

Metallo- β -lactamase를 생성하여 Imipenem에 내성인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균제 병합요법의 효과

홍승복* · 김홍철 · 이장원 · 손승렬*

단국대학교 첨단과학부 미생물학전공 및 기초과학연구소

*현주소: 충북청원군 내수읍 주성대학교 임상 병리학과

국내 대학병원에서 분리되어 imipenem에 대한 최소억제농도가 8 μ g/ml 이상인 51개의 포도당 비발효 그람음성 간균들 중 metallo- β -lactamase (MBL)을 생성하는 균주들을 분리하고, 그들 중에서 내성이 강한 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균제 병합요법의 효과를 알아보기 위하여 상승효과를 보이는 항균제 조합을 찾아보았다. 9개의 균주(*Pseudomonas aeruginosa* 2주 및 *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* 7주)가 MBL 양성을 나타냈으며, PCR 결과 9주 모두에서 *bla_{VM-2}* 유전자가 관찰되었다. 이들 중에서 *P. aeruginosa* DK569는 aztreonam (MIC: 8 μ g/ml)을 제외하고 실험한 모든 β -lactam 항균제, aminoglycoside, ciprofloxacin에 내성을 보여 aztreonam 함유 배지를 이용하여 상승효과를 보이는 항균제를 찾고자 하였다. One disk synergy test에서 선별된 항균제 조합을 이용하여 생존률 검사 실험을 한 결과, aztreonam (AZT)와 piperacillin-tazobactam (TZP)의 병합은 항균제 노출 6시간 후에 AZT 또는 TZP의 단독 항균제 노출시 보다 균수가 1/18.7로 감소하였다. 그리고 AZT와 amikacin (AN)의 병합에서도 항균제 노출 6시간 후에 AZT 또는 AN의 단독 항균제의 부여보다 균수가 1/17.1로 감소하였다. 결국 위 두 조합은 의미있는 상승효과를 보이지 못하여 위 세 항균제를 조합하여 실험하였다. 위의 세 항균제를 병합하였을 때 항균제 노출 8시간 후에 AZT, TZP 및 AN의 단독 부여에 비하여 병합요법에 의해 균수가 1/183.3로 감소하여 의미있는 상승효과를 보였다. 이 결과는 치료가 쉽지 않은 MBL 생성균에 의한 감염에 대한 치료에 AZT, TZP 및 AN의 세 가지 항균제 병합요법이 유용할 것이라는 것을 의미한다.

Key words □ combination therapy, MBL, *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*는 폐렴(17%, 2nd), 비노기계 감염(11%, 3rd), 창상감염(8%, 4th), 패혈증(3%, 7th) 등의 원내감염의 원인이 될 수 있으며, 모든 원내감염 중에서 5번째로 많은 균으로 보고되고 있다(2). 이 균에 의한 원내 감염들의 정확한 전파의 원인을 모두 밝히기는 어려우나 대부분 호흡기, 내시경, 오염된 소독제, 비누 등에 의한 것으로 추정되며, 자주 의료인의 손을 통해서도 전파된다(4). Carbapenem 항균제는 *Streptomyces cattleya*에서 생성된 thienamycin의 유도체로 penicillin 환의 첫 번째 위치의 sulfur 원소가 탄소로 대체되어 있다. 그리고 다른 β -lactam 항균제에 있는 aminoacyl 측쇄를(*cis* 구조) 갖지 않고 hydroxylethyl 측쇄가 *trans* 구조로 되어 있어 대부분의 β -lactamase에 안정하다고 알려져 있다(15). 기존의 β -lactam제는 주로 penicillin binding protein (PBP)-3과 결합하여 세포벽 합성을 억제하는데 반해서 carbapenem은 PBP-1a, 1b 뿐 아니라 PBP-2와도 결합하여 빠른 살균(bactericidal) 효과를 보이고 성장이 정지된 균에서도 항균효과를 발휘할 수 있다(9). 또한 carbapenem은 분자량이 작고(MW; 299) 양성 하전 및 친수성 구조이므로 세포 내로 잘 투과되어 그람양성균 및 그람음성균에

대해서 우수한 항균력을 보인다(21). 특히 대부분의 항균제에 자주 내성을 보이는 *P. aeruginosa*에 대해서도 우수한 항균력을 보이므로 단독치료제, 또는 호중구 감소증 환자 및 cystic fibrosis 환자에게 aminoglycoside 항균제와 병합하여 자주 사용되는 귀중한 항균제이다(6).

