

# 시험관내 심내막염 모델에서 Methicillin 내성 포도구균에 대한 Vancomycin, Arbekacin, Gentamicin 단독 혹은 병합효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 성모병원 임상약학연구소\*, 약리학교실<sup>†</sup>  
이동건 · 전해선\* · 임동석<sup>†</sup> · 최수미 · 최정현 · 유진홍 · 신완식 · 강문원

## Efficacy of Vancomycin, Arbekacin, and Gentamicin Alone or in Combination Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in *In Vitro* Infective Endocarditis Model

Dong-Gun Lee, M.D., Hye-Sun Chun, M.S.<sup>\*</sup>, Dong-Seok Yim, M.D.<sup>†</sup>, Su Mi Choi, M.D., Jung-Hyun Choi, M.D., Jin-Hong Yoo, M.D., Wan-Shik Shin, M.D., and Moon-Won Kang, M.D.  
Department of Internal Medicine, Clinical Research Institute of St. Mary's Hospital\*, Department of Pharmacology<sup>†</sup>, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background** : Glycopeptide has been used for the one-and-only treatment of choice in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection, but its exclusive use for the MRSA infection has led to the increased risk of glycopeptide-resistance. To find an alternative (s), we employed an in vitro infective endocarditis model (IVIEM) to compare the efficacy of vancomycin (VCM), arbekacin (ABK), and gentamicin (GM) alone or in combination.

**Methods** : Using two strains of clinically isolated MRSA, one GM susceptible (GS171) and the other GM resistant (GR153), fibrin clots were prepared and suspended in IVIEM. Antibiotics were added as a bolus to simulate human pharmacokinetics of regimens, including q 6 h, q 12 h, q 24 h, or continuous infusion with VCM, q 12 h or q 24 h with ABK, and q 8 h or q 24 h with GM. In cases of combination, regimens were VCM q 12 h plus ABK q 24 h, and VCM q 12 h plus GM q 24 h. Fibrin clots were removed from each model at 0, 8, 24, 32, 48, and 72 h, and the bacterial densities (in CFU/g) were determined.

**Results** : At 8 hour, the colony counts of GS171 were lower than those of GR153 ( $P=0.02$ ), and the lowest with the ABK q12h against GS171 ( $P=0.01$ ). At 72 hour, monotherapy with ABK or VCM produced same degree of bacterial reductions in IVIEM, regardless of dosing frequency or GM-resistance. In the case of GM-resistance, combination of VCM and ABK did show additive effect until 24 hours, although VCM and GM showed no indifference during all the experiments. Development of resistance during experiment was not observed with any regimens.

**Conclusions** : Our data suggest that ABK monotherapy could be used as an alternative to VCM even in the treatment of GM-resistant staphylococcal endocarditis. Further studies with clinical trials are warranted to evaluate the additive effect of VCM and ABK.

**Key Words** : Pharmacokinetics, *Staphylococcus aureus*, Endocarditis, Bacterial, Vancomycin, Arbekacin

## 서 론

Methicillin 내성 포도구균(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)은 병원감염의 중요한 원인균으로 치료로는 vancomycin 이외에 대안이 없는 실정이다. 그러나 중증감염인 경우 vancomycin에 대한 반응이 좋지 않거나 최

접수: 2003년 2월 8일, 승인: 2003년 6월 10일  
이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2002-003-E00031).  
교신저자: 신완식, 영등포구 여의도동 62번지  
가톨릭대학교 성모병원 내과  
Tel: 02)3779-2237, Fax: 02)780-3132  
E-mail: symonlee@catholic.ac.kr

근 vancomycin 내성균이 최근 증가하고 있어 이에 대처하기 위한 방법을 개발하는 것이 중요하다(1-5).

Arbekacin은 그람양성균에 대한 항균력이 우수하고 gentamicin 등에 내성인 MRSA에 대해서도 최소 억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 등의 시험관내 방법으로 효과적인 항생제임이 이미 증명되어 vancomycin을 대체할 수 있는 항생제 중 하나로 알려져 있다(6-12). Vancomycin에 대한 반응이 좋지 않은 경우 gentamicin 등의 aminoglycoside계 약제와의 병합요법이 많이 시도되고 있지만 최근 MRSA가 aminoglycoside modifying enzyme에 의한 내성이 증가하고 있어 치료를 어렵게 하고 있다(13, 14). 그러나 arbekacin은 MRSA에 효과적이고 vancomycin과 병합했을 때 시험관내 실험에서 상승작용이 일부 증명되고 있다(6, 9). 그러나 시험관내 실험 결과만으로 임상에 적용하기엔 어려움이 있어 체내 환경과 유사한 조건을 만들 수 있는 시험관내 감염모델을 이용해 실험하는 것이 최근 시도되고 있다(15-17).

본 연구는 감염모델 중 시험관내 심내막염 모델을 적용하여 MRSA에 대한 vancomycin, arbekacin, gentamicin의 단독효과를 확인하고 vancomycin과 gentamicin, vancomycin과 arbekacin의 병합효과를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 항균제 감수성 검사

점액성 성상이 없는 *Staphylococcus aureus*의 임상균주 GR153과 GS171을 실험에 사용하였다. 두 균주 모두 methicillin 내성이었고 gentamicin 내성인 GR153과 gentamicin 감수성 GS171을 사용하였다.

항생제 감수성 검사와 심내막염 모델에는 25 mg/L의 calcium, 12.5 mg/L의 magnesium이 함유되어 있는 Mueller-Hinton broth (CAMHB; Difco laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하였고 집락수 측정에는 tryptic soy agar (TSA; Difco)를 사용하였다. MIC는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001) (18)의 기준에 따른 액체배지 희석법을 이용하였다. 접종농도는  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/mL이었고, 정도관리를 위한 표준균주로는 *S. aureus* ATCC 29213을 사용하였다. 균주는 10% glycerol이 포함된 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 넣어  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였으며, 실험 중에는 TSA에서 일주일 간격으로 계대배양하였다.

