수분해하는 세균이 산생하는 효소로 이미 노산 1차 서열의 상동성이나 등전점에 따라 A, B, C 및

**Table 3.** Minimum inhibitory concentrations of ampicillin/sulbactam for  $\beta$ -lactamase producing *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis

Strains	No. of Strains	MIC* for Ampicillin	MIC range	
			sulbactam	ampicillin/sulbactam**
$\beta$ -lactamase producing strains	6	8	$\geq 128$	<1~2
	18	16	$\geq 128$	<1~2
	9	32	$\geq 128$	<1~4
	18	64	$\geq 128$	<1~8
	38	128	$\geq 128$	8~16
	5	256	$\geq 128$	8~16
	3	512	$\geq 128$	16~32
1	>512	$\geq 128$	32	
$\beta$ -lactamase non-producing strains	6	<1	$\geq 128$	<1

\* MIC, Minimum Inhibitory Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). \*\* Ampicillin and sulbactam combined with 2:1 ratio.

**Table 4.** Minimum inhibitory concentrations of amoxicillin/clavulanic acid for  $\beta$ -lactamase producing *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis

Strains	No. of Strain	MIC for Amoxicillin	MIC range	
			clavulanic acid	amoxicillin/clavulanic acid*
$\beta$ -lactamase producing strains	1	4	$\geq 128$	<1
	10	8	$\geq 128$	<1~2
	20	16	$\geq 128$	<1~2
	4	32	$\geq 128$	2
	16	64	$\geq 128$	2~4
	22	128	$\geq 128$	2~4
	10	256	$\geq 128$	4~16
	8	512	$\geq 128$	8~32
$\beta$ -lactamase non-producing strains	6	<1	$\geq 128$	<1

\* MIC, Minimum Inhibitory Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). \*\* Amoxicillin and clavulanic acid combined with 2:1 ratio.

D type)으로 분류한다.<sup>17</sup> 이러한  $\beta$ -lactamase 산생균에 대한 대책은  $\beta$ -lactamase에 안정한 항균제를 개발하거나,  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용하는 방법이 있다. 그러나  $\beta$ -lactamase에 저항하는 반합성 페니실린제제인 cloxacillin은 건유기 치료제로 널리 이용되어 왔으나 penicillin에 비하여 치료효과가 낮으며, 효능범위도 넓지 않아 그람 음성 세균이나 다른 유방염 원인균에는 감수성이 낮아 광범위 항균제로 cloxacillin의 사용은 부적절하다. 그리

고 광범위 항균제인 tetracycline, chloramphenicol은 MIC가 높기 때문에 유방 내에 투여할 수 있는 농도를 유지하는 것이 쉽지 않다.<sup>9</sup>

최근에는  $\beta$ -lactamase의 효소활성 중심을 차단하여  $\beta$ -lactamase의 가수분해를 막아서 항균력을 잃게 하는  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용하는 항균요법이 이용되고 있다. 지금까지 개발된  $\beta$ -lactamase 저해제는 tazobactam, sulbactam, clavulanic acid로 그 자체로는 항균작용이 거의

**Table 5.** Effect of ampicillin and ampicillin/sulbactam on the  $\beta$ -lactamase producing of *Staphylococcus aureus* isolates within bovine polymorphonuclear neutrophils (n=4)

Antibiotics		1 hour		4 hours		18 hours	
MIC		Log10 bacterial count (CFU/ml)*	Reduction (%)**	Log10 bacterial count (CFU/ml)	Reduction (%)	Log10 bacterial count (CFU/ml)	Reduction (%)
10	Ampicillin	5.73±0.03	7.13	5.81±0.04	11.16	6.48±0.24	12.66
$\mu$ g/ml	Ampicillin/Sulbactam	5.75±0.07	6.80	5.62±0.08	14.06	5.11±0.02	31.13***
1	Ampicillin	5.86±0.04	5.00	5.87±0.04	10.24	7.34±0.03	10.78
$\mu$ g/ml	Ampicillin/Sulbactam	5.83±0.06	5.51	5.70±0.05	12.84	5.18±0.04	30.18***
	Control	6.17±0.07	0	6.54±0.02	0	7.42±0.03	0

MIC, Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu$ g/ml). \* Mean±standard deviation. \*\* All percentages of reductions are calculated based on comparisons to the untreated control. \*\*\* Significantly different (p<0.05) from the control.