최근 carbapenem 항균제 사용이 증가하면서 carbapenemase 생성균에 대한 보고가 증가되고 있다. Carbapenem을 가장 잘 분해하는 효소는 β -lactamase의 일종으로서, 활성을 위해 zinc와 같은 metal 이온이 필요하기 때문에 metallo- β -lactamase (MBL)로 명명되었다(20). 최근에는 *P. aeruginosa*와 같은 포도당 비발효 그람음성 세균(23) 뿐만 아니라 *Serratia marcescens* (18), *Enterobacter cloacae* (10) 등의 장내세균에서도 MBL의 검출이 증가되고 있다. MBL은 그람음성 세균이 생성하는 β -lactamase 중 활성 범위가 가장 넓어서 carbapenem을 포함하여 대부분의 β -lactam 항균제를 가수분해하므로 이들 균에 의한 감염 치료에 커다란 문제를 야기하고 있다(17).

최근에 MBL 생성균에 의한 감염의 치료제 개발에 대한 연구가 진행되고 있는데, Watanabe 등(22)은 penam 핵의 2번째 탄소 위치에 카복실기를 첨가한 2-carboxypenam (T-5575)이 MBL를 포함하는 대부분의 β -lactamase에 안정하며 우수한 항균효과를 보였다고 하였고(12), Nagano 등(16)은 1- β -methylcarbapenem 유

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-550-3455, Fax: 82-41-550-3409
E-mail: syson@dankook.ac.kr

도체가 IMP-1형 MBL를 억제하며, imipenem 또는 ceftazidime과 혼합하여 의미 있는 상승효과를 보였다고 하였다. 그러나 아직까지 MBL를 효과적으로 억제하는 물질에 대한 연구는 소수이며, 임상적으로 사용되기 위해서는 오랜 시간이 소요될 것이다. 따라서 지금까지 개발된 항균제 중에서 선택해서 사용해야 하고, 하나의 대안으로 항균제 병합요법을 고려할 수 있으나 아직까지 MBL 생성 균에 대한 항균제 상승효과에 대한 연구는 매우 드문 실정이다. 항균제의 병합은 i) 내성균주의 발생 억제 ii) 약물농도의 감소에 의한 독성 발생의 감소 iii) 여러 종류의 균에 의한 감염 iv) 항균제들 상호간의 상승효과에 대한 기대 등의 이유로 이용된다(1). 항균제 상승효과에 대한 실험은 checkerboard 및 생존률검사 실험(time-killing curve)에 의한 방법이 잘 알려져 있다. Checkerboard 실험은 다양한 항균제 조합에 대한 실험이 가능하나 재현성이 부족하며, 정균(bacteriostatic) 효과만 볼 수 있다는 단점이 있다(3, 5). 생존률검사 실험은 항균제 병합에 의한 살균(bactericidal) 효과를 반영하며 *in vivo*의 결과와 가장 잘 일치한다고 알려져 있다. 그러나 지루한 방법 등으로 인한 시간 및 노력이 많이 소요되는 단점이 있고, 병합할 수 있는 항균제의 조합도 제한될 수 밖에 없는 실정이다.

생존률검사 실험에서 상승효과에 대한 정의 및 방법의 표준화가 이루어지지 않았지만 가장 항균력이 강한 항균제보다, 병합에 의해 1/100 이하로 균을 감소시켰을 때 상승효과가 있다고 정의한다(14). 이 정의는 그람양성구균, 특히 *Enterococcus spp.*에서는 상승효과를 잘 예측할 수 있으나 그람음성 간균에서는 24시간 후 재증식(regrowth) 때문에 상승효과를 예측하는 데에는 제한이 있다. 그람음성 간균은 실험관 내에서 자주 응집(aggregation) 또는 biofilm을 형성할 수 있기 때문에 집락 내부의 균은 노출되는 항균제의 농도가 낮을 수 있으며, 또한 성장 속도가 느려져 항균제에 대한 감수성도 저하된다고 한다(8). 뿐만 아니라 β -lactam제는 시간이 경과하면 시험관 내에서 활성을 잃을 수도 있다. 이와 같은 이유로 그람음성 간균은 24시간 후에 재증식이 일어나 상승효과를 예측할 수 없으므로 항균제 노출 후 6-8시간의 결과가 상승효과를 예측하는데 유용하다고 알려져 있다(1). 실제로 대부분의 β -lactam 항균제는 8시간 이내에 반복 투여되므로 임상적으로도 이 방법이 의미 있을 것이라 사료된다.

본 연구에서는 아직까지 MBL 생성균에 의한 감염의 효과적인 치료제가 없는 상황에서 이들 균에 의한 감염의 치료에 도움이 되고자 상승효과를 보이는 항균제 조합효과를 분석하였다.