### 2. 항균제

Vancomycin (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), gentamicin (Sigma), arbekacin (중외제약, 서울, 한국)의 분말을 NCCLS의 기준에 따라 용액으로 제조하여 사용하기 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3. Fibrin clot의 제조

실험균주는 진탕배양기에서  $35^\circ\text{C}$ 에서 18시간 배양한 후  $3,500 \times g$ 로 15분동안 원심분리하여 최종  $10^9$  CFU/0.1 mL가 되도록 CAMHB로 희석하였다(19).

Fibrin clot은 먼저 멸균된 1.5 mL eppendorf tube에 cryoprecipitate 0.5 mL, 혈소판 농축액 (250,000-500,000 혈소판수/clot) 0.035 mL, 균주가 섞인 현탁액 0.1 mL, aprotinin solution (Kallikrein inhibitory 2,000 units/mL; Boeringer Mannheim, Heidelberg, Germany) 0.035 mL을 첨가하여 혼합액을 만들었다. 각각의 eppendorf tube에 멸균된 monofilament line을 삽입하고, calcium (50 mmol, Sigma)에 녹인 bovine thrombin 용액 (5,000 U/mL, Sigma)을 0.06 mL 첨가하여 제작하였다. 이렇게 제작된 fibrin clot을 멸균된 22-gauge needle을 이용해 eppendorf tube에서 빼낸 뒤 시험관내 심내막염 모델에 장착하였다(20).

### 4. 시험관내 심내막염 모델

심내막염 모델은 1-구획 모델(one-compartment model)로 만들었고 fibrin clot을 장착할 수 있는 마개가 있는 관을 장착하였다. 내부는 CAMHB 배지 700 mL을 넣고 fibrin clot은 2개씩 6세트를 사용하였으며, 72시간동안 각 한 세트씩 제거하면서 실험하였다. 72시간동안  $37^\circ\text{C}$ 를 유지하도록 하였

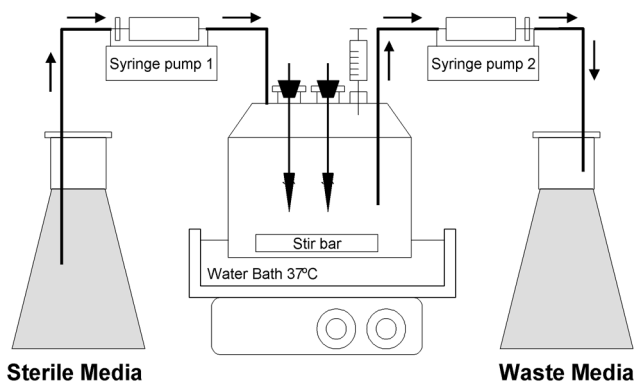


Figure 1. Schematic presentation of *in vitro* infective endocarditis model.

고, stir bar를 사용하여 모델 내의 배지가 고루 섞이도록 하였다(Figure 1) (15, 21).

사람에서의 약동학과 유사하도록 일정한 속도(monoexponential elimination rate)로 항균제가 들어있는 본체 내의 배지를 제거하였고 같은 속도로 새로운 배지를 계속 공급하였다. Vancomycin의 반감기는 6시간, arbekacin과 gentamicin의 반감기는 3시간으로 하였다(22).

Vancomycin은 각각 6, 12, 24시간마다 주입한 간헐주입군과 최고농도 20 ug/mL에 도달하도록 부하용량 주입 후 연속주입한 연속주입군으로 나누어 실험하였다. Arbekacin은 12, 24시간마다, gentamicin은 8, 24시간마다 주입하였다. Vancomycin 연속주입군의 목표 농도는 20 ug/mL으로 하였고 6, 12, 24시간마다 주입한 군의 목표 최고농도는 각각 25, 30, 60 ug/mL이었고 최저농도는 모두 5 ug/mL로 맞추었다. Arbekacin을 12, 24시간마다 주입한 군의 목표 최고농도는 각각 9, 17 ug/mL, 최저농도는 0.5 ug/mL를 목표로 하였다. Gentamicin을 8, 24시간마다 주입한 군의 목표 최고농도는 5, 15 ug/mL, 최저농도는 1 ug/mL이었다(7, 22). Vancomycin과 arbekacin 혹은 gentamicin의 병합투여군에서 항균제 제거율은 반감기가 빠른 arbekacin, gentamicin에 맞추어 제거하였고 반감기가 느린 vancomycin은 보조용기를 이용하여 보충하였다(23). 실험은 항균제 주입군과 항균제를 주입하지 않은 대조군으로 각각 2회씩 반복하였다.

## 5. 약동학/약력학 분석

항균제 농도 측정을 위해 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 72 시간째 배지 0.5 mL을 채취하였고 측정시까지 -70°C에 보관하였다. 약동학 지표는 WinNonlin (version 3.0, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 모든 지표는 log-linear trapezoidal method를 따르는 1-구획 모델로 가정하고 측정하였다. Vancomycin, arbekacin, gentamicin의 최고농도와 MIC의 비율( $C_{max}/MIC$ ), 24시간동안 MIC이상의 농도를 유지한 시간( $T>MIC$ ), 24시간 AUC와 MIC의 비율( $AUC_{0-24}/MIC$ ) 등의 약력학 지표를 계산하였다.

