

황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상

계명대학교 의과대학 미생물학 교실

박종욱 · 전도기

전북대학교 의과대학 미생물학 교실

하대유

=Abstract=

Tolerance Phenomenon of *Staphylococcus aureus* to Methicillin

Jong Wook Park, M.D., Doki Chun, M.D.

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine
Taegu, Korea

Tai You Ha, M.D.

Department of Microbiology and Immunology,
Chonbuk National University Medical School, Iri, Korea

Susceptibility and tolerance of 40 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to methicillin (Mt) were tested by broth dilution susceptibility test and time killing curves to estimate frequency of tolerance and evaluate the effect of bacterial growth phase and compositions of media on the expression of tolerance of organisms.

In the tests using stationary-phase culture (SPC) and Mueller-Hinton broth (MHB) supplemented with 0.3% yeast extract (MHBY), 36 clinical isolates were susceptible to Mt. Thirty two (89%) of 36 isolates of Mt-susceptible *S. aureus* (MSSA) were tolerant to Mt after 24hr of incubation, but none of methicillin resistant *S. aureus* showed tolerance to Mt. Survivals of tolerant MSSA were high at high concentrations of Mt. However, the survivors were not resistant to Mt and survival rates were decreased after 48hr of incubation.

Ability of tolerance expression were varied by culture phase of organism and media used. SPC didn't show tolerance in the MHBY supplemented with sodium deoxycholate, and nutrient broth (NB), however, in the MHB, MHBY, NB supplemented with NaCl, and NaCl (2%)-and cation (Ca, 50mg/ℓ ; Mg, 25mg/ℓ)-supplemented MHB (CSMH), it showed typical tolerance to Mt. The most effective medium on the expression of tolerance of MSSA was CSMH, in which killing of organisms at high concentrations of Mt (512–256 μg/ml) was delayed to 72hr of incubation. Log-phase culture showed tolerance only in the CSMH, and among the ingredients of this media, NaCl is the strongest inducer of tolerance.

서 론

세균의 약제에 대한 내성은 돌연변이나 다른 내성균으로 부터 R plasmid를 획득함으로써 이루어진다. 세균이 약제에 대해 내성을 가지면 고농도의 약제존재하에서도 세균은 분열 중식하게 되어 약제의 최소발육억제농도(MIC)가 높아져 화학요법 제로서의 가치가 저하되거나 소실된다. 그러나 이러한 일반적인 내성외에, 약제의 MIC는 낮으나 세균의 상당수가 약제에 의해 죽지않고 생존이 연장되어 약제의 효과를 약화 또는 감소시키는 현상이 있는데 이러한 형의 내성을 내약성(tolerance)이라 한다(Tuomanen et al., 1986). 이러한 현상은 Tomasz 등(1970)이 *Streptococcus pneumoniae*의 penicillin(Pc)에 대한 감수성검사에서 autolysis이 결핍된 돌연변이주가 Pc에 잘죽지 않고 내약성을 보인다고 처음 보고 함으로써 알려졌으며, 이후 수년간에 걸쳐 여러 연구자의 실험과 관찰에 의하여 포도상구균과 연쇄상구균이 beta-lactam계 항균제에 내약성을 잘 나타내는 균종으로 알려져 왔다(Handwerger et al., 1985; Kaye, 1980; Norden et al., 1981).

황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성은 이균의 methicillin(Mt) 내성율의 증가와 더불어 황색포도상구균 감염증 치료를 어렵게 만드는 중요한 요소이다. Watanakunakorn 등(1973)은 penicillinase-resistant penicillins의 개발에도 불구하고 황색포도상구균에 의한 균혈증환자의 치사율이 50%에 이른다고 보고하였으며, Mayhall 등(1976)은 이렇게 치사율이 높은 이유를 황색포도상구균의 Mt내성과 beta-lactam 항균제에 대한 내약성때문이라고 생각하였다. 이들은 oxacillin(Ox)에 감수성을 보이는 황색포도구균에 감염된 환자들을 Ox로 치료하였으나 증상이 호전되지 않았으며, 이 환자들에서 분리된 균들을 대상으로 액체회석법에 의한 항균제감수성 검사를 실시한바, 이균들에 대한 Ox의 MIC는 낮으나 최소살균농도(MBC)는 매우높게 나타났다고 보고하였으며, Hilty 등(1980)도 Ox에 내약성이 있는 황색포도상구균에 의한 균혈증에 대해서 보고하고, 이러한 내약성균들은 원내감염을 잘 일으키며, 이들의 치료에 있어서도 단일약제요법보다 적절한 약제간의

병용요법이 효과적임을 지적하였다. 그외 여러 연구들이 포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성으로 인해 Pc Ox, Mt 등을 이용한 항균요법이 실패한 예를 보고하였으며(Denny et al., 1979; Sabath et al., 1977), Goessens 등(1984)은 동물실험을 통하여 Mt에 내약성을 보이는 균과 내약성을 보이지 않는 균을 마우스에 감염시킨뒤 Mt로 치료한결과 내약성균에 감염된 마우스의 근육에서 훨씬 많은 수의 균이 검출되었다고 보고하였다.