**Table 6.** Effect of amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid on the  $\beta$ -lactamase producing of *Staphylococcus aureus* isolates within bovine polymorphonuclear neutrophils (n=4)

Antibiotics		1 hour		4 hours		18 hours	
MIC		Log10 bacterial count(CFU/ml)*	Reduction (%)**	Log10 bacterial count(CFU/ml)	Reduction (%)	Log10 bacterial count(CFU/ml)	Reduction (%)
10	Amoxicillin	5.59±0.09	9.40	5.50±0.02	15.90	6.47±0.19	12.80
$\mu$ g/ml	Amoxicillin/Clavulanic acid	6.02±0.14	2.43	6.01±0.06	8.10	4.77±0.04	35.71***
1	Amoxicillin	5.90±0.19	4.37	5.90±0.04	9.78	7.15±0.01	3.63
$\mu$ g/ml	Amoxicillin/Clavulanic acid	5.92±0.03	4.05	5.91±0.05	9.63	4.61±0.56	37.87***
	Control	6.17±0.07	0	6.54±0.02	0	7.42±0.03	0

MIC, Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu$ g/ml). \* Mean±standard deviation. \*\* All percentages of reductions are calculated based on comparisons to the untreated control. \*\*\* Significantly different (p<0.05) from the control.

없으며  $\beta$ -lactam 항균제의 구조와 유사하여,  $\beta$ -lactam계 항균제와 경쟁적으로  $\beta$ -lactamase와 결합하여 저해제 자신도 파괴되고 효소도 파괴시키는 비가역성 저해제에 임상에 이용되고 있다.<sup>18</sup>

국내 유방염 원인균 중 가장 문제시되고 있는 *S. aureus*는 항균제에 대한 내성율도 가장 높으며, 이 중 penicillin이나 ampicillin 등의  $\beta$ -lactam계 항균제에 대한 내성율은 해마다 증가하는 추세이다.<sup>19,21</sup> 또한 유방염은 단독 감염보다는 대부분 2종 이상의 세균이 혼합 감염

된 경우가 많으며 이 중  $\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus*와 다른 세균과의 감염이 흔히 관찰된다. 따라서 국내 유방염 치료에 있어 *S. aureus* 이외의 다른 세균에 효과적인 광범위 항생제와  $\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus*에 효과적인 치료법이 요구되고 있다. 지금까지 여러 연구자들에 의해  $\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus*에 대해  $\beta$ -lactamase 저해제인 YTR 830과  $\beta$ -lactam계 항생제인 ampicillin과 amoxicillin 등의 항생제를 병용하여 사용한 결과 탁월한 효능이 있는 것으로 보고하였으며<sup>11</sup>, 최근

에는 사람에서 문제시되고 있는 methicillin 내성 *S. aureus*에 대해서도 amoxicillin/clavulanate와 ampicillin/sulbactam이 효능이 우수한 것으로 보고 되었다.<sup>22,23</sup>

본 실험에서는 유방염 유래 *S. aureus*에 대한  $\beta$ -lactamase 산생능을 조사하기 위하여 비교적 민감한 방법으로 알려진 chromogenic 법으로 검사하였다.<sup>24</sup> 검사 결과 본 실험에 사용한 분리주 중 59.6%가  $\beta$ -lactamase를 산생하였으며, penicillin 내성균의 대부분이 이 효소를 산생하고 있어 penicillin에 대한 내성은 내성의 주된 기전으로 알려진  $\beta$ -lactamase의 산생과 관련이 있음을 알 수 있었다. 그러나 penicillin에 내성을 나타내었으나  $\beta$ -lactamase를 산생하지 않았던 6개 분리주주는 이 효소의 산생량이 낮아 본 실험에서 사용한 cefinase disk로는 검출되지 않았거나 또 다른 내성 기전인 penicillin 결합 단백질의 penicillin과 결합 친화성이 낮기 때문으로 생각된다.<sup>25</sup>