## 6. Fibrin clot killing curve

0, 8, 24, 32, 48, 72시간에 모델내의 fibrin clot을 각각 2개씩 빼냈다. Fibrin clot의 무게를 잰 후 homogenizer (Wheaton Science, Milleville, NJ, USA, clearance 0.09-0.16 mm) 로 잘게 부수고 0.9 mL 생리 식염수로 희석하고 TSA 배지 3개에 20 uL씩 분주하였다. 배지는 35°C, 24시간동안

배양하였고 집락수를 CFU/g의 단위로 평균하여 측정하였다. 실험 중 내성균 출현을 감시하기 위해 각 항균제의 4배, 8배 MIC가 함유되어 있는 배지에도 분주하여 확인하였다.

항균제 병합시의 평가는 상승작용, 상가작용, 무관작용, 길항작용으로 판단하였다. 상승작용은 각각의 시간에서 병합주입시의 집락수가 단독주입시 살균력이 더 있었던 것의 집락수 보다 2 log<sub>10</sub> CFU/mL 이상 감소하는 것으로 정의하였다. 상가작용은 병합주입시의 집락수가 단독주입시 보다 1-2 log<sub>10</sub> CFU/mL 감소했을 때, 무관작용은 병합주입시의 집락수가 단독주입시와 비교해 1 log<sub>10</sub> CFU/mL 미만으로 변화했을 때, 길항작용은 병합주입시의 집락수가 단독주입시보다 2 log<sub>10</sub> CFU/mL 이상 증가했을 때로 정의하였다(24).

## 7. 항균제 농도측정

항균제의 농도는 fluorescence polarization immunoassay (Abbot Diagnostics TDx, Irving, Tex, USA)을 이용하여 측정하였고 각 항생제에 대한 민감도는 vancomycin 2.0 ug/mL, arbekacin 0.4 ug/mL, gentamicin 0.27 ug/mL이었다. 대조시약은 CAMHB내에서 제조하였고 대조시약 및 표본 모두 2회씩 반복측정하였다.

## 8. 통계

시간별 fibrin clot내 집락수(log<sub>10</sub> CFU/g)를 SPSS version 10.0의 일원배치 분산분석법 및 DUNCAN 사후검정법을 이용하여 분석하였고  $P<0.05$ 를 의미있다고 판단하였다.

## 결 과

### 1. 실험균주의 최소억제농도

실험에 사용한 균주의 항균제 감수성은 Table 1과 같이 GR153, GS171 모두 MRSA로 vancomycin, arbekacin에 감수성이 있었고 GR153은 gentamicin 내성, GS171은 gentamicin 감수성 균이었다.

Table 1. Antimicrobial Susceptibility of the Organisms Tested

	GR153	GS171
Oxacillin	16 ug/mL	256 ug/mL
Vancomycin	1 ug/mL	0.5 ug/mL
Arbekacin	1 ug/mL	0.5 ug/mL
Gentamicin	32 ug/mL	0.25 ug/mL

**Table 2. Pharmacokinetic Data in the *in vitro* Infective Endocarditis Model<sup>\*</sup>**

Regimen	Concentration <sup>†</sup> (ug/mL)			T <sub>1/2</sub> <sup>‡</sup> (h)
	C <sub>peak</sub>	C <sub>trough</sub>	C <sub>pss</sub> <sup>§</sup>	
Vancomycin CI <sup>  </sup>			20.6±0.7	5.8±0.2
Vancomycin q 6 h	25.6±3.2	8.9±1.1		5.5±0.5
Vancomycin q 12 h	32.4±2.8	6.1±1.7		7.0±0.6
Vancomycin q 24 h	68.3±2.1	8.2±2.1		6.0±0.4
Arbekacin q 12 h	11.6±0.7	0.8±0.2		3.0±0.2
Arbekacin q 24 h	18.0±0.9	0.2±0.1		3.6±0.3
Gentamicin q 8 h	7.3±1.3	1.1±0.3		2.9±0.5
Gentamicin q 24 h	17.2±1.9	0.2±0.1		3.7±0.3

<sup>\*</sup>All values are means±S.D. (n=4).

<sup>†</sup>Concentrations at steady state.

<sup>‡</sup>T<sub>1/2</sub>, half-life.

<sup>§</sup>C<sub>pss</sub>, peak concentration at steady state.

<sup>||</sup>CI, continuous infusion.

## 2. 약동학/약력학 분석

최고 및 최저농도, 반감기 등의 약동학 지표는 의도했던 수치와 같았다(Table 2). Vancomycin의 경우 GR153, GS171 모두 실험과정 내내 MIC이상의 농도를 유지하였다. AUC<sub>0-24</sub>/MIC는 GR153, GS171 모두 arbekacin에 비해 vancomycin에서 더 높았다(Table 3). 병합주입군의 약동학도 단독주입군과 차이를 보이지는 않았다.

## 3. Fibrin clot killing curve

GR153에 gentamicin을 사용한 군을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 의미있게 fibrin clot내 집락수가 감소하였

**Table 3. Pharmacodynamic Data in the *in vitro* Infective Endocarditis Model<sup>\*</sup>**

Regimen	GR153			GS171		
	T>MIC <sup>†</sup>	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	T>MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC
Vancomycin CI <sup>‡</sup>	100%	494.4±9.5	ND <sup>§</sup>	100%	988.8±4.8	ND
Vancomycin q 6 h	100%	562.8±4.9	ND	100%	1124.7±5.6	ND
Vancomycin q 12 h	100%	465.9±3.1	ND	100%	931.8±5.7	ND
Vancomycin q 24 h	100%	798.7±8.2	ND	100%	1597.4±6.9	ND
Arbekacin q 12 h	ND	102.4±1.0	11.6±0.7	ND	204.9±1.8	22.9±0.9
Arbekacin q 24 h	ND	94.0±2.2	18.0±0.9	ND	198.1±1.5	37.2±0.6
Gentamicin q 8 h	ND	2.9±0.9	0.2±0.1	ND	375.6±2.8	29.2±1.8
Gentamicin q 24 h	ND	2.9±0.5	0.5±0.2	ND	372.8±1.6	68.8±2.1

<sup>\*</sup>All values are means±S.D. (n=4).