재료 및 방법

대상 균주

2001년 3월부터 2003년 12월까지 국내 대학병원에서 분리된 *P. aeruginosa* 및 포도당 비발효균 중에서 Vitek 및 디스크 확산법에서 imipenem에 대해 내성인 균주를 대상으로 미량액체배지 희석법(microbroth dilution method)으로 imipenem에 대한 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하여 NCCLS guideline에 의한 내성 기준이 16 μ g/ml 이므로 대상균

주의 범위를 약간 넓히기 위하여 MIC가 8 μ g/ml 이상인 균들을 선별하였다. 균의 동정과 MBL 생성확인애 이어서 imipenem에 대한 MIC가 256 μ g/ml인 *P. aeruginosa* DK569를 본 실험의 주 대상으로 하였다.

균의 동정

균의 동정은 전통적인 생화학적 검사 및 미생물 자동 동정기인 Vitek system (bioMerieux Inc., Hazelwood, USA)을 이용하였으며, MBL 생성균은 API 20NE (bioMerieux, Marcy l' Eltoile, France) 및 16S rDNA 염기서열 분석으로 확인하였다.

Metallo- β -lactamase 생성 선별실험

Lec 등(11)의 방법대로 EDTA double disk synergy test (EDTA-DDS, 이중 디스크 상승효과 검사)를 시행하였으며 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 하룻밤 동안 배양한 균주를 McFarland 0.5관에 맞추고 MH (Mueller-Hinton) 배지에 접종하였다. 0.5 M EDTA 용액은 disodium EDTA \cdot 2H₂O (Sigma, St. Louis, USA) 186.1 g을 1,000 ml의 증류수에 녹이고 NaOH로 pH 8.0에 맞춘 후 멸균하여 사용하였다. 10 μ g imipenem 디스크와 0.5 M EDTA용액 10 μ l를 떨어뜨린 디스크를 디스크간 거리가 10 mm되게 하여 16-18시간 동안 배양하였다. 이어서 두 디스크 사이에 억제대가 새로 생기거나 억제대가 커지면 MBL 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

상승효과를 보이는 항균제의 선별 및 생존률검사(time-killing) 실험

상승효과를 보이는 항균제의 선별검사

우선 MBL 생성 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 최소억제 농도가 가장 낮은 aztreonam (MIC; 8 μ g/ml)과 여러 가지 β -

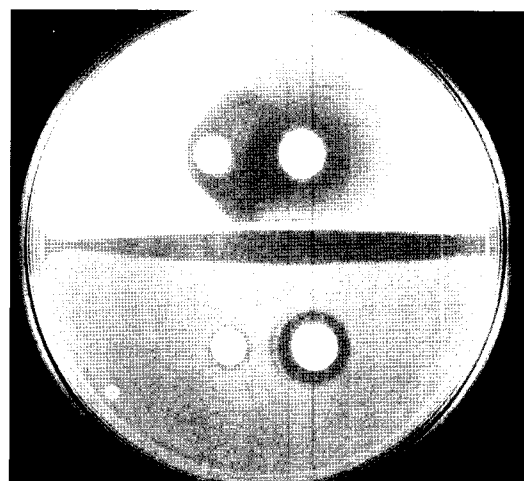


Fig. 1. EDTA double disk synergy test for metallo- β -lactamase producing (upper) and non-producing (lower) *Pseudomonas aeruginosa*. The right disk contains 0.5 M EDTA and the left disk contains 10 μ g of imipenem.

lactam제, 그리고 aminoglycoside, ciprofloxacin, vancomycin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole의 병합효과를 디스크 확산법으로 선별하였다(one disk synergy test). 상승효과에 대한 선별검사를 위해 aztreonam (AZT)의 sub-MIC (1/2 MIC, 4 µg/ml) 배지를 제조하였다. AZT 4 µg 배지에 위에서 McFarland 0.5관의 탁도에 맞춘 균을 접종한 후 위에서 열거한 항균제 디스크를 올려놓고 37°C에서 16~18시간 배양하였다. 이때 동시에 항균제를 첨가하지 않은 MH 배지에 상기 항균제 디스크를 올려놓고 AZT 4 µg 배지의 억제대와 비교하였다. 상승효과의 판정은 Pestel 등(19)의 방법에 따라 상승효과를 정량화 하였다. 우선 항균제를 넣지 않은 배지(S₁)에서 감수성(S), 중간내성(I), 저항성(R)에 따라 각각 2, 1, 0점을 부여하였다. 항균제를 넣은 배지에서 억제대의 직경이 항균제를 넣지 않은 배지의 억제대 직경과 비교하여 감수성 양상이 변할 경우(S₂) 점수를 차등화하여 부여하였다. 즉 R→I, I→S의 경우 2점, R→S의 경우 3점, S→S이나 억제대 직경이 증가한 경우는 1점, 그 이외에는 0점을 부여하였다. 상승효과의 최종 판정은 S₁과 S₂의 합(S₃)으로 판정하였는데, 1점의 경우 weak, 2점은 moderate, 그리고 3점은 strong으로 각각 판정하였다. AZT 4 µg 배지에서 상승효과를 보인 5가지 항균제에 대해 sub-MIC 배지를 제조하여 상승효과를 다시 확인하였다.

