

녹농균에 대한 Aminoglycoside계와 Cephalosporin계의 병합작용

전남대학교 의과대학 미생물학교실

오 증 석 · 안 태 휴

=Abstract=

Combined action of Aminoglycoside and Cephalosporin Against *Pseudomonas aeruginosa*

Jong Suk Oh and Tai Hew Ahn

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea

Thirty-one strains of *Pseudomonas aeruginosa* were submitted to the synergistic activity test of amikacin(AK) and gentamicin(GM) combined with moxalactam(MX), ceftizoxime(CTZ) or cefoperazone(CFZ).

The minimal inhibitory concentrations(MICs) of each drug and drugs combined in various ratios were measured by checkerboard dilution method. The synergism was determined through analysing the MIC distribution curve on isobologram and calculating the fractional inhibitory concentration index(FICI).

MICs of GM, AK, MX, CFZ and CTZ against the 31 tested strains were distributed from 12.5 μ g/ml to 800 μ g/ml, from 0.8 μ g/ml to 25 μ g/ml, from 3.1 μ g/ml to 50 μ g/ml, from 3.1 μ g/ml to 400 μ g/ml, and from 12.5 μ g/ml to 100 μ g/ml, respectively.

The rate synergism of each drug combination by means of FICI was 45.5% in GM-MX, 36.4% in GM-CFZ, 63.6% in GM-CTZ, 48.6% in AK-MX, 35.3% in AK-CFZ, and 35.7% in AK-CTZ combination.

Thus, it is suggested that *Pseudomonas aeruginosa* may effectively be inhibited by various aminoglycoside and cephalosporin combinations.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, aminoglycoside, cephalosporin, synergism.

서 론

녹농균은 각종 항생제에 대해 내성이 비교적 강한 세균이다. 대표적인 병원성 세균으로 알려진 포도구균은 급속한 항생제의 발전덕택으로 어느 정도 그 해독을 막을 수 있게 되었으나, 최근에는 녹농균이 외상 및 화상환자 치료에 막심한 지장을 주고 있다. Polymyxins, gentamicin 및 carbenicillin 등 몇가지 약제가 녹농균 감염의 치료에 어느 정도 유효하였으나, 최근에는 이 약제들에 대한 내성이 증가하고 있어 녹농균 감염의 치료를 어렵게 하고 있다. 따라서 이렇다할 특효약이 없는 녹농균에서는 서로 작용기전이 다른 약제를 동시에 사용하여 그 상승작용에 의한 효과를 노리는 시도가 그동안 많

이 연구 보고되어 왔었다^{1,2)}.

일반적으로 penicillin계와 aminoglycoside계의 항생제 사이에는 부작용이 적으면서 상승효과는 비교적 높다고 알려져 왔는데 녹농균에 있어서는 carbenicillin과 tobramycin³⁾, carbenicillin과 amikacin, 그리고 carbenicillin과 gentamicin항생제⁴⁾ 등 여러 가지 약제의 결합작용이 상승효과를 나타낸다고 보고되어 왔다. 그러나 최근 이 약제들에 대한 내성이 크게 증가함에 따라 이들 약제간의 병용효과를 기대하기 어렵게 되어 aminoglycoside계와 3세대 cephalosporin계의 병용효과를 기대하기 시작하였다. 그리고 이 병용효과에 관한 각종 연구보고들의 한결같은 특징은 공시균의 분리당시 상태에 따라 그 병용효과가 각양각색으로 나온다는 점이다. 즉 어느 특정항생제에 감수성 또는 내성으로 나타난

균이 어느 2종약제의 결합작용에 부가, 또는 상승으로 반응하리라고는 전연 예측할 수 없다는 것이다.

따라서 본 실험에서는 전남의대 부속병원에서 분리한 녹농균 31주에 대하여 aminoglycoside계 항생제인 gentamicin과 amikacin을 cephalosporin계 항생제인 moxalactam, cefoperazone, ceftizoxime과 병합 사용하면 그 효과가 어떻게 나오는가를 비교 검사하였다.

재료 및 방법

1. 공시균

전남의대 부속병원에서 분리한 녹농균을 집락의 특징 외에 pyocyanin 생산 등을 검사하고, API test를 실시하여 확인하였다. 이렇게 동정한 균은 31주이였으며 보통 한천배지에 계대배양하면서 공시하였다.