$\beta$ -lactamase를 산생하는 균주들에 대하여  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용한  $\beta$ -lactam계 항균제의 효능을 검사하기 위하여  $\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus*에 대하여 sulbactam과 clavulanic acid를  $\beta$ -lactam계 항균제와 병용하여 그 효능을 조사하였다. 먼저 최소발육억제농도 실험에서 sulbactam, clavulanic acid은 항균효과는 인정되지 않았으며 ampicillin/sulbactam과 amoxicillin/clavulanic acid 공히 단독으로 사용한 것보다  $\log_2$  base로 계산하여 2~6 배 정도의 항균 효과가 있었으나 각 균주별 항균제의 효능이 다르게 나타났다. 이와 같은 결과는 본 실험에서 사용한 균주들이 산생하는  $\beta$ -lactamase의 type이 다른 것으로 생각된다. 즉  $\beta$ -lactamase type C가 type A에 비하여 piperacillin이나 amoxicillin에 더 단단하게 결합하는 것으로 보고되어,<sup>26</sup> 이는  $\beta$ -lactamase type에 따라 항균제와 결합력이 다르기 때문으로 생각된다. Fasola *et al*<sup>27</sup>은 cefoperazone/sulbactam의 조합이 ampicillin이나 penicillin보다 효능이 더 우수한 것으로 보고하였으며 Aronoff *et al*<sup>28</sup>은 mice 접종 시험에서 amoxicillin/clavulanate가 amoxicillin/YTR830 보다 효능이 우수하다고 보고하여, 다양한 저해제와  $\beta$ -lactam계 항균제와의 조합을 검사하여 적절한 저해제의 선택이 중요함을 시사하였다.

유방염에서 항균제의 치료 효과가 높지 않은 이유는 낮은 농도와 짧은 치료기간 등으로 치료될 수 있을 정도의 적정 농도가 감염 부위에 일정기간 유지되지 못하기 때문이며, 약물학적 측면에서 불 때 흡수부전, 분해, 항균제의 혈액-우유의 barrier 전달, 우유나 serum protein과의 결합 등 여러 가지 요인이 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup> 그리고 *S. aureus*는 다형핵백혈구 내에 들어가서 다형핵백혈구의 용균 작용으로부터 회피할 수

있으며, 세포 내에서는 분열하지 않고 잠복 감염되어 있어 항균제의 치료 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 즉 세포 내에 감염된 staphylococci에 항균제가 효능을 발휘하기 위하여 세포 내로 침투할 수 있어야하며 세포 내에서 분열하지 않는 세균도 사멸시킬 수 있어야 된다. 그러나 erythromycin, novobiocin, streptomycin, penicillin 등의 항균제는 세포 안의 세균에 대하여는 항균효과가 없으며 cloxacillin, nafcillin, cephadrine 등은 세포내의 세균을 죽이지는 못하지만 손상을 주어 lysostaphin과 같은 용균효소의 작용에 대하여 보다 민감하게 반응할 수 있게 한다.<sup>16</sup>

따라서 본 실험에서는 젖소의 호중구에 감염시킨 후 18시간까지 항균제의 농도를 다르게 처리하여 살아있는 세균수를 조사하였다. 그 결과 대체로 항균제 농도가 높은 군에서는 세균수가 낮게 조사되었으나 낮은 군과 유의성 있는 차이는 없는 것으로 조사되었다. 또한 4시간까지는  $\beta$ -lactam계 항균제를 단독으로 처리한 그룹 및 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 18시간 이후에는  $\beta$ -lactamase 저해제와 함께 사용하는 군에서 효능이 인정되었다 ( $p < 0.05$ ). 이와 같은 결과는 Cuffini *et al*<sup>29</sup>의 보고와 같이 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 amoxicillin/clavulanic acid가 amoxicillin 단독으로 처리한 군 및 대조군에 비하여 시간이 경과함에 따라 다형핵백혈구의 식균작용 및 항균효과가 있다는 성적과 유사한 결과를 나타내었다. 본 실험에서도 18시간 이후에는 ampicillin/sulbactam 처리 시 대조군에 비하여 10 MIC 처리군에서 31%, 1 MIC 처리군에서 30%의 세균수가 감소하였으며, amoxicillin/clavulanic acid 처리시 10 MIC, 1 MIC 처리군에서 각각 35%와 37%의 감소를 나타내었다. Madgwick *et al*<sup>30</sup>은 penicillin, chloramphenicol 및 erythromycin에 대해 staphylococci가 감염된 호중구 내에 이들 항균제의 세포 내 투과능과 항균능을 조사한 결과 penicillin이 세포내의 농도는 다른 항균제에 비하여 높지 않으나 항균능은 가장 높은 것으로 보고하였다. 본 실험 결과에서도 시간이 경과함에 따라 호중구 내에 감염된 *S. aureus*가 감염 세포의 세포막 투과성에 영향을 주어 항균제가 세포 안으로 들어 갈 수 있었으며 항균제가 세포 내 감염된 *S. aureus*에 항균효과를 발휘했을 것으로 생각된다.