생존률검사(time-killing curve)

One disk synergy test에서 상승효과가 가장 큰 항균제 조합을 선택하여 생존률검사 curve를 작성하였다. 우선 AZT과 piperacillin-tazobactam (TZP)의 병합에 의한 상승효과가 가장 컸기 때문에 선택하였고, AZT과 amikacin (AN)의 병합은 synergy

score는 weak이었지만 증가된 억제대가 가장 컸기 때문에 선택하였다. 마지막으로 AZT, TZP 및 AN의 삼중 병합에 의한 상승효과도 실험하였다.

생존률검사 curve를 작성하기 위하여 AZT의 경우 1/2 MIC (최종농도 4 µg/ml)을 선택하였고 TZP도 1/2 MIC (32 µg/ml)을 선택하였다. 그러나 AN의 경우 MIC가 >256 µg/ml로 1/2 MIC (128 µg/ml)은 혈중 범위에 도달할 수 없는 농도였다. 따라서 치료적 혈중 농도를 기준으로 16 µg/ml (치료범위; 10~25 µg/ml, 독성범위: ≥35 µg/ml)를 선택하였다. 삼중 병합요법은 위에서 사용한 각각의 항균제 농도대로 시행하였다.

균 접종 농도는 MH 액체배지 7.6 ml에 McFarland 0.5관 (1×10⁸ CFU/ml)의 균액 0.4 ml를 넣어 최종 균 농도가 5×10⁶ CFU/ml가 되게 하였다. 이어서 0시간, 3시간, 6시간, 24시간 또는 0시간, 4시간, 8시간, 24시간 배양 후에 각각의 균수를 측정하였다. 균수는 Eliopoulos 방법(5)대로 시행하였는데, 각 시간마다 0.5 ml를 취하여 0.45% 생리식염수 4.5 ml에 섞어 10¹부터 10⁸까지 계단 희석하여 이 중 25 µl를 취하여 BAP에 접종하였다. 균수의 계산은 희석배수(10ⁿ)×40×균수로 계산하였다.

결과 및 고찰

Vitek system 및 디스크 확산법에서 imipenem에 내성인 94 균주가 선별되었으며, 이중 imipenem에 대한 미량액체 배지 희석법에서 MIC가 8 µg/ml 이상 균주는 51균주였다. 이들 51개의 균주는 *P. aeruginosa*가 44균주였고, *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*가 7균주였다. Imipenem의 MIC가 8 µg/ml 이상인 51균주 중 EDTA double disk synergy test 결과가 양성인 MBL

Table 1. Synergistic bacteriostatic effects of different combinations of β-lactams and aminoglycosides against *P. aeruginosa* DK569

Agar with 0.5 MIC of Antibiotics (µg/ml)		Antibiotic disk				
		AZT	TZP	CAZ	FEP	AN
AZT 4	Inhibition zone (mm)		19 (8.5 ^a)	16 (5.5)	15.5 (5.0)	13.5 (7.5)
	Susceptibility ^b		R→S (s ^c)	R→I (m)	R→I (m)	R→R (w)
TZP 32	Inhibition zone	25 (3)		14.4 (2.5)	16 (4)	13.5 (7.5)
	Susceptibility	S→S (s)		R→R (w)	R→I (m)	R→R (w)
CAZ 16	Inhibition zone	21.5 (1)	14.5 (2)		13.5 (2)	6.5 (0.5)
	Susceptibility	S→S (s)	R→R (w)		R→R (w)	R→R (w)
FEP 16	Inhibition zone	21 (1)	15 (2.5)	13 (0.5)		12 (6)
	Susceptibility	S→S (s)	R→R (w)	R→R (w)		R→R (w)
AN 128	Inhibition zone	27 (7)	18.5 (6.0)	15.5 (3.0)	17 (5.0)	
	Susceptibility	S→S (s)	R→I (m)	R→I (m)	R→I (m)	

^a Increased inhibition zone (mm) than control (without antibiotics).

^b Susceptibility is determined by NCCLS guideline (NCCLS, 1998). S, sensitive; I, intermediate; R, resistant.

^c Synergistic bacteriostatic effect is defined as absent (S₃=0), weak (S₃=1), moderate (S₃=2), strong (S₃=3). a, absent; w, weak; m, moderate; s, strong synergic effect.

