

MS-2 system을 이용한 황색포도구균에 대한 moxalactam과 fosfomycin의 병용효과 측정

광주기독병원 정형외과¹ · 전남대학교 의과대학 미생물학교실²

박 찬 석¹ · 안 태 휴²

—Abstract—

Efficiency of Combined Action of Moxalactam and Fosfomycin Determined by MS-2 System Against Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates

Park, Chan-Sok¹ and Ahn, Tai-Hew²

Department of Orthopaedic Surgery, Kwangju Christian Hospital¹ and
Department of Microbiology, Chonnam University, Medical School, Kwangju Korea²

Twenty strains of penicillin(PC)-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC \geq 32U/ml) were chosen randomly from recent isolates and submitted to the present experiment to see what effect the combined antibiotic action of moxalactam(MX) and fosfomycin(FM) would bring about on the cells, using MS-2 system.

1. The conventional agar dilution method and the rapid automatic MS-2 system were used in measuring the MICs of MX and FM against each strain and the comparison of the data obtained revealed no significant difference between the two methods in the titer and distribution of the MICs.
2. The automatic MS-2 system was, therefore, used alone in determining the combined growth inhibitory effect of MX and FM because of its more rapidness, and the obtained results were that most of the PC-resistant strains(16 out of 20, 80%) were synergistically inhibited by the two antibiotic combination while additive effect was observed in the remaining 4 strains(20%).
3. Thus, it is suggested that the growth of PC-resistant staphylococcal cells may be synergistically inhibited by MX and FM combination and the efficiency of two antibiotic action as well as MIC of single antibiotic may be more rapidly determined by the MS-2 system than by the conventional method.

Key Words: MS-2 system, moxalactam, fosfomycin, penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

서 론

Moxalactam(MX)과 fosfomycin(FM)이 우리나라에 도입된지 오래되지 않은 약제에 속한데, 전자는 종래의 cephem계 항생물질과는 화학구조가 다른 새로운 세대의 항생제로서 일본감야의 연구소에서 최근 개발한 oxacephem(oxa β -lactam)계 항생물질이며¹⁾, 후자는 분자량이 아주 적은 항생제(분자량 138)의 일종으로 그 구조도 극히 간단한 것이 특징이다²⁾.

황색포도구균은 병원내감염균으로 뿐만 아니라

요사이의 내성균이 많이 출현하여 특효약이 없다시피된 경우가 많다. 따라서 단계만으로는 살균이 잘 안되니 자연 2종약제를 병용시켜 이 내성균에 의한 감염을 억제해 볼려고 한 시도가 많이 이루어져, 그동안 이 방면에 수많은 실험예가 보고되어 왔으나^{3,4,5,6,7)}, 아직도 뚜렷한 효과를 본 보고에는 없는 것 같다.

저자는 전남대학교 의과대학 부속병원과 광주기독병원에서 최근 분리보관해 온 황색포도구균에서 임의로 15주를 골라, 상기한 MX와 FM을 사용하여 단계작용시의 최저발육억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 병용시의 MIC를 재

래식 한천희석법과 최근 본 교실에 새로 도입된 MS-2 research system(MS-2)이라는 일종의 자동측정기를 이용하여 검사하였던 바, 흥미있는 결과를 얻었기에 여기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시균: 분리보관해 온 황색포도구균중 penicillin에 내성이 있다고 보이는 균(MIC \geq 32U/ml) 50여 주에서 임의로 20주를 골라 본 실험에 공시했다.

2. 항생제: MX는 일본감야의 약제, FM은 영진약품제를 사용하였다. 우선 각 공시균에 대한 FM와 MX의 단제 MIC를 항용법인 한천희석법과 MS-2를 이용하여 측정하고, 다음에 이 2종약제의 병용 MIC는 MS-2만을 사용하여 측정하였다.

3. 한천희석법에 의한 MIC 측정: Mueller-Hinton Agar(Difco) 배지를 사용 하였다. 적당히 희석된 MX 또는 FM 원액을 배수희석하여 필요한 농도가 함유토록 각 평판배지를 만든 다음, 15시간 내외 자란 각 공시균을 multiple inoculator로 이 약제함유배지에 접종하였다. 이후 37°C 20시간 부란기에 두었다가 육안으로 집락형성유무를 확인함으로써 각 약제의 MIC를 정하였다.