<sup>†</sup>Time>MIC, percentage of time when the drug concentration was above the MIC.

<sup>‡</sup>CI, continuous infusion.

<sup>§</sup>ND, not done.

**Table 4. Residual Organisms at 8 and 72 h in Bacterial Inocula in the *in vitro* Infective endocarditis model<sup>\*</sup>**

Antibiotic regimen	GR153		GS171	
	log <sub>10</sub> CFU/g at 8 h	log <sub>10</sub> CFU/g at 72 h	log <sub>10</sub> CFU/g at 8 h	log <sub>10</sub> CFU/g at 72 h
Growth control	11.90±0.11	12.40±0.30	11.89±0.10	12.42±0.31
V CI <sup>‡</sup>	8.36±0.07 <sup>†</sup>	6.25±0.50 <sup>†</sup>	5.94±0.10 <sup>†, §</sup>	6.28±0.01 <sup>†</sup>
V q 6 h	7.01±0.25 <sup>†</sup>	6.12±0.32 <sup>†</sup>	7.37±0.07 <sup>†, §</sup>	6.20±0.07 <sup>†</sup>
V q 12 h	8.22±0.22 <sup>†</sup>	6.00±0.77 <sup>†</sup>	6.20±0.30 <sup>†, §</sup>	6.30±0.21 <sup>†</sup>
V q 24 h	7.76±0.13 <sup>†</sup>	5.90±0.40 <sup>†</sup>	5.81±0.10 <sup>†, §</sup>	5.92±0.10 <sup>†</sup>
A q 12 h	7.64±0.22 <sup>†</sup>	6.31±0.10 <sup>†</sup>	4.56±0.05 <sup>†, §,   </sup>	6.20±0.77 <sup>†</sup>
A q 24 h	8.45±0.17 <sup>†</sup>	6.19±0.30 <sup>†</sup>	6.47±0.16 <sup>†, §</sup>	6.00±0.04 <sup>†</sup>
G q 8 h	10.90±0.50	12.14±0.21	5.17±0.16 <sup>†, §</sup>	6.18±0.27 <sup>†</sup>
G q 24 h	11.60±0.80 <sup>†</sup>	12.10±0.59 <sup>†</sup>	5.93±0.13 <sup>†, §</sup>	4.75±0.83 <sup>†, ¶</sup>
V q 12 h+A q 24 h	7.10±0.19 <sup>†</sup>	5.72±0.85 <sup>†</sup>	6.03±0.92 <sup>†, §</sup>	5.76±0.27 <sup>†</sup>
V q 12 h+G q 24 h	7.80±0.50 <sup>†</sup>	5.48±0.18 <sup>†</sup>	5.54±0.09 <sup>†, §</sup>	4.69±0.18 <sup>†</sup>

<sup>\*</sup>All values are means±S.D. (n=4).

<sup>‡</sup>CI, continuous infusion.

<sup>†</sup>Statistically significant from growth control (P<0.001).

<sup>§</sup>Statistically significant from colony count of GR153 at 8h (P=0.02).

<sup>||</sup>Statistically significant from colony count of GR153, GS171 at 8h (P=0.01).

<sup>¶</sup>Statistically significant from arbekacin q24h in GS171 at 72h (P=0.04).

Abbreviations: V, vancomycin; A, arbekacin; G, gentamicin.

다( $P<0.001$ ).

GS171에 vancomycin, arbekacin 단독주입시 8시간째의 집락수가 GR153과 비교하여 의미있게 낮았고( $P=0.02$ ), GS171에 arbekacin 12시간마다 주입한 군의 집락수가 가장 낮았다( $P=0.01$ ). Vancomycin, arbekacin 단독투여군에서 72시간째 집락수는 GR153, GS171 모두 차이가 없었다( $P=0.11$ ).

Vancomycin 및 arbekacin 단독주입군은 각각의 군주에서 살균력의 차이가 없었고, 투여간격에 따른 차이도 없었다( $P=0.61$ ). GS171에서는 arbekacin과 gentamicin을 각각 12, 8

시간마다 주입한 군의 경우 살균력의 차이가 없었지만( $P=0.24$ ), 24시간마다 투여한 경우에는 gentamicin의 살균력이 더 좋았다( $P=0.04$ ) (Table 4). GR153은 vancomycin, arbekacin 단독주입군에서 실험이 끝날 때까지 시간이 지날수록 집락수가 점차 감소하는 추세를 보였다. 반면 GS171은 vancomycin, arbekacin, gentamicin 단독주입군 모두에서 8시간째까지 집락수가 급격히 감소하였고 그 후 실험이 끝날 때까지 8시간째의 집락수와 비교해 의미있게 더 감소하지는 않았다(Figure 2).