Abbreviations: AZT, aztreonam; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; AN, amikacin

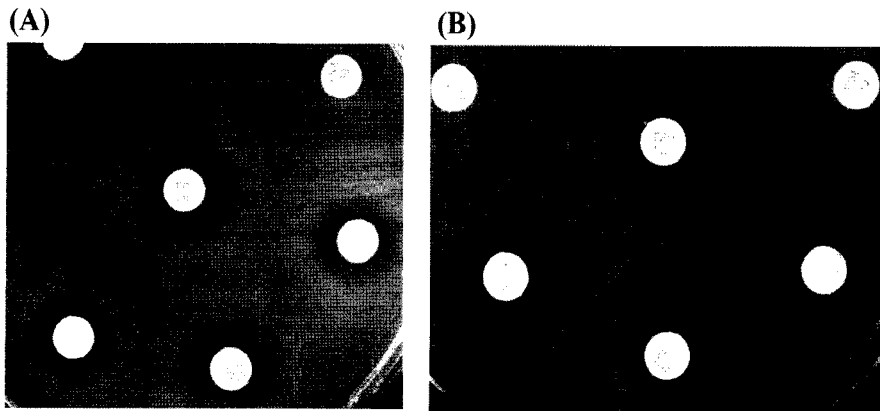


Fig. 2. One disk synergy tests of *Pseudomonas aeruginosa* DK569. (A) is Mueller-Hinton agar without antibiotics. (B) is Mueller-Hinton agar with 4 µg/ml of aztreonam. The enlarged inhibition zones in MH agar with antibiotics (B) are observed with TZP, FEP, PIP, and CAZ disks. Abbreviations: TZP, piperacillin-tazobactam; FEP, cefepime, PIP, piperacillin; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; CIP, ciprofloxacin.

생성균은 9균주였으며, PCR과 염기서열로 확인한 결과 이들 9균주는 모두 VIM-2형 β -lactamase 유전자(*bla*_{VIM-2})를 보유하고 있었다(결과 미제시). 이들 각각의 동정 결과에 대한 Vitek GNICard, API 20NE 및 16S rDNA 결과는 일치하였으며, 이 균주들은 *P. aeruginosa* 2균주와 *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* 7균주로 확인되었다.

항균제 병합효과

상승효과를 보이는 항균제의 선별검사

이들 중 *P. aeruginosa* DK569는 aztreonam (MIC; 8 µg/ml)을 제외하고 실험한 모든 β -lactam 항균제, aminoglycoside, ciprofloxacin에 내성을 보여 aztreonam 함유 배지를 이용하여 상승효과를 보이는 항균제를 찾는 데에 이용하였다. MBL 생성 *P. aeruginosa*에 대해 상승효과를 보이는 항균제들의 선별을 위해 one disk synergy test를 시행하였는데, aztreonam 4 µg 함유배지에서 piperacillin-tazobactam은 강한 상승효과(strong)를 보였다. Amikacin, ceftazidime, cefepime은 각각 weak 및 moderate 상승효과를 보였다. Carbapenem (imipenem, meropenem), aminoglycoside 항균제(gentamicin, tobramycin), cephalosporin (cefazolin, cefuroxime, cefuroxime, cefotaxime), penicillin (penicillin G, ampicillin, oxacillin), trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin, tetracycline, clindamycin, erythromycin, chloramphenicol 등의 항균제는 모두 상승효과가 관찰되지 않았다(Table 1 and Fig. 2). 위의 결과를 바탕으로 두 가지 항균제 조합을 선택하여 생존률검사 curve로 상승효과를 확인하고자 하였다. 우선 강한 상승효과를 보인 aztreonam (AZT)과 piperacillin-tazobactam (TZP)의 조합을 선택하였고 두 번째로 미약한 상승효과(weak)를 보였지만 의미 있는 억제대 증가(6→13.5 mm)를 보인 AZT과 amikacin (AN) 조합을 선택하였다.

생존률검사 실험

One disk synergy test에서 선별된 항균제 조합을 이용하여 생존률검사 실험을 한 결과, AZT와 TZP의 병합은 항균제 노출 6시간 후에 AZT (1.5×10^6 CFU/ml) 또는 TZP (1.2×10^6 CFU/ml)의 단독 항균제 노출시 보다 균수가 1/18.7로 감소하였다(6.4×10^4 CFU/ml). 그리고 AZT와 AN의 병합에서도 항균제 노출 6시간 후에 AZT 또는 AN (1.1×10^7 CFU/ml)의 단독 항균제에 투여보다 균수가 1/17.1로 감소하였다(6.4×10^4 CFU/ml). 그러나 항균제 병합효과는 일반적으로 가장 항균력이 강한 항균제 한 종류를 사용했을 때에 비해서 병합에 의해 100배 이상의 균을 감소시켰을 때 상승효과가 있다고 정의하기 때문에(14), 결국 위의 두 조합은 의미 있는 상승효과를 보이지 못하여 위의 세 가지 항균제를 조합하여 실험하였다. 세 가지 항균제를 병합하였을 때, 노출 후 8시간에 AZT (1.2×10^7 CFU/ml), TZP (1.1×10^7 CFU/ml) 및 AN (2.4×10^8 CFU/ml)의 단독 투여에 비하여 병합에 의해 균수가 1/183.3 (6×10^4 CFU/ml)로 감소하여 의미 있는 상승효과를 보였다. 위 세 가지 조합의 항균제 투여 24시간 후에는 모두 재증식이 나타났다(Fig. 3A-C).