2. 항생제

Gentamicin(GM, 중의제약), Amikacin(AK, 보령제약), Moxalactam(MX, 일동제약), Ceftizoxime(CTZ, 동아제약), Cefoperazone(CFZ, 한국화이자), Carbenicillin(CB, 한국화이자), Tobramycin(TB, 동화약품)을 사용하였다.

3. 항생제 감수성검사

한천희석법에 의해 검사하면던 바 약기하면, 항생제들을 각각 해당용액인 인산완충용액 또는 증류수에 녹인 것을 원용액으로 하여, 이 원용액을 Mueller-Hinton agar(Difco)로 2배 계단희석 하여 배지내의 항생제 농도가 0.8 μ g/ml에서 800 μ g/ml가 되도록 조절하였다. 공시균은 액체배지에서 18시간 배양시킨 균액을 생리적 식염수를 1ml당 약 백만내의 생균수가 되게끔 조절한 부유액을 만들어 각

약제함유배지에 접종기를 사용하여 접종하였다. 18시간 배양한 후 집락형성 유무를 검사하여 집락이 3개 이상 형성되지 않은 최저농도를 최저발육저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC)로 판독하였다.

4. 한천평판배지법에 의한 병용효과 검사

Checkerboard식에 의한 각종 약제결합의 상승효과 유무를 검사하는 술식을 약기하면 다음과 같다^{8,11}.

시험관을 횡으로 7~8개, 종으로 7~8개 도합 49~64개를 나열한다. 제일약제의 최고농도를 맨 윗쪽의 한천배지에 분주한 후 위에서 밑쪽으로 배수 희석하면서 넣고 제2약제는 동양으로 희석하되 우측에서 좌측으로 넣는다. 각 시험관열 중 맨 좌측 것과 맨 밑줄 것은 각각 단일종의 희석된 약제가 들어가게 한다. 이때 희석액은 Mueller Hinton broth(Difco)를 사용하였다. 이렇게 검사하고자 하는 2종약제를 희석 혼합한 다음 그 2ml를 48 $^{\circ}$ C로 보 관해둔 Mueller Hinton agar 18ml에 넣어 잘 섞은 후 평판에 붓는다. 접종할 균은 액체배지에서 18시간 자란 것으로, 생리적 식염수에 1ml당 약 백만 내외의 생균수가 되게끔 부유시켜, 접종기로 그 0.05ml가 접종되도록 하였다. 균접종 후 18시간 배양한 뒤 육안으로 집락형성 유무를 판독하여, 집락이 3개 이하일 때 그 농도를 억제양성으로 하여 isobologram⁸⁾을 작성하였다.

이 isobologram 상에서 각 항생제의 병용효과를 알아보기 위하여 부분억제농도(fractional inhibitory concentration)와 부분억제농도지수(fractional inhibitory concentration index, FICI)를 구하였다.

FICI는 $FICI = FICa + FICb = \frac{(a)}{(MICa)} + \frac{(b)}{(MICb)}$ 의 공식으로부터 산출하였다.

(a): a항생제와 b항생제의 병용사용시 최저발육 저지농도에 들어있는 a항생제의 농도

(MICa): a항생제의 최저발육 저지농도

Table 1. Minimal inhibitory concentration(MIC) of seven antibiotics against 31 isolates of *Ps. aeruginosa*

Antibiotics	Antibiotic concentration(μ g/ml)										
	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	200	400	800
Gentamicin(GM)					6 ^a		7	5	5	2	6
Amikacin(AK)	4	8	10	3	4	2					
Moxalactam(MX)			1	10	16	3	1				
Cefoperazone(CFZ)			7	4	1		7	6	5	1	
Ceftizoxime(CTZ)					1	11	14	5			
Carbenicillin(CB)						3	8		8	12	
Tobramycin(TB)	3	4	1		3		10	3	4	3	

^aNumber of strains inhibited.

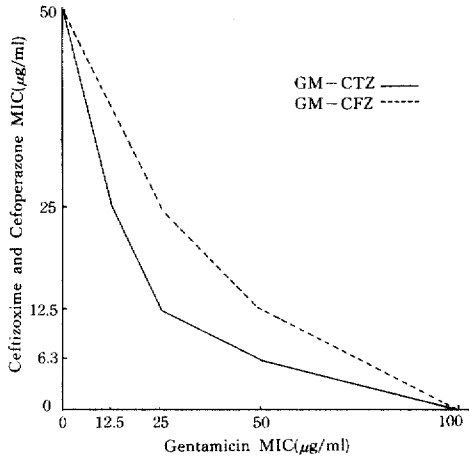


Fig. 1. Isobolograms of combined action of antibiotics, GM-CTZ and GM-CFZ against *Ps. aeruginosa* 1.