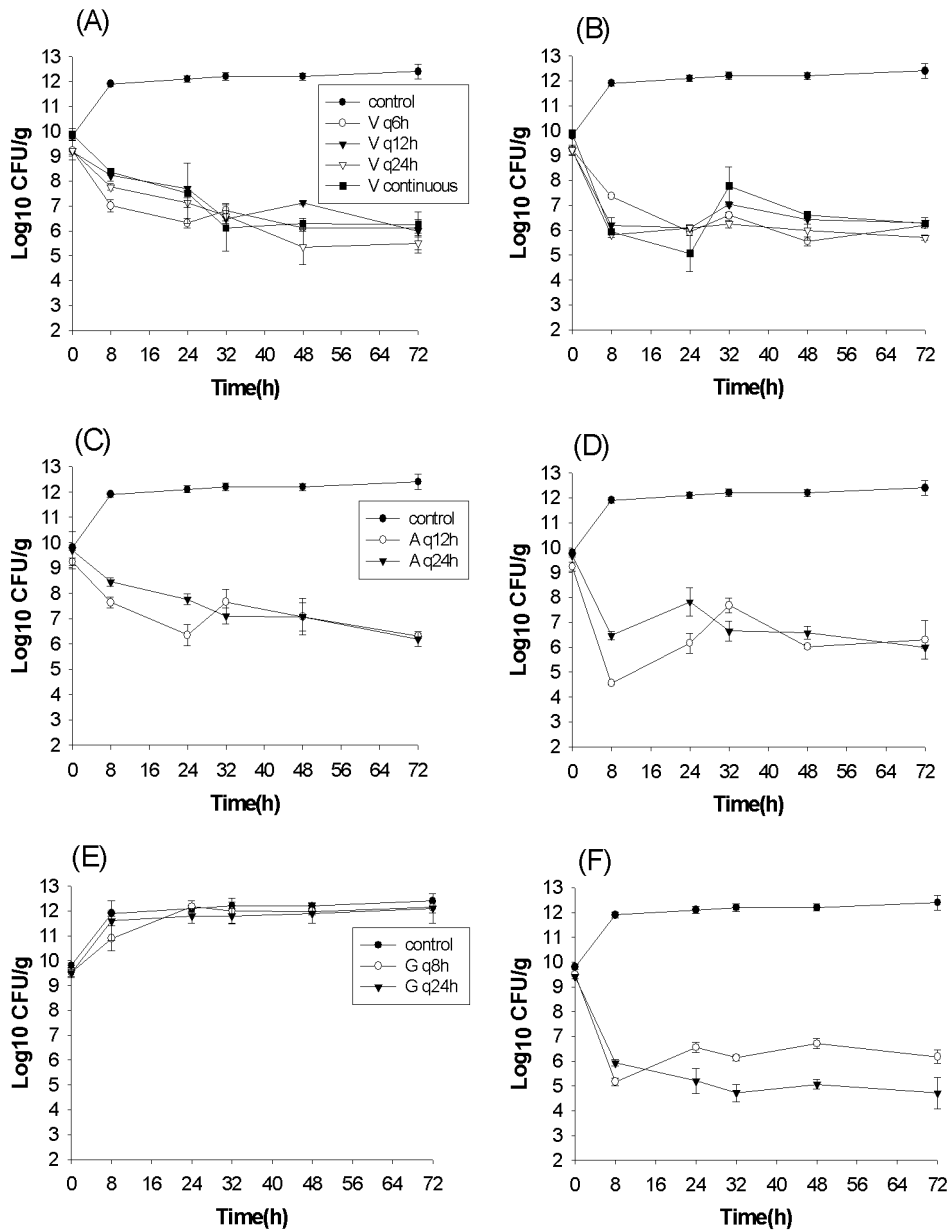
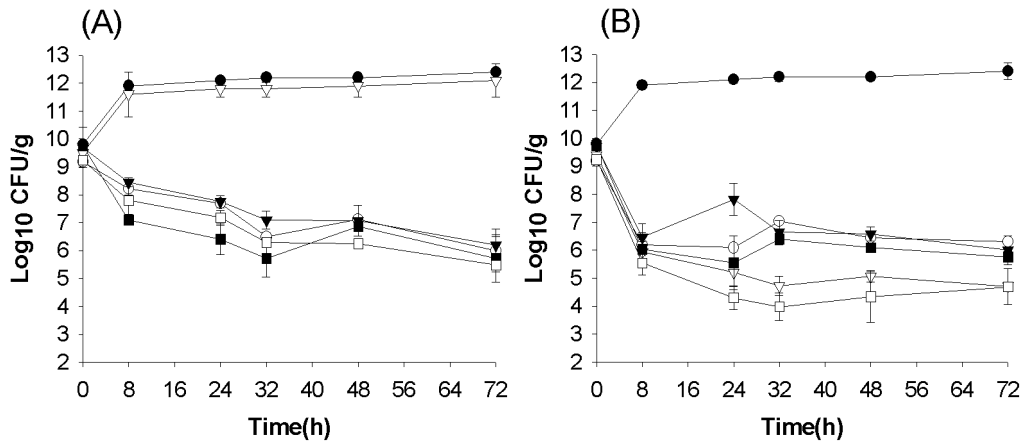


Figure 2. Fibrin clot killing curve for GR153 (A, C, E) and GS171 (B, D, F) in the *in vitro* infective endocarditis model. V, vancomycin (A & B); A, arbekacin (C & D); G, gentamicin (E & F).



**Figure 3.** Fibrin clot killing curve for GR153 (A) and GS171 (B) in the *in vitro* infective endocarditis model. —●—, control; —○—, vancomycin q 12 h; —▼—, arbekacin q 24 h; —▽—, gentamicin q 24 h; —■—, vancomycin q 12 h + arbekacin q 24 h; —□—, vancomycin q 12 h + gentamicin q 24 h.

GR153에서 vancomycin과 arbekacin 병합주입군은 24시간 까지 상가작용이 있었고 그 후엔 무관작용을 보였다. 반면 같은 군주의 vancomycin과 gentamicin 병합주입군이나 GS171에서의 vancomycin과 gentamicin 병합주입군, vancomycin과 arbekacin 병합주입군은 전 실험기간 동안 무관작용을 보였다(Figure 3). 전 실험과정에 걸쳐 항균제 내성은 발현되지 않았다.

## 고 찰

MRSA는 병원감염의 대표적인 원인균으로 점차 증가추세에 있고  $\beta$ -lactams이외에 aminoglycosides, macrolides, fluoroquinolones 등의 다른 항균제에도 내성을 보이는 경우가 많아 심각한 문제가 되고 있다(25-28). 국내에서는 MRSA중 gentamicin에 대한 MIC90은 128 ug/mL이며 감수성은 6.8%에 지나지 않는다고 보고가 있었다(10). MRSA 감염증에 vancomycin이 선택약제로 사용되고 있지만 중증감염에서는 반응이 늦거나 실패하기도 하고, 최근에는 vancomycin에도 감수성이 저하된 균이 보고되고 있어 대처방법의 개발이 시급히 요구되고 있다(1, 3).