그러나 이러한 내약성의 임상적 중요성에도 불구하고 황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제 내약성에 대한 실험 결과는 보고자에 따라 많은 차이가 있었다. 이러한 차이는 첫째, 내약성을 규정짓는 기준이 실험실마다 일정치 않았기 때문으로, Venglarcik 등(1983)은 MBC/MIC 비가 100 이상 일때를 내약성이라 정하였으며, Sabath 등(1977), Taylor 등(1983), Kim 등(1983) 및 Denny 등(1979)은 MBC/MIC 비가 각각 36, 36이상, 16이상, 8이상일때를 내약성이라고 판정하였으며, Goessens 등(1984)은 내약성백분율이 2% 이상일때를 내약성이라 정하였기 때문이다. 둘째는 약제의 MBC 검사과정에 있어서 그 결과가 여러가지 실험조건에 따라서 민감한 영향을 받기 때문이다. Goessens 등(1982)과 Ishida 등(1982)은 시험관내의 생존균수를 측정하기 위해 평판배지 위에 이식배양할 때 접종균액 내의 잔여 항균제에 의해 생존균수가 현저히 저하된다고 보고하였으며, Mayhall 등(1980)과 Taylor 등(1983)은 접종균의 발육상에 따라 내약성 변화가 크며, 정균기의 배양균 일수록 생존균이 더 많다고 보고하였다. Ishida 등(1982)은 황색포도상구균은 녹농균에서 보는 바와 같이 시험관벽에 부착성이 있어 약제와 균액의 혼합과정에서 상부시험관벽에 붙은 균은 약제에 노출되지 않음으로 MBC 검사결과에서 생존균수를 증가시킨다고 하였다. 그외 세균배지(Kim et al., 1979; Peterson et al., 1978), pH(Venglarcik et al., 1983), 배양시간(Sabath et al., 1977; Goldman et al., 1979; Ampel et al., 1984)등에 따르는 약제의 MBC 또는 균의 내약성 변화들이 보고되어 왔다. 따라서 내약성을 결정하는 데는 매우 세심한 기술적인 배려가 요구된다.

내약성을 규정하는데 있어서 이러한 여러가지

기술적인 어려움과 더불어 내약성 개념 자체에 대한 논란이 야기되고 있다. 황색포도상구균이 beta-lactam계 항균제에 의해 균의 성장을 억제되나 치사농도 이상에서도 균의 사멸이 지연되어 이상적으로 균이 많이 생존해 있는 현상을 autolysis 결과로 돌연변이주의 출현으로 인해 대수살균속도가 느려진 경우 (Tomasz et al., 1970) 또는 paradoxical effect (Eagle et al., 1948 ; Garrod, 1945) 또는 persister phenomenon (Hobby et al., 1987 ; Bigger, 1944 ; Gunnidon et al., 1964) 등으로 설명하고 있으며, Woolfery 등 (1985)은 한천평판회석법을 이용한 Ox 살균능검사에서, 내약성은 인위적이고 변동스러운 개념이며 굳이 고농도의 약제하에서도 죽지 않고 높은 persister percentage를 보이는 것을 내성형의 일종인 내약성으로 표현하는 것은 부적절하다고 지적하였다.

본실험에서 저자는 황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성 실태를 파악하고 이 균의 내약성표현에 영향을 미치는 여러요소들을 규명하고자, 황색포도상구균을 대상으로 실현조건을 다양하게 한 액체배지 회석법으로 Mt에 대한 항균제감수성검사를 실시하여 얻은 결과로써 내약성의 본체를 추구하였다.

방법 및 재료

군 주 : 계명대학교 의과대학 미생물학교실과 동산의료원 임상검사실에 의뢰된 각종 임상가검물에서 분리동정된 황색포도상구균 40주를 대상으로 실험하였다. 가검물을 혈액한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, 생성된 접락 중에서 포도상구균으로 의심되는 것들을 다시 trypticase soy agar (TSA) 배지에 순배양한 다음, 동정하여 황색포도상구균으로 판정된 것들을 nutrient agar 배지에 보존한 후 실험에 사용하였다. 공사균의 동정은 균의 혈액한천배지 발육상과 용혈성, Gram 염색상 및 배열형태, 색소생산성, Dnase 생산성, gelatin 분해능, mannitol 분해능 및 coagulase 산생성을 검사하여 황색포도상구균임을 확인하였다 (Koneman et al., 1988 ; Kibos et al., 1975)

항균제 : 항균제는 Mt (한울주식회사)을 사용하였다. 항균제를 Thornsberry 등 (1983)의 방법에 준하여 멸균된 증류수에 용해시킨 뒤 소분하여 -70