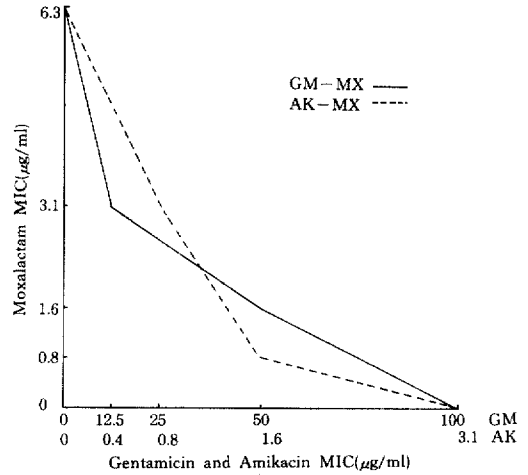


Fig. 3. Isobolograms of combined action of antibiotics, GM-MX and AK-MX against *Ps. aeruginosa* 1.

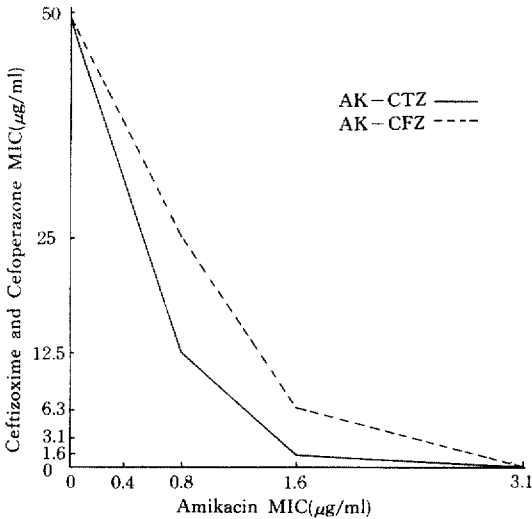


Fig. 2. Isobolograms of combined action of antibiotics, AK-CTZ and AK-CFZ against *Ps. aeruginosa* 1.

(b): a 항생제와 b 항생제의 병용사용시 최저발육 저지농도에 들어있는 b 항생제의 농도
(MICb): b 항생제의 최저발육저지농도

성 적

공시균 31주에 대한 공시항생제 GM, AK, MX, CFZ, CTZ의 발육억제효과를 알아보기 위하여 각 약제의 MIC를 측정하여 보았으며, CB와 TB에 대한 녹농균의 내성정도를 알아보기 위하여 이들의 MIC도 함께 측정해 보았다(Table 1).

녹농균 31주중 GM에 있어서는 최저 12.5μg/ml에서 최고 800μg/ml 사이에 MIC가 분포하였고 대부분이 50μg/ml 이상이었다. AK에 있어서는 0.8μg/ml에서 25μg/ml 사이에, MX에 있어서는 3.1μg/ml에서 50μg/ml 사이에, CFZ와 CTZ에서는 각각 3.1~400μg/ml, 12.5~100μg/ml에 분포하였다.

이와같이 5 종류의 항생제에 의한 공시균 31주의 각 MIC를 측정하여 공시약제의 사용농도 범위를 확정된 후, 이 약제들의 2종결합 즉 GM-MX, GM-CTZ, GM-CFZ, AK-MX, AK-CTZ, AK-CFZ가 각 균에 어떠한 양상으로 작용하는가를 각각 검사하여 균주마다 그 결과를 일목요연하게 알 수 있도록 isobologram을 작성하였다. 지면상이 isobologram 전부를 여기에 표시할 수 없어 대표로 녹농균 1에 대한 것만 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3에 도해하였다. 그런데 이 isobologram상에서는 양 MIC를 잇는 선이 직선보다 밑으로 처지면 처질수록 상승효과가 큰 것이며, 직선보다 위로 올라가면 올라갈수록 그만큼 길항작용이 크다는 것을 가리킨다⁸⁾. Fig. 1, 2, 3을 살펴볼 때 6종의 약제결합 중 GM-CTZ, AK-CFZ결합이 가장 심한 하강곡선을 이루고 있어 상승작용이 제일 강하다는 것을 뜻하며 AK-CFZ결합은 약한 상승작용을 나타내고 있음을 알 수 있다.