MBL를 생성하는 균에 의한 감염을 치료하기 위한 항균제의 선택은 매우 어렵다. 현재 MBL에 의해 가수분해되지 않는 항균제의 개발 및 임상실험이 진행 중에 있지만(12, 16) 이러한 항균제를 사용하려면 오랜 시간이 필요할 것이다. 따라서 기존에 사용되고 있는 항균제 중에서 선택하여야 하며 항균제의 병합요법도 하나의 대안이 될 수 있을 것이다. 특히 호중구 감소증 환자나 면역이 결핍된 환자에서 다제 내성인 *P. aeruginosa*에 의한 감염에 자주 병합요법이 이용되며, 이 중 β -lactam 항균제와 aminoglycoside의 병합에 의한 상승효과는 잘 알려져 있다(3, 13). 그러나 아직까지 MBL를 생성하는 *P. aeruginosa*에서 병합요법에 관한 보고는 거의 없다. 본 연구에서는 MBL를 생성하는 *P. aeruginosa*에서 one disk synergy test를 이용하여 상승효과를

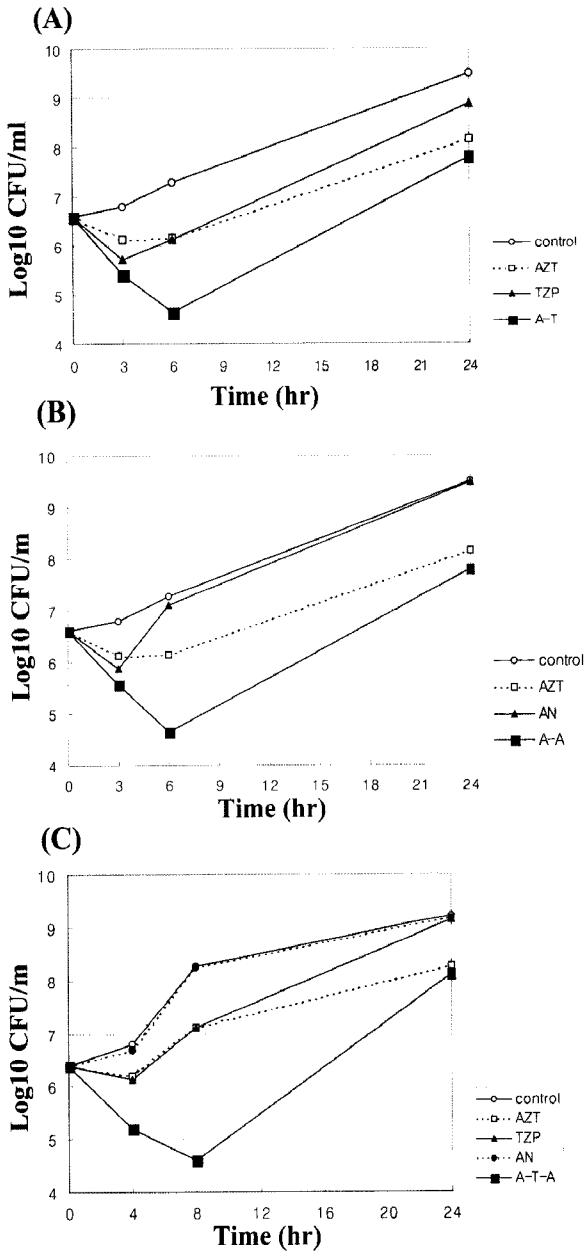


Fig. 3. Time-killing curves of *Pseudomonas aeruginosa* DK569 after (A) the treatments of AZT (4 µg/ml), TZP (32/4 µg/ml), or the combination of both, (B) the treatments of AZT (4 µg/ml), AN (16 µg/ml), or combination of both, (C) the treatments of AZT (4 µg/ml), TZP (32/4 µg/ml), AN (16 µg/ml), or the combination of the three. Abbreviations: AZT, aztreonam; TZP, piperacillin-tazobactam; A+T, aztreonam plus piperacillin-tazobactam; AN, amikacin; A+A, aztreonam plus amikacin; A+T+A, aztreonam plus piperacillin-tazobactam plus amikacin.

보이는 항균제를 찾아보았다. One disk synergy test는 Pestel 등 (19)의 방법을 변형하여 사용하였는데, 항균제를 섞은 배지와 섞지 않은 배지에서 억제대 직경의 차이로 상승효과를 정량적으로 측정할 수 있는 방법으로 상승효과를 보이는 항균제를 찾는 데 유용한 방법이다.