Arbekacin은 dibekacin의 유도체로 다른 aminoglycoside와 교차내성이 없고, MRSA가 생성하는 각종 불활성화 효소에 안정하여 MRSA 감염에 사용할 수 있을 것으로 기대되고 있다(7). 그러나 그동안의 arbekacin의 항균력을 평가한 연구는 대부분이 시험관내 방법이었다(6, 8-12).

시험관내 실험 결과를 바로 임상에 응용하기엔 한계가 있다. 왜냐하면 시험관내 실험은 실험하는 동안 항균제의 농도가 감소하지 않은 채로 일정하게 유지되고, 새로운 배지가

공급되지 않으며, 대사산물을 제거하지 못하기 때문이다. 실제로 체내에서는 항균제 투여 후 혈청내 농도가 증가해 최고치에 도달했다가 시간이 지나면서 반감기에 따라 감소하여 결국 MIC이하의 농도로 떨어지게 된다. 따라서 시간에 따른 항균제 농도의 감소를 체내와 유사하도록 시험관내 감염모델을 만들어 연구하는 것이 중요하다. 시험관내 감염모델은 항균제의 반감기, 투여 용량 및 간격 등을 사람 약동학에 맞출 수 있어 항균제의 효과관정에 유용하며 동물모델과 비교하여 차이가 없고 환경조건을 조절할 수 있다는 장점이 있다(17, 20, 29-31). 본 연구에서는 사람의 체내 환경과 유사한 조건을 만들 수 있는 시험관내 심내막염 모델을 국내 처음으로 적용하여 MRSA에 대한 vancomycin, arbekacin의 효과를 알아보고자 하였다.

약동학적 지표들은 의도했던 수치로 나와 시험관내 심내막염 모델의 기능이 원활함을 알 수 있었다.

GR153과 GS171을 비교하였을 때 vancomycin, arbekacin 단독주입군에서 8시간째 측정된 집락수는 GS171에서 GR153보다 의미있게 낮았지만 72시간째의 집락수엔 차이가 없었다. 또한 GR153의 경우 72시간의 실험기간 동안 시간이 지날수록 집락수가 점차 감소하는 추세를 보인 반면 GS171은 단독주입군 모두에서 8시간째까지 집락수가 급격히 감소하였고 그 후엔 8시간째의 집락수와 비교해 더 감소하지는 않았다. 따라서 gentamicin 내성 MRSA의 경우 감수성 균에 비해 vancomycin, arbekacin의 초기 항균효과가 늦게 나타나지만 시간이 갈수록 두 균에 대한 살균력은 비슷해짐을 알 수 있었고, 항균제 내성기전과 관련된 현상으로 생각된다.

Vancomycin과 arbekacin 단독주입군을 비교하였을 때 72

시간제 두 항균제의 살균력에는 차이가 없어 arbekacin이 MRSA에 의한 심내막염 치료에 효과적일 수 있음을 알 수 있었다. Arbekacin과 gentamicin 단독주입군에서는 GS171의 경우 gentamicin을 24시간마다 주입한 군에서 살균력이 가장 높았다. Aminoglycoside의 살균력을 평가하는 지표인  $C_{max}/MIC$ 가 가장 높았던 것이 원인일 것으로 생각된다.

Vancomycin 단독주입군에서 투여간격을 달리한다고 해서 fibrin clot내 집락수 감소의 정도는 달라지지 않았다. Vancomycin은 시간의존성 항균제로 24시간동안 지속적으로 투여하는 것이 이론적으로 가장 뛰어난 효과를 보이는 것으로 알려져 있지만 본 연구에서 차이가 없었던 것은 Table 1에서 보듯이 간헐적 주입군과 지속적 주입군 모두 전 실험기간 동안 MIC이상의 농도를 유지하고 있었기 때문으로 생각된다.

Arbekacin 역시 투여간격에 따른 항균력의 변화는 관찰되지 않았지만 GR153, GS171 모두 24시간까지는 12시간간격의 투여가 항균력이 더 뛰어났고 그 이후엔 차이가 없어 두 군 모두 arbekacin의 하루 1회 투여가 가능할 것으로 예측된다. 실험에 사용된 arbekacin의 최고농도는 성인에게 200 mg/일 투여를 기준으로 설정한 것으로 vancomycin과 달리 농도의 존성 항균제인 arbekacin을 고농도로 투여하는 실험을 추가로 해 볼 필요가 있겠다.

MRSA 심내막염을 효과적으로 치료하는 다른 방법으로 항균제 병합요법이 있다. 지금까지 vancomycin과 gentamicin을 병합할 경우 일부에서 상승작용이 있다는 보고가 있었지만 아직 정립되어 있지는 않고 gentamicin에 대한 MIC 정도에 따라 결과가 다르다(13, 14, 22, 32). 또한 국내 MRSA의 gentamicin 내성정도가 매우 높은 것을 고려할 때 vancomycin과 gentamicin 병합투여시 상승작용이 있을 가능성은 비교적 적었다. 그러나 시험관내 실험에서 gentamicin과 교차내성이 없는 arbekacin을 vancomycin과 병합하였을 경우엔 대부분이 상승작용이 있다고 보고되고 있다(6, 9).