각 항생제의 상승효과 여부를 알아보기 위한 또 하나의 지표에는 부분억제 농도지수(fractional inhibition concentration index, FICI)가 있는데 그 수치가 0.5보다 작으면 작을수록 상승효과가 크다고 할 수 있고, 0.5에서 1.0까지는 부파적효과, 1.0이상이면 길항적 작용을 나타낸 것이라 한다.

Table 2. Degrees of antibiotic interaction against 3 isolates of *Ps. aeruginosa*

Strain No.	Antibiotic pairs								
	GM-MX ^a			GM-CFZ			GM-CTZ		
	FIC ^b		FICI ^c	FIC		FICI	FIC		FICI
	GM	MX		GM	CFZ		GM	CTZ	
1	0.500	0.250	0.750	0.500	0.250	0.750	0.250	0.250	0.500
4	0.500	0.250	0.750	0.500	0.125	0.625	0.125	0.500	0.625
12	0.250	0.250	0.500	0.062	0.500	0.562	0.250	0.250	0.500

Strain No.	Antibiotic pairs								
	AK-MX			AK-CFZ			AK-CTZ		
	FIC		FICI	FIC		FICI	FIC		FICI
	AK	MX		AK	CFZ		AK	CTZ	
1	0.500	0.125	0.625	0.500	0.125	0.625	0.250	0.250	0.500
4	0.500	0.125	0.625	0.250	0.250	0.500	0.500	0.250	0.750
12	0.250	0.250	0.500	0.250	0.250	0.500	0.250	0.250	0.500

^aData refer to the most synergistic mixture, i.e., that mixture for which the FICI has the lowest value.

^bFIC is the ratio of concentration in the mixture to MIC when used alone.

^cFICI is the sum of FICs.

Table 3. Patterns of antibiotic interaction against 10 isolates of *Ps. aeruginosa*

Strain No.	Antibiotic pairs ^a					
	GM-MX	GM-CFZ	GM-CTZ	AK-MX	AK-CFZ	AK-CTZ
1	-	-	+	-	-	+
2	+	-	+	+	-	-
4	-	-	-	-	+	-
5	-	+	+	-	+	-
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	+	+	+	+
20	+	-	-	+	-	+
21	+	-	+	-	-	-
23	+	+	-	-	-	-
27	+	+	-	+	+	-

^a+ and -, presence and absence, respectively, of synergism.

상승효과 여부를 정하는 기준에 있어서 FICI와 isobologram 분석상에는 다소 차이가 있는데, FICI 0.5 기준이 보다 더 적격으로 생각되어 FICI를 기준으로 하였다.

공시균 31주의 FIC와 FICI를 계산하여 상승효과 유무를 각각 검사해 보았으나, 지면상 그 결과를 다 표시할 수 없어, 대표적인 형을 나타낸 균 몇주에 대해서만 표시하면 Table 2에 표시된 바와 같다. 즉 균주 1은 GM-CTZ, AK-CTZ 결합에서만 FICI가 0.5이고 나머지 결합에서는 부가적작용을 나타내었다. 균주 4는 AK-CFZ 결합에서만 FICI가 0.5이며 나머지 결합에서는 부가적작용을 나타

내었고, 균주 12에서는 GM-CFZ 결합에서만 FICI가 0.5이상이고 나머지 결합에서는 모두 FICI가 0.5를 나타내었다.

이렇게 FICI에 의한 효과형별에 의거 공시균중 10주를 분석해 보면 Table 3에 표시된 바와 같다. 균주 1은 GM-CTZ, AK-CTZ 결합에서만 상승효과를 나타내었으며, 나머지 균주들도 각각 독특한 반응양상을 나타내었다.

위와같이 FICI에 의해 알아본 공시균 31주의 상승작용 정도를 6종의 항생제 결합에 대하여 비교하여 보면 Fig. 4와 같다. 즉 GM-MX 결합에서는 공시균의 45.5%가 상승효과를 나타냈으며, GM-

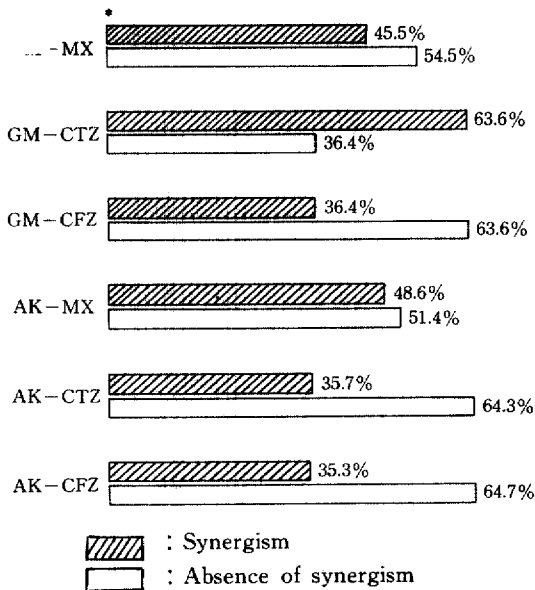


Fig. 4. Comparison of synergism of 6 antibiotic combinations.