본 연구에서는 *P. aeruginosa* DK569가 aztreonam에 감수성을

보여 이 항균제와 병합에 의해 상승효과를 보이는 항균제 조합을 찾아보았다. Aztreonam과 piperacillin-tazobactam의 병합에서 억제대의 증가가 가장 컸으며 이어서 aztreonam과 amikacin의 병합에서도 의미 있는 억제대 증가가 관찰되어 이들 항균제 조합으로 생존률검사 curve를 작성하였다.

그람음성 간균에서 생존률검사 실험의 기준은 아직까지 정해져 있지 않는데, 균의 응집 및 biofilm의 형성에 의해 균집락 내부에 도달되는 항균제 농도가 낮게 되며 24시간 후에 흔히 재증식을 보일 수 있다(1). 따라서 항균제 노출 후 6~8시간 내에 상승효과 유무를 판독하는 것이 효과적일 수 있으며(7), 실제로 β-lactam 항균제 및 대부분의 항균제는 8시간 이내에 재투여가 되므로 의미가 있는 것으로 보인다. 생존률검사 실험에서 항균제 농도는 MIC와 혈중농도를 고려해야 하는데, 일반적으로 1/4 MIC 또는 1/2 MIC, 그리고 혈중 도달 농도를 고려하여 정한다(5). 본 실험에서는 기본적으로 1/2 MIC를 선택하였으며 amikacin은 1/4 MIC (>64 µg/ml)이 독성범위(toxic level >35 µg/ml)를 벗어나므로 독성범위 이하의 치료 농도(therapeutic range; 10~25 µg/ml)를 선택하여 항균제 노출 6시간 또는 8시간에 판독하였다. 실험 결과 감수성을 보인 aztreonam 및 piperacillin-tazobactam 단독으로는 bactericidal 농도에 도달하지 못하였다. Aztreonam과 piperacillin-tazobactam의 병합에 의해서는 각각의 항균제보다 억제효과는 컸지만 의미 있는 상승효과(1/100 이하의 균수 감소)는 관찰되지 않았다.

일부 보고에서 aminoglycoside에 고도 내성일지라도 β-lactam제와의 병합은 의미 있는 상승효과를 나타낼 수 있다고 알려져 있어 자주 병합요법에 이용된다(13). *P. aeruginosa* DK569는 amikacin에 대한 MIC가 256 µg/ml 이상이었으나 one disk synergy test에서 억제대가 의미 있게 증가되었다. 생존률검사 curve에서는 aztreonam (β-lactams)과 병합에 의해 aztreonam과 piperacillin-tazobactam의 병합 효과와 유사하였다. 따라서 이 세 항균제를 병합하여 실험하게 되었는데, 이 실험에서는 각각의 항균제 조합보다 항균제 노출 후 8시간에 의미 있는 상승효과(1/183로 감소)를 보였다. 실제로 이 균이 7차례 분리된 환자에서 aztreonam과 amikacin을 병합 사용한 경우는 한번 뿐이었는데, 다른 경우에 비하여 소변 내 농도(pyuria) 및 세균뇨(bacteriuria)가 빨리 없어졌으며, 그 이후 MBL가 분리되지 않았던 기간도 길었다. MBL 생성균은 integron 내에 자주 aminoglycoside 내성 유전자를 포함하고 있기 때문에 aminoglycoside에 고도 내성을 보이지만 MBL 생성균에서 amikacin의 병합은 효과적일 수 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 MBL 생성균은 aztreonam을 가수분해하지 못하여 흔히 감수성일 수 있으므로 이들의 이중 병합은 유용할 것이다. 그러나 *P. aeruginosa*에서 변이에 의한 AmpC를 갖고 있으면 aztreonam에 내성을 보일 수 있으므로 이들의 효과는 감소할 수 있을 것이다.

이런 경우 위 세 가지 항균제의 병합도 고려해 볼 수 있을 것이다. 본 연구는 MBL를 생성하는 한 균주를 대상으로 했지만 앞으로 보다 많은 수의 MBL 생성균에서 병합요법에 대한 실험결과에 따라 MBL 생성균에 의한 감염에서 β-lactam 및 aminoglycoside의 이

중 또는 삼중 요법은 유용할 것으로 생각된다.