4. MS-2를 이용한 단제 및 병용약제의 MIC 측정: 적당히 희석한 MX 또는 FM의 원액을 Mueller-Hinton Broth(Difco)로 배수희석하면서 MS-2 research cartridge의 각 chamber에 1ml씩 분주한 다음, 생리적 식염수로 1 \times 10⁷/ml의 농도로 부유시킨 균을 0.05ml씩 접종하여 35°C로 맞추어진 analysis module에 7시간 자리에 한 후, kinetic curve를 구

Table 1. MICs of moxalactam and fosfomycin measured by MS-2 and agar dilution method against 15 strains of Staphylococcus aureus

| Strain No. | Antibiotic(μ g/ml) | | | |
|------------|-------------------------|------|------------|------|
| | Moxalactam | | Fosfomycin | |
| | MS-2 | A.D. | MS-2 | A.D. |
| 1 | 50 | 25 | 1.6 | 0.8 |
| 2 | 6.3 | 6.3 | 12.5 | 6.3 |
| 3 | 6.3 | 6.3 | 3.2 | 3.2 |
| 4 | 6.3 | 6.3 | 3.2 | 12.5 |
| 5 | 6.3 | 6.3 | 1.6 | 0.8 |
| 6 | 12.5 | 6.3 | 1.6 | 0.8 |
| 7 | 12.5 | 6.3 | 6.3 | 12.5 |
| 8 | 6.3 | 6.3 | 6.3 | 6.3 |
| 9 | 6.3 | 3.2 | 6.3 | 6.3 |
| 10 | 6.3 | 6.3 | 12.5 | 12.5 |
| 11 | 6.3 | 3.2 | 6.3 | 3.2 |
| 12 | 6.3 | 3.2 | 6.3 | 6.3 |
| 13 | 6.3 | 6.3 | 12.5 | 6.3 |
| 14 | 6.3 | 6.3 | 25 | 25 |
| 15 | 50 | 50 | 1.6 | 1.6 |
| 16 | 12.5 | 12.5 | 3.2 | 3.2 |
| 17 | 50. | 50 | 3.2 | 1.6 |
| 18 | 6.3 | 6.3 | 3.2 | 3.2 |
| 19 | 6.3 | 6.3 | 3.2 | 3.2 |
| 20 | 6.3 | 6.3 | 1.6 | 3.2 |

Abbreviations: MICs, minimum inhibitory concentrations;

MS-2, MS-2 research system;
A.D., agar dilution.

Table 2. Distribution of MIC frequencies

| Antibiotic | Measured by | No. of strains at following MIC(μ g/ml) | | | | | | |
|------------|-------------|--|-----|-----|-----|------|----|----|
| | | 0.8 | 1.6 | 3.2 | 6.3 | 12.5 | 25 | 50 |
| Moxalactam | MS-2 | 0 | 0 | 0 | 14 | 3 | 0 | 3 |
| | A.D. | 0 | 0 | 3 | 13 | 1 | 1 | 2 |
| Fosfomycin | MS-2 | 0 | 5 | 6 | 5 | 3 | 1 | 0 |
| | A.D. | 3 | 2 | 6 | 5 | 3 | 1 | 0 |

Abbreviations: see Table 1.

Table 3. Growth inhibitory effects of antibiotics(moxalactam and fosfomycin) on test strains

| Effect | Synergism | Addition | Indifference | Antagonism |
|----------------|--|-------------|--------------|------------|
| Strain No. | 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 | 2, 3, 4, 16 | | |
| No. of strains | 16 | 4 | 0 | 0 |
| Frequency(%) | 80 | 20 | 0 | 0 |

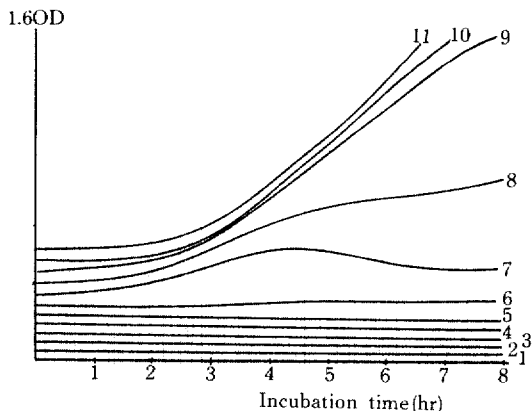


Fig. 1A. Growth curves for *S. aureus* 7 in dilutions of fosfomycin(FM) Concentrations of FM($\mu\text{g/ml}$): 1, 200; 2, 100; 3, 50; 4, 25; 5, 12.5; 6, 6.3; 7, 3.2; 8, 1.6; 9, 0.3; 10, 0.4; 11, control(broth only).