CTZ 결합에서는 63.6%, GM-CFZ 결합에서는 36.4%, AK-MX 결합에서는 48.6%, AK-CTZ 결합에서는 35.7%가, 그리고 AK-CFZ 결합에서는 35.3%가 상승효과를 나타내어 GM-CTZ 결합이 가장 병용효과가 좋은 것으로 나타났다.

고 찰

공시균 31주에 대하여 공시항생제 5종의 MIC를 측정하여 전반적인 내성분포율을 파악한 다음, 각 약제를 그 특성에 따라 2종류씩 결합하여 2종 약제의 병합작용이 단일약제에 비해 어떠한 효과를 갖는가 즉 상승적인가 아니면 부가적인가 여부를 검사함으로써, 기회감염균으로서 가장 치료하기 곤란한 균종의 하나인 녹농균을 퇴치하는데 어떤 효과가 있지 않을까 하고 추구한 것이 본 실험의 목적이었었는데, 결론부터 말하여 그 결과는 대체적으로 고무적이었다.

상술한 성적의 중요사항을 두루 살펴보면 공시균 전주가 일반적으로 GM에 대하여 내성이 높은 경향이 있었고 AK 등 다른 약제에 대해서는 내성이 그다지 높지 않았다.

그런데 2종약제를 짝지어 그 공동작용이 어떤 효과를 나타내는가를 검사한 본 실험에서는 각 균주의 단일항생제에 대한 태도에서와는 다른 전연 예측할 수 없는 반응태도를 나타내었다. 즉 GM에 감수성이 있다고 하여 GM-CFZ나 GM-CTZ, GM-

MX에 상승적으로 반응하는율이 더 높고, 반대로 내성이 있다고 해서 부가적 또는 길항적으로 반응하는 경향이 있었나면 이는 더욱 아니었다. 이는 단적으로 2종약제의 상승효과 유무는 그 균을 직접 검사해 보지 않고는 예측할 수 없다는 것을 가리킨 것이라 하겠다.

이러한 2종약제결합의 상승효과 여부를 판정하는데, isobologram상의 선을 표준으로 할 것인가 아니면 FICI를 기준으로 할 것인가 여부를 결정하는데는 어려움이 있었는데 FICI가 0.5이하야 상승효과라고 규정한 것은 좀 강조된 작용효과를 바라는 뜻에서 임의로 정한 것이다.

Isobologram 상에서 공시균 31주를 살펴보면 2종약제결합이 90% 이상의 고율로 상승효과를 나타냈으며 FICI를 기준으로 했을 때는 35~63.6%로 약제간에 큰 차가 있었으나, 일반적으로는 저율이었다. 그러나 양측에서 모두 GM-CTZ 병용이 가장 큰 상승효과를 나타내었다.

Aminoglycoside계 약제와 Cephalosporin계 약제의 녹농균에 대한 병용효과에 대해서는 여러 가지 보고가 있다. Hallander 등⁷⁾에 의하면 FICI 0.5이하를 상승효과로 볼 때 GM과 cefotaxime 병용에서 40%, GM과 ceftazidime 병용에서는 30%, 그리고 GM과 MX 병용에서는 40%가 상승효과를 나타내어 본 실험결과와 비슷한 양상을 보였다. 또, Giarmarellou 등⁸⁾에 의하면 녹농균 30주중 AK-MX 결합에서는 29주가, GM-CFZ 결합에서는 9주가 각각 상승효과를 나타내었다. Pauline 등¹⁰⁾은 GM과 MX 사이의 상승작용에 대하여 보고하였는데 그에 의하면 GM에 내성을 가진 14균주 중에서 6주가 상승효과를 나타내었으며, GM에 감수성을 가진 4주에서는 모두가 상승효과를 나타내었다. 한편 GM과 CTZ 병용시 51주의 녹농균 중 15주에서 상승효과가, 17주에서 길항효과가 나타났다는 보고가 있지만⁹⁾, 대부분에서는 aminoglycoside계 약제와 cephalosporin계 약제사이에 상승효과를 보고하고 있다. 그 외에 AK, GM과 3세대 cephalosporin계를 Enterobacteriaceae에 대하여 병용하여 썼을 때 상승효과가 나타난다는 연구보고도 있다⁴⁾.