본 연구 결과  $\beta$ -lactamase를 산생하는 *S. aureus*에 대해서  $\beta$ -lactamase 저해제와 함께 사용시  $\beta$ -lactam계 항균제 효능이 인정되었다. 그러나 세포내에 감염된 *S. aureus*에 대하여서는 항균효과가 높지않기 때문에 tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  등<sup>31</sup>과 용균작용이 있는 것으로 알려진 lysostaphin과 병용하여 사용시 큰 효과가 있을 것

으로 생각된다. 따라서 이러한 자료를 기초로 하여 포유 마우스, 소 유방염에서의 적용 시험을 통하여  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용한  $\beta$ -lactam계 항균제를 유방염 치료제로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

유방염에 감염된 소의 유즙에서 분리한 166주의 *S. aureus*에 대하여  $\beta$ -lactamase 산생능을 조사한 결과 59.6% (99주)가  $\beta$ -lactamase를 산생하였으며, penicillin의 발육억제 농도 12.5  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 1주를 제외한 모든 균주가  $\beta$ -lactamase를 산생하였으며, 지역별로는 경상도를 제외한 4개 지역에서 분리한 균의 50% 이상이  $\beta$ -lactamase를 산생하였다.

Beta-lactamase를 산생하는 균들에 대해서  $\beta$ -lactamase 저해제를 이용한  $\beta$ -lactam계 항균제의 효능을 조사한 결과 ampicillin/sulbactam과 amoxicillin/clavulanic acid 처리군이 ampicillin, amoxicillin 단독 처리군에 비해  $\log_2$  base로 2~6배의 항균 효과가 인정되었다.

호중구 내에 감염된 *S. aureus*에 대한 항균능을 조사한 결과 1시간, 4시간 처리 시에는 대조군 및 ampicillin이나 amoxicillin 단독으로 처리한 그룹과 비교하여 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나, 18시간 이후에는 ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid 공히 ampicillin, amoxicillin 단독 처리군 보다 세균수가 낮게 나타나 호중구내의 *S. aureus*에 대하여 효능이 인정되었다 ( $p < 0.05$ ).

## 참고문헌

- Ogawa H. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Micro Biol Rev*, 45: 591-619, 1981.
- Medeiros AA. Beta-lactamase. *Br Med Bull*, 40: 18-27, 1984.
- Hackbarth CJ, Chamber HF. *Blal* and *BlarI* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agent Chemother*, 37: 1144-1149, 1993.
- Mubammad G, Hoblet KH, Jackwood DJ, et al. Interspecific conjugal transfer of antibiotic resistance among staphylococci isolated from the bovine mammary gland. *Am J Vet Res*, 54: 1432-1440, 1993.
- Okamoto R., Okubo T, Inoue M. Detection of genes regulating beta lactamase production in *Enterococcus*

*faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agent Chemother*, 40: 2550-2554, 1996.

- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol Rev*, 51: 88-134, 1987.
- Thomson-Carter FM, Carter PE, Pennington TH. Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol*, 135: 2093-2097, 1989.
- 김태중, 박찬일, 김윤식 등. 유즙에서 분리된 포도구균속의 분리율, 항생제 감수성 및 plasmid의 특성 분석에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, 21: 209-218, 1997.
- Sandholm ML, Kaartinen L, Pyorala S. Bovine mastitis: Why does antibiotics therapy not always work? An overview. *J Vet Pharmacol Ther*, 13: 248-260, 1990.
- Aronoff SC, Jacobs MR, Johennig S. Comparative activities of the beta-lactamase inhibitors YTR830, sodium clavulanate and sulbactam, combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrob Agent Chemother*, 26: 580-582, 1984
- Aronoff SC, Jacobs MR, Labrozzi PH, et al. Synergy of amoxicillin combined with clavulanate and YTR830 in experimental infections in mice. *J Antimicrobial Chemotherapy*, 18: 271-276, 1986.
- Kouda M, Kumagai I, Kobayashi J, et al. Combined effect of sulbactam/cefoperazone and other antibiotics against clinical isolates of multi-resistant strains. 1. Effect of sulbactam against beta-lactams resistant strains and in vitro combined effect of sulbactam/cefoperazone with each of piperacillin, latamoxef, ceftazidime, fosfomicin, and doxycycline. *Jpn J Antibiot*, 43: 636-658, 1990.
- Kernodle DS, Kaiser, AB. Efficacy of prophylaxis with  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactamase inhibitor combination against wound infection by methicillin resistant and borderline-susceptible *Staphylococcus aureus* in a guinea pig model. *Antimicrob Agent Chemother*, 37: 702-707, 1993.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4, 1997.
- Roth JA, Kaeberle ML. Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. *J Immun*

- Method*, 45: 153-164, 1981.
16. Craven N, Anderson JC. The effect of cloxacillin on staphylococci phagocytosed by bovine neutrophils. *Res Vet Sci*, 29: 57-62, 1980.
  17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA, *et al.* A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agent Chemother*, 39: 1211-1233, 1995.
  18. Alpuche-Aranda CM. Beta-lactamase production and the role of ampicillin/sulbactam. *Pediatr. Infect Dis J*, 17: S8-S11, 1998.
  19. 김홍수, 홍순국, 소경택 등. 충남지역 유우 유방염의 감염을 및 원인균에 관한 연구. *대한수의학회지*, 14: 91-97, 1974.
  20. 한규삼. 전북지역에서 사육되는 유우의 유방염 감염 실태 조사. *대한수의사회지*, 22: 633-637, 1986.
  21. 손봉환. 유방염 감염조사 및 예방대책에 관한 연구. 최근 3년간 (1991-1993) 유방염 감염 실태에 관한 최종 보고서. *가축위생학회지* 단행본, 1994.
  22. Chin NX, Neu NM, Neu HC. Synergy of sulbactam and ampicillin against methicillin resistant staphylococci. *Drug Exp Clin Res*, 12: 939-942, 1986.
  23. Moreillon P. The efficacy of amoxicillin/clavulanate (augmentin) in the treatment of severe staphylococcal infections. *J Chemother*, 6: 51-57, 1994.
  24. Owens EW, Watts JL. Antimicrobial susceptibility and  $\beta$ -lactamase testing of staphylococci isolated from dairy herds. *J Dairy Sci*, 71: 1934-1939, 1988.
  25. Chambers HF, Sachdeva MJ, Hackbarth, CJ, *et al.* Kinetics of penicillin binding to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem J*, 301: 139-144, 1994.
  26. Bonfiglio G, Livermore DM. Beta-lactamase types among *Staphylococcus aureus* isolates in relation to susceptibility to  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother*, 33: 465-481, 1994.
  27. Fasola JD. T-cell recognition of superantigen. *Res Immuno*, 144: 173-174, 1993.
  28. Sandholm M, Kaartinen L, Hyvonen P, *et al.* Floation of mastitis pathogens with cream from subclinically infected quarters prospects for developing a cream-rising test for detecting mastitis caused by major mastitis pathogens. *Zentralbl Veterinarmed(B)*, 36: 27-34, 1989.
  29. Cuffini AM, Tullio V, Allocco A, *et al.* The antibacterial of amoxicillin/clavulanic acid against *Staphylococcus aureus* ingested by human granulocyte. *Microbios*, 87: 31-38, 1996.
  30. Madgwick L, Mayer S, Keen P. Penetration of antibiotics into bovine neutrophils and their activity against intracellular *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 24: 709-718, 1989.
  31. Sanchez MS, Ford CW, Yancey RJ. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and antibiotics on the killing of intracellular *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, 77: 1251-1258, 1994.