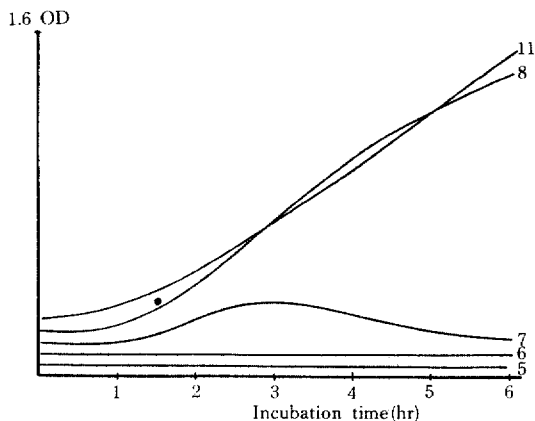


Fig. 1B. Growth curves for *S. aureus* 2 in dilutions of moxalactam(MX). Concentrations of MX ($\mu\text{g/ml}$): 5, 12.5; 6, 6.3; 7, 3.2; 8, 1.6; 11 control (broth only).

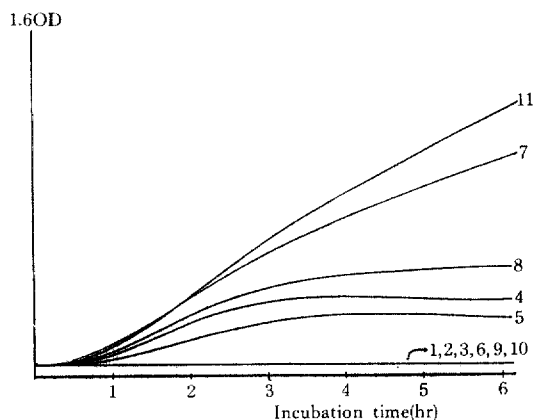


Fig. 2. Growth curves for *S. aureus* 12 in dilutions of single or combined antibiotics, moxalactam(MX) and fosfomycin(FM). Concentrations of antibiotics($\mu\text{g/ml}$): 1, MX 6.3; 2, FM 6.3; 3, MX 6.3+FM 6.3; 4, MX 3.2; 5, FM 3.2; 6, MX 3.2+FM 3.2; 7, MX 1.6; 8, FM 1.6; 9, MX 1.6+FM 1.6; 10, no organism; 11, no antibiotic.

하여, 균증식이 없다고 판단되는 항생제의 최저농도를 그 약제의 MIC라고 하였다. 2종약제의 병용효과를 보기 위한 공동 MIC측정은 상기한 단계 MIC측정과 크게 다르지는 않고, 다만 단계 MIC의 $\frac{1}{2}$ 과 $\frac{1}{4}$ 농도에 해당된 희석액을 동일 chamber에 주입한 것이 다를뿐, 11개의 chamber에 들어갈 각 약제의 농도는 chamber 1, 4, 7에 MX의 1MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC이고 chamber 2, 5, 8에는 FM의 1MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC이며, chamber 3, 6, 9에는 MX와 FM의 합산농도가 1MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC되게끔 조절하였다.

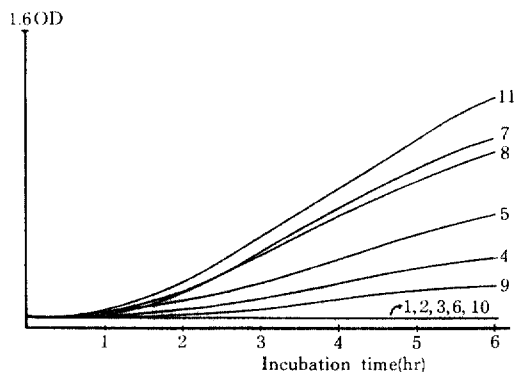


Fig. 3. Growth curves for *S. aureus* 3 in dilutions of single or combined antibiotics, moxalactam(MX) and fosfomycin(FM). Concentrations of antibiotics($\mu\text{g/ml}$): 1, MX 6.3; 2, FM 3.2; 3, MX 6.3+FM 3.2; 4, MX 3.2; 5, FM 1.6; 6, MX 3.2+FM 1.6; 7, MX 1.6; 8, FM 0.8; 9, MX 1.6+FM 0.8; 10, no organism; 11, no antibiotic.