이상으로 항생제의 여러 결합이 녹농균에 대해서 어떻게 작용하는가, 특히 상승효과 여부에 초점을 맞춘 여러 실험보고를 간단히 살펴볼과 동시에 최근 분리한 녹농균 31주에 대해서 5종류의 항생제를 사용, 그 상승적 효과유무를 추구하고 본 결과는 일반적으로 aminoglycoside계와 cephalosporin계 항생제 결합은 녹농균에 상승적으로 작용하는 경향이 농후하나 어떠한 약제결합이 가장 효과적인가는

단일약제사용시 균의 반응태도로는 전연 예측할 수 없고, 단지 번잡스러운 일이지만 균주마다 따로 일일이 각종 결합약제를 작용시켜 검사해 보아야 할 수 있다.

결 론

Aminoglycoside계 항생제인 gentamicin(GM), amikacin(AK)와 cephalosporin계의 moxalactam(MX), ceftizoxime(CTZ) 및 cefoperazone(CFZ)과의 약제결합이 녹농균에 어떻게 작용하는가를 checker-board식 희석법에 의해 최저발육저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC), 부분억제 농도지수(fractional inhibitory concentration index, FICI) 및 isobologram을 구하여 비교 검사하였다.

공시균 31주에 대한 각 공시약제의 MIC는 GM에서 12.5 μ g/ml부터 800 μ g/ml까지 분포되어 있으나 대부분이 50 μ g/ml 이상이었고, AK에서는 0.8 μ g/ml~25 μ g/ml에, MX에서는 3.1 μ g/ml~50 μ g/ml에 분포하였다. CFZ와 CTZ에서는 각각 3.1 μ g/ml~500 μ g/ml, 12.5 μ g/ml~100 μ g/ml에 분포하였다.

6종의 항생제 결합에서 FICI에 의한 상승효과의 정도는 GM-CTZ결합에서 63.6%, GM-MX결합에서 45.5%, GM-CFZ결합에서 36.4%이었으며, AX-CTZ결합에서는 35.7%, AK-MX결합에서 48.6%이었으며, AK-CTZ결합에서는 35.3%로 나타나 GM-CTZ결합이 가장 병용효과가 컸다.

이상으로 녹농균은 aminoglycoside계와 cephalosporin계의 병합작용에 효과적으로 억제되었음을 관찰하였다.

참 고 문 헌

- 1) 오종석, 안태휴, 박보환: Gentamicin 내성 포도상구균에 대한 항생제의 병용효과. 전남의대잡지, **18**: 271, 1981.
- 2) 임승찬: 녹농균에 대한 Gentamicin과 Tobramycin의 Carbenicillin 및 Sulbenicillin과의 상승효과. 전남의대잡지, **16**: 65, 1979.
- 3) Barry AL and Sabath LD: Special tests: Bac-

tericidal activity of antibiotics in combination, p. 431. *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd ed. A.S.M., Washington, 1974.

- 4) Bayer AS, Eisenstadt R and Morrison JO: Enhanced in vitro bactericidal activity of amikacin or gentamicin combined with three new extended spectrum cephalosporins against cephalothin-resistant members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(6): 725, 1984.
- 5) Eickhoff TC: In vitro effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* **18**: 469, 1969.
- 6) Giamarellou H, Zissis NP, Tagari G and Bouzoz J: In vitro synergistic activities of aminoglycosides and β -lactam against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(4): 534, 1984.
- 7) Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K and Karlsson I: Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with anti-pseudomonal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**(5): 743, 1982.
- 8) Heineman HS and Lofton WM: Unpredictable response of *Pseudomonas aeruginosa* to synergistic antibiotic combination in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 827, 1978.
- 9) King JW and Penn RL: Activity of ceftizoxime combined with gentamicin against 100 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(6): 770, 1984.
- 10) Pauline KW, Edson RS, Washington JA and Hermans PE: Bactericidal and synergistic activity of moxalactam alone and in combination with gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**(1): 179, 1983.
- 11) Sabath LD and Matsen JM: Assay of antimicrobial agents, p. 428. *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd ed. A.S.M., Washington, 1974.