김 등(14)의 보고에 의하면 본 실험에 사용된 GR153과 같이 gentamicin에 대한 MIC가 32 ug/mL인 균주에서는 vancomycin과 gentamicin 병합시 상승작용을 기대하기는 어려웠다. 예상대로 vancomycin과 gentamicin 병합주입에는 무관작용을 보였다. 그러나 vancomycin, arbekacin 병합시 상승작용은 아니지만 24시간까지는 상승작용이 있었고 그 이후엔 무관작용인 흥미로운 결과를 보였다. 또한 GS171에서는 vancomycin과 arbekacin 혹은 vancomycin과 gentamicin의 병합주입시 모두 무관작용을 보였다. 이러한 현상은 항균제 병합시 상승작용은 gentamicin 내성정도 뿐만 아니라 균의

접종량 및 활성도, 시간에 따른 fibrin clot내 침투력, 단백질 결합정도 등에 영향을 받기 때문으로 생각된다.

결과에 나타내지는 않았지만 fibrin clot내 항균제 농도는 vancomycin의 경우 8시간제 배지내 농도와 같은 정도로 유지되어 전 실험기간 동안 비슷한 농도로 유지되었다. 반면 arbekacin, gentamicin은 24시간제에 배지내 농도의 1/2 정도가 측정되었고 그 후 시간에 따라 많은 농도의 변화가 있었다. 항균제의 종류에 따라 fibrin clot내 침투력에 차이가 있고, 혈청과 fibrin clot내 항균제 농도의 차이가 존재하며 fibrin clot의 중심부와 변연부 사이에도 농도의 경사가 있어 그 차이에 따라 살균력에 변화가 있을 수 있다고 보고되고 있어(33, 34) 본 실험에서 배지와 fibrin clot내 농도의 차이, 항균제와 시간에 따른 농도의 차이 등이 MRSA에 대한 항균력에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

결론적으로 생체와 유사한 조건을 만들어 실험할 수 있는 시험관내 감염모델이 시험관내 실험결과와 단점을 보완하고, 임상에 적용하기 전 예비자료를 제시할 수 있는 유용한 방법 중의 하나로 생각된다. 시험관내 심내막염 모델에서 MRSA에 대한 arbekacin의 효과가 vancomycin과 유사하여 MRSA에 의한 심내막염 환자에서 vancomycin에 대한 반응이 좋지 않은 경우 대체가 가능할 것으로 예상된다. 또한 gentamicin 내성 MRSA에서 vancomycin과 arbekacin을 병합할 경우 24시간까지는 상승작용이 있어 심내막염 환자에게 초기에는 병합요법의 사용이 도움이 될 것을 시사한다.

향후 본 결과의 임상적 의미를 평가하기 위한 추가적인 연구와 arbekacin 고농도 주입, 다른 항균제와의 병합 등의 추가 실험이 필요하겠다.

## 요 약

**목 적 :** Methicillin 내성 포도구균(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)은 병원감염의 중요한 원인균으로 vancomycin이 선택약제이다. 그러나 심내막염 등의 중증감염에서는 vancomycin의 치료실패와 함께 최근 내성균도 증가하고 있어 vancomycin을 대체할 수 있는 항균제와 보다 효과적인 항균요법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 사람의 환경과 유사한 시험관내 감염 모델을 적용하여 MRSA 치료를 위한 vancomycin, arbekacin, gentamicin의 단독 및 병합효과를 비교하였다.

**방 법 :** 임상에서 분리된 MRSA 2균주(GR153, gentamicin 내성; GS171, gentamicin 감수성)로 fibrin clot을 제작하여 시험관내 심내막염 모델을 만들어 vancomycin, arbe-

kacin, gentamicin을 단독 혹은 병합주입하였다. 반감기와 최고 및 최저농도는 사람의 약동학을 기준으로 하였다. Vancomycin은 6, 12, 24시간마다 주입하거나 24시간 연속주입하였고 arbekacin은 12, 24시간마다, gentamicin은 8, 24시간마다 주입하였다. 병합주입의 경우 vancomycin은 12시간마다, gentamicin, arbekacin은 24시간마다 투여하였다. 각 투여군의 살균효과는 0, 8, 24, 32, 48, 72시간째의 fibrin clot내 집락수로 측정하였다.

**결 과 :** GR153에 gentamicin을 주입한 군 이외의 모든 실험군에서 대조군에 비해 의미있게 fibrin clot내 집락수가 감소하였다( $P<0.001$ ). Vancomycin과 arbekacin 단독주입군에서 8시간째의 집락수는 GR153보다 GS171에서 의미있게 낮았고( $P=0.02$ ), GS171에 arbekacin 12시간마다 투여한 군의 집락수가 가장 낮았다( $P=0.01$ ). 72시간째 집락수는 군주의 종류나 vancomycin 혹은 arbekacin의 투여간격에 따른 차이가 없었다. GR153에서 vancomycin과 arbekacin의 병합주입군은 24시간까지 상가작용이 있었으나 vancomycin과 gentamicin 병합주입에서는 무관작용이었고 GS171에서도 72시간 동안 무관작용을 보였다. 또한 전 실험기간 동안 내성균은 발견되지 않았다.

**결 론 :** 시험관내 심내막염 모델에서 MRSA에 대한 arbekacin의 항균력은 vancomycin과 유사하여 단독주입이 가능함을 시사한다. Gentamicin 내성균주의 경우 두가지 항균제의 병합주입으로 24시간까지 상가작용을 보이고 있으나 임상에 적용하기 위해서는 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감 사 문

본 논문의 실험을 위해 arbekacin을 제공해 준 중외제약에게 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Levine DP, Fromm BS, Reddy BR: Slow response to vancomycin, or vancomycin plus rifampin in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann Intern Med* 115:674-680, 1991
- 2) Moreno F, Criso C, Jorgensen JH, Patterson JE: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin Infect Dis* 21:1308-1312, 1995
- 3) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40:135-136, 1997
- 4) Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster

- MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR: Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 340:493-501, 1999
- 5) Mylonakis E, Calderwood SB: Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med* 345:1318-1330, 2001
- 6) Kono K, Takeda S, Tatara I, Arakawa K: In vitro activities of arbekacin, alone and in combination, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Antibiot* 47:710-719, 1994
- 7) Kobayashi Y, Uchida H, Kawakami Y: Arbekacin. *Int J Antimicrob Agents* 5:227-230, 1995
- 8) Watanabe T, Ohashi K, Matsui K, Kubota T: Comparative studies of the bactericidal, morphological and postantibiotic effects of arbekacin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 39:471-476, 1997
- 9) You I, Kariyama R, Zervos MJ, Kumon H, Chow JW: In-vitro activity of arbekacin alone and in combination with vancomycin against gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36:37-41, 2000
- 10) 위성현, 강진환, 허동호, 이동건, 김상일, 김양리, 최정현, 김종현, 유진홍, 허재균, 신완식, 강문원: *Staphylococcus aureus*와 coagulase-negative staphylococcus species에 대한 arbekacin의 시험관내 항균력. *감염* 33:254-260, 2001
- 11) 하승희, 정석훈, 정태식, 서대영, 장철훈, 남희준, 백용운, 지종현: Glycopeptide, arbekacin 및 quinupristin/dalfopristin의 항-황색포도구균 항균력. *감염* 33:261-266, 2001
- 12) Cordeiro JC, Reis AO, Miranda EA, Sader HS: In vitro antimicrobial activity of the aminoglycoside arbekacin tested against oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis* 5:130-135, 2001
- 13) Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR: Vancomycin-gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1534-1535, 1996
- 14) 김은옥, 김양수, 김백남, 박수진, 이상오, 정두련, 김미나, 우준희, 배직현, 류지소: 메티실린 내성 황색 포도상구균에서 vancomycin과 gentamicin 병용의 항균력 상승효과: gentamicin 감수성에 따른 영향. *감염* 30:156-164, 1998
- 15) Kang SL, Rybak MJ: Pharmacodynamics of RP 59500 alone in combination with vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an in vitro-infected fibrin clot model. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1505-1511, 1995
- 16) Den Holladner JG, Horrevorts AM, van Goor MLPJ, Verbrugh HA, Mouton JW: Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an in vitro pharma-



- cokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 41:95-100, 1997
- 17) 허동호, 이동건, 최정현, 유진홍, 신완식 : 시험관내 역동모델을 이용한 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 ceftriaxone 과 amikacin의 병용요법. *임상약리학회지* 7:40-48, 1999
  - 18) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) : *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement. NCCLS document M100-S11, Wayne, Pennsylvania, USA. 2001*
  - 19) Thompson DF, Letassy NA, Thompson GD : *Fibrin glue : a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. Drug Intell Clin Pharm* 22:946-953, 1988
  - 20) Grasson S : *Historical review of in vitro models. J Antimicrob Chemother* 15(Suppl A):99-102, 1985
  - 21) McGrath BJ, Kang SL, Kaatz GW, Rybak MJ : *Bactericidal activities of teicoplanin, vancomycin, and gentamicin alone and in combination against Staphylococcus aureus in an in vitro pharmacodynamic model of endocarditis. Antimicrob Agents Chemother* 38:2034-2040, 1994
  - 22) Houlihan HH, Mercier RC, Rybak MJ : *Pharmacodynamics of vancomycin alone in combination with gentamicin at various dosing intervals against methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected fibrin platelet clots in an in vitro infection model. Antimicrob Agents Chemother* 41:2497-2501, 1997
  - 23) Blaser J : *In vitro model for simultaneous simulations of the serum kinetics of two drugs with different half-lives. J Antimicrob Chemother* 15(Suppl A):125-130, 1985
  - 24) Eliopoulos GM, Moellering RC : *Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editors. Antibiotics in laboratory medicine 4th ed. P330-396, Baltimore : Williams & Wilkins, 1996*
  - 25) Aldridge KE, Gelfand MS, Schiro DD, Barg NL : *The rapid emergence of fluoroquinolone-methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in a community hospital. An in vitro look at alternative antimicrobials. Diagn Microbiol Infect Dis* 15:601-608, 1992
  - 26) Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, Kauffman CA, Yu VL : *Methicillin resistant Staphylococcus aureus : a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am J Med* 94:313-328, 1993
  - 27) 김준명, 박은숙, 정재심, 김경미, 김정미, 오향순, 윤성원, 이상일, 이무송, 송재훈, 강문원, 최강원, 박승철, 배직현 : 1996년도 국내 병원감염률 조사연구. *병원감염관리* 2:157-176, 1997
  - 28) Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz HP, Jones ME : *The prevalence of aminoglycosides resistance and corresponding genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother* 43:253-259, 1999
  - 29) Lintz W : *Pharmacokinetic considerations for the setting of in vitro models. J Antimicrob Chemother* 15(Suppl A):85-97, 1985
  - 30) 이동건, 허동호, 신완식 : 항균제의 약동학/약력학. *대한화학회지* 17:99-113, 1999
  - 31) Herchberger E, Coyle EA, Kaatz GW, Zervos MJ, Rybak MJ : *Comparison of a rabbit model of bacterial endocarditis and an in vitro infection model with simulated endocardial vegetations. Antimicrob Agents Chemother* 44:1921-1924, 2000
  - 32) Watanakunakorn C, Trisone JC : *Synergism between vancomycin and gentamicin or tobramycin for methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Antimicrob Agents Chemother* 22:904-905, 1982
  - 33) Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Azancot A, Raffoul H, Bouvet A, Pocard JJ, Carbon C : *Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. J Infect Dis* 159:938-944, 1989
  - 34) Bergeron MG, Robert J, Beauchamp D : *Pharmacodynamics of antibiotics in fibrin clots. J Antimicrob Chemother* 31(Suppl D):113-136, 1993