감사의 말

이 연구는 2008학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Cappelletty, D.M. and M.J. Rybak. 1996. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combination against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 677-683.
- Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report, 1996. October 1986-April 1996. *Am. J. Infect. Control.* 24, 380-388.
- Dejongh, C.A., J.H. Joshi, and B.W. Thompson. 1986. A double β -lactam combination versus an aminoglycoside-containing regimen as empiric antibiotic therapy for febrile granulocytopenic cancer patients. *Am. J. Med. Suppl.* 5C, 101-111.
- Döring, G., M. Hörz, and J. Ortelt. 1993. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epidemiol. Infect.* 110, 427-436.
- Eliopoulos, G.M. and R.C. Moellering, Jr. 1996. Antimicrobial combination. In V. Lorian (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed., p. 338-342. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Fichtenbaum, C.J. and M.J. Smith. 1992. Treatment of endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa* with imipenem. *Clin. Infect. Dis.* 14, 353-354.
- Glew, R.H. and R.A. Pavuk. 1983. Early synergistic interaction between semisynthetic penicillins and aminoglycosidic aminoglycocyclusols against *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 902-906.
- Haag, P., P. Lexa, and P. Werkhuser. 1986. Artifacts in dilution pharmacokinetic models caused by adherent bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 765-768.
- Hashizume, T., F. Ishino, J. Nakagawa, S. Tamaki, and M. Matsuhachi. 1984. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthiemycin) in vitro: binding to the penicillin-binding protein (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 37, 394-400.
- Jeong, S.H., K. Lee, Y. Chong, J.H. Yum, S.H. Lee, H.J. Choi, Y.M. Kim, K. H. Park, B.H. Han, S.W. Lee, and T.S. Jeong. 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassettes, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 397-400.
- Lee, K., Y. Chong, H.B. Shin, Y.A. Kim, D. Yong, and J.H. Yum. 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 88-102.
- Matsumura, N., S. Minami, and S. Mitsuhashi. 1997. Antibacterial activity of T-5575, a novel 2-carboxypenam, and its stability to β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 31-34.
- Miller, M.H., M.A. El-Sokkary, S.A. Feinstin, and F.D. Lowy. 1986. Penicillin-induced effects on streptomycin uptake and early bactericidal activity differ in *viridans* group and *enterococcal streptococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 763-768.
- Moellering, Jr., R.C., C.B. Wennersten, and A.N. Weinberg. 1973. Penicillin-tobramycin synergism against enterococci: a comparison with penicillin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 526-529.
- Moellering, R.C., G.M. Eliopoulos, and D.E. Sentochnik. 1989. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24(Suppl A), 1-7.
- Nagano, R., Y. Adachi, H. Imamura, K. Yamada, T. Hashizume, and H. Morishima. 1999. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various β -lactamases, including class B metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2497-2503.
- Nordmann, P. and L. Poirel. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 321-331.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohtan, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 71-78.
- Pestel, M., E. Martin, C. Aucouturier, J.F. Lemeland, and F. Caron. 1995. In vitro interaction between different β -lactam antibiotics and fosfomycin against bloodstream isolates of Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2341-2344.
- Rasmussen, B.A., Y. Gluzman, and F.P. Tally. 1990. Cloning and sequencing of the class B β -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1590-1592.
- Sentochnik, D.E., G.M. Eliopoulos, and M.J. Ferraro. 1989. Comparative in vitro activity of SM-7338, a new carbapenem antimicrobial agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1232-1236.
- Watanabe, Y., S. Minami, T. Hayashi, H. Araki, R. Kitayama, and H. Ochiai. 1995. In vitro antibacterial properties of T-5575 and T-5578, novel parenteral 2-carboxypenams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2787-2791.
- Yum, J.H., K. Yi, H. Lee, D. Yong, K. Lee, J.M. Kim, G.M. Rossolini, and Y. Chong. 2002. Molecular characterization of metallo- β -lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integron carrying the *bla_{VIM-2}* gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 837-840.

(Received September 29, 2008/Accepted October 14, 2008)

ABSTRACT : Effect of Antibiotic Combination Therapy on Metallo- β -Lactamase Producing Imipenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Seung-Bok Hong, Hong Chul Kim, Jang Won Lee, and Seung-Yeol Son* (Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea)

This study was to detect MBL (metallo- β -lactamase) among glucose non-fermenting Gram-negative bacilli isolated from clinical specimen and to search antimicrobial combination therapy against MBL producing *Pseudomonas aeruginosa*. Among fifty one isolates of Gram-negative bacilli with reduced imipenem susceptibility (MIC \geq 8 μ g/ml), nine isolates have shown positive results in MBL detection test. They were seven *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* and two *P. aeruginosa*. The results from EDTA-DDST coincided with those of PCR and nucleotide sequence analysis which showed the presence of *bla*_{VIM-2}. The combination of aztreonam (AZT) and piperacillin-tazobactam (TZP) or AZT and amikacin (AN) screened by one disk synergy test showed no synergistic effect. Triple antibiotic combination therapy with AZT, TZP and AN, however, was shown to be effective and the most synergistic after 8 hrs of exposure. This result strongly suggest that the triple combination therapy of AZT, TZP, and AN could be useful for the treatment of infection caused by MBL producing Gram-negative bacilli.