Chamber 10과 11은 대조관으로서 항생제와 균을 각각 넣지않았다. 7시간 배양한 후 chamber 4, 5에서는 균이 잘 증식하였으나, chamber 9에서 균이 자라지 않았으면 이는 상승효과 양성이라고 하였으며, chamber 4, 5와 chamber 9의 kinetic curve가 비슷하였으나 후자의 선이 보다 밀오르려 있을 때는 이를 부가적효과 양성이라고 하였다. 이와 반대로 위로 선이 올라갔을 때는 이를 무관반응이라고 판정하였다. 만일 chamber 4, 5의 선과는 달리 chamber 6의 선이 현저하게 위로 솟아오르면 이는 각 약제의 $\frac{1}{2}$ MIC공존하에서 균증식이 오히려 잘 일어났다는 것이니 이는 길항작용양성이라고 볼 수 있다.

성 적

각 공시균에 대한 MX와 FM의 MIC를 재래식 방법인 한천회석법과 새로 도입한 MS-2를 이용한 방법에 의하여 각각 측정된 결과는 Table 1에 표시된 바와 같다. 일반적으로 양자간에는 별차가 없었으며, 내성도도 균주 1과 15 그리고 17에서 관찰된 MX의 MIC 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 와 균주 14에서 관찰된 FM MIC 25 $\mu\text{g/ml}$ 를 제외하고는 전균주에서 MX나 FM을 막론하고 MIC가 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 이하이었다. 이 MIC를 농도별로 나누어 그 분포율을 표시하면 Table 2와 같다. 즉 MX의 경우는 MIC 6.3 FM의 경우는 MIC 1.6에서 6.3 $\mu\text{g/ml}$ 부근에 빈도가 집중된 경향이 있었다.

MX와 FM을 병용한 결과는 각 공시균마다 도시하여야 하나, 지면상 우선 그 총괄한 성적을 표시하면 Table 3과 같다. 즉 각 항생제의 합산농도가 0.5MIC ($\frac{1}{2}$ MX MIC + $\frac{1}{2}$ FM MIC)인 chamber 9에서 균발육억제로 나와 상승효과 양성이라고 판정된 균수가 16주로 전체의 80%에 해당되었으며, 부가적효과(전술하였음) 양성으로 나온 균은 4주이었다. 이외의 무관 또는 길항반응으로 나온 균주는 전연 없었다. 그런데 여기에서 주목할만한 점은 균주 1, 14, 15와 같이 전기한 바 고내성균이 전주 상승적으로 발육이 억제되었다는 것이다.

이와 같은 결과를 남겨한 각 kinetic curve 중 몇 가지 예를 도시하면 Fig. 1, 2, 3과 같다. 즉 FM을 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 배수회석하면서 kinetic curve를 8시간 관찰한 결과는 curve 7에서 약간의 증식을 나타냈으나, curve 6에서는 완전히 정지된 것을 나타내고 있으니 이는 *S. aureus* strain 7에 대한 FM의 MIC가 6.3 $\mu\text{g/ml}$ 임을 가르킨 것이며(Fig. 1A), 또 *S. aureus* strain 2에 대한 MX의 MIC도 Fig. 1B가 나타낸 바와 같이 6.3 $\mu\text{g/ml}$ (curve 6)임을 곧 알 수 있다. MX와 FM을 병용한 성적은 *S. aureus* strain 12(Fig. 2)의 경우 curves 1, 2, 3, 6, 9, 10에서 증식이 전연 되지않은 것으로 나왔는데 이 가운데서 curve 9 즉 단계사용시 MIC의 $\frac{1}{2}$ 에 해당된 약량이 각각 들어있는데서 균이 자라지 않았다는 것이니 이는 곧 상승효과 양성임을 알 수 있으며, Fig. 3에서와 같이 *S. aureus* strain 3 균이 curve 6에서 평행선을 그리면서 curver 4, 5, 9에서는 약간 위로 올라간 경향을 보였다는 것은 부가적 효과를 나타냈음을 가르킨 것이다.

고 찰

MS-2를 이용한 항생제실험 보고에는 최근 급속히 많아지는 것같은데, 그 대표적인 예로, Kelly 등¹⁾이 행한 Gram음성 간균에 대한 일반항생제의 감수성 검사와 Carson 등²⁾의 methicillin-resistant *S. aureus*에 대한 유사한 검사등이 있고, 그리고 Boyce 등³⁾이 실시한 methicillin-resistant *S. aureus* 검출에 대한 신뢰도검사 등이 있는데, 이들은 이 MS-2의 자동적이며 신속한 장점은 인정하면서도 재래식 한천회석법과의 비교에서 methicillin의 경우는 47%의 일치점밖에 인정할 수 없으나 이외의 항생제에서는 93%의 일치점을 보았다고 한점 등 Boyce 등은 항생제의 종류에 따라 보통사용하는 한천법과 MS-2 사이에는 서로 역가가 달리 나올 수도 있다고 주장하였다. 그러나 본 실험에서 공시한 MX와 FM에 있어서는 MIC측정에 있어서 한천회석법과 MS-2이용법이 거의 동일한 결과를 나타냈으며, 이는 Smith 등⁴⁾이 *Haemophilus influenzae*균에 실시한 각 항생제감수성 검사에서 MS-2가 한천회석법과 전반적으로 일치된 MIC를 나타냈다는 보고와 일치했다. 그런데 이와 같은 MS-2의 장점, 즉 신속하고 간편함을 알면서도 아직 본 실험에서와 같이 MS-2를 이용하여 2종 약제의 병용효과가 상승적인가 여부를 알아보는 실험에보고는 거의 없는 것 같다. checkerboard식 회석법에 isobologram 작성, FICI 산출 등⁵⁾ 엄청난 시간과 재료가 드는 재래식방법에 의하지 않고, 본 교실에서 처음으로 시도했으나 별 착오없이 본 실험과 같이 MS-2를 이용한 MX와 FM의 병용효과 비교검사가 예상외로 고무적인 결과를 나타냈다는 것은 앞으로 MS-2를 이용한 이방면의 실험은 계속해 볼만한 가치가 있다고 여겨진다.

결 론

PC에 내성이 있는(MIC $\geq 32\text{U/ml}$) 포도구균 20주에 대하여 비교적 최근 우리나라에 도입된 MX와 화학구조가 극히 간단한 것이 특징인 FM을 동시에 작용시켜, 그 효과를 MS-2를 이용하여 측정해 본 결과, 재래식 한천회석법에 비해 월등히 간편하고 신속 정확하게 그 병용이 상승적효과 또는 부가적 효과 아니면 반대로 길항적 결과를 가져온 것인가 여부를 알게 되었다. 즉 우선 재래식 한천회석법과 MS-2를 이용한 단계 MIC 측정결과를 비교하여 양자간에는 별차이가 없음을 확인한 후, MS-2만을 사용하여 MX와 FM의 병용효과를 측정된 결과는 의외로 그 효율이 높아, 공시한 PC 내성균 20주중 4주를 제외한 전균주(16주)에서 상승효과가 관찰

되었고 나머지 4주에서도 부가적 효과만 관찰되었을 뿐, 무관 또는 길항작용효과는 관찰되지 않았다.

이상으로 MS-2를 이용하면 재래식 한천희석법에 비해 간편하고 신속하게, 각 항생제의 MIC 2종약제병형효과를 측정할 수 있다는 것과 PC내성 포도구균에 대하여 MX와 FM의 동시작용이 고도의 병용효과를 가져올 수 있다는 것을 알게 되었다.

참 고 문 헌

- 1) Barry AL and Sabath LD: Special tests: Bactericidal activity of antibiotics in combination, Manual Clin. Microbiol., 3rd ed, A.S.M., pp. 478~484, 1980.
- 2) Boyce JM, White RL, Bonner MC and Lockwood WR: Reliability of the MS-2 system in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **15**: 220, 1982.
- 3) Carson JR, Conley FE and Cahall DL: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility testing with the Abbott MS-2 system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**: 676, 1982.
- 4) Christenen BG, Leanga WJ, Beattie TR, Patchet AA, Arison BH and Jardeky, O: Phosphomycin structure and synthesis. *Science*, **166**: 123, 1969.
- 5) Daschner FD: Combination of bacteriostatic and bactericidal drugs: lack of significant in vitro antagonism between penicillin, cephalotin, and chlortetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**: 802, 1976.
- 6) Kelly MT, Latimer JM and Balfour L: Comparison of three automated system for antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, **15**: 902, 1982.
- 7) Neu HC and Fu KP: Synergy of azlocillin and mezlocillin combined with aminoglycoside antibiotics and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 813, 1978.
- 8) Ohtsuka H: Chemical and antibacterial activity of lactamoxef. *Chemotherapy*, **28(7)**: 1236, 1980.
- 9) Smith JA, Ngui-Yen JH and Fothergill J: Rapid method for determining antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *J. Clin. Microbiol.*, **16**: 832, 1983.