°C에 냉동 보존하였으며, 필요에 따라서 1개씩 취하여 녹인 뒤 배지로 적당히 희석하여 사용하였다. 배지 : 항균제감수검사에서 약제와 균희석 및 배양에는 주로 Mueller Hinton broth (MHB)에 yeast extract를 0.3% 첨가한 배지 (MHBY)를 사용하였다. 이 배지는 박. 전 (1986)의 실험에서 황색포도상구균의 성장에 적합한 것으로 보고되었다. 그의 필요에 따라서 MHB, MHB에 Ca (50mg/l), Mg (25mg/l)과 NaCl (2%)을 첨가한 배지 (CSMH), MHBY나 CSMH에 sodium deoxycholate (SD, 1/2 ~ 1/4 MIC of SD)를 첨가한 배지 (MHBY-SD, CSMH-SD), nutrient broth (NB), NB에 NaCl (2%)을 첨가한 배지 (NB-NaCl)를 사용하였다. 균생존검사용 배지로는 TSA를 사용하였으며, 생존균의 Mt 내성여부를 판정하기 위한 배지로는 각균에 대한 최소발육억제농도의 Mt를 함유시킨 TSA (Mt-TSA)를 사용하였다.

접종균의 조제 : 정균기 배양균 (stationary-phase culture, SPC)은 TSA상에 발육된 접락을 trypticase soy broth (TSB)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 배양한 것이며, 대수증식기 배양균 (log-phase culture, LPC)은 SPC를 다시 TSB에 100배 희석한 후 37°C에서 3시간 더 배양한 것이다. 대수 항균제감수성검사 및 균생존율검사에서는 SPC를 사용하였으며, 특별히 LPC를 사용한 경우는 실험결과에 사용여부를 명기하였다. SPC 또는 LPC를 MHBY 등의 배지에 $1\sim2\times10^6$ CFU/ml 농도로 부유시킨 후 항균제감수성검사 및 균생존율검사에 사용하였으며, 이때 항균제액과 혼합되었을 때 최종균농도는 $0.5\sim1\times10^6$ CFU/ml가 된다.

항균제감수성검사 : 액체배지회석법에 의하여 포도상구균의 Mt에 대한 내성 또는 감수성 여부를 실험하였다. 공시 항균제를 배지에 적정농도로 희석시키고 2배 순차배열 회석하여 항균제감수성검사용 배지를 만든 후 멸균된 시험관에 1ml씩 분주하였다. SPC 또는 LPC를 배지에 $1\sim2\times10^6$ CFU/ml 농도로 부유시켜 접종균액을 만든 뒤, 준비된 항균제 배지에 1ml씩 접종하고 균액과 항균제가 잘 혼합되게 진탕하였다. Ishida 등 (1982)이 보고한 접종균의 "splashing effect"를 제거하기 위하여, 상기한 균-항균제 혼합액을 micropipette (Gilson, p-1000)으로 멸균된 세유리시험관 바닥에 조심스럽게 분주한 후 37°C에서 20시간 배양한다. 육안으로 보아

- 박종욱 · 전도기 · 하대유 : 황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상 -

Table 1. Methicillin-susceptibility of *S. aureus* isolated (40 strains)

Mt ^a susceptibility	Percent survival ^b	Strain no.
Susceptible (MIC of Mt, ≤ 8 μg/ml)	> 1.0	1, 4, 8, 41, 42, 100, 124, 179, 182, 183,
	1.0–0.1	184, 188, 189, 190, 193, 194, 195, 196
	< 0.1	3, 6, 9, 48, 91, 129, 178, 180, 181, 185 186, 187, 192, 197 15, 47, 102, 191
Resistant (MIC of Mt, > 8 μg/ml)	≥ 0.1	81
	< 0.1	13, 75, 131

^a Mt, methicillin.

^b Percent survival of strains at 256 μg/ml of Mt.

균성장이 안된 시험관을 15초간 진탕혼합시키고 4시간 더 배양한 후 MIC를 측정하였으며, 균의 내성 및 감수성 여부는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (1983)의 기준에 따라 Mt의 MIC가 16 μg/ml 이상인 것을 내성, 8 μg/ml 이하인 것을 감수성으로 판정하였다.

균생존율검사 : 항균제감수성검사후 MIC 이상에서의 시간경과에 따르는 생존균수 변화를 알아보기 위하여 TSA를 사용하여 한천평판계산법을 실시하였다. 항균제 함유 시험관내용물을 TSA에 옮겨 배양할 때 접종균액 내의 잔여항균제 효과를 제거하기 위해 시험관내용물을 배지로 10배 희석하고 이 희석액 0.1ml를 균생존검사용 배지(직경 9cm) 가운데 접종한 다음, 멀균된 L자 봉지로 배지 전면을 균등하게 도말하여 접종균이 확산되게 한 후 37 °C에서 48시간 배양하여 생성된 접락수를 세었다. 이과정에서 512 μg/ml 농도의 항균제는 한천평판(ca. 63cm)상에서 0.25 μg/ml 이하의 농도로 희석되므로 진여항균제에 의한 포도상구균 성장억제 효과는 제거될 수 있다. 배양 48시간 및 72시간 때도 이와 같은 방법으로 MIC 및 생균수를 측정하였으며, 그 결과를 time kill curve로 나타내거나 균생존율(% survival)을 구하여 평가하였다.

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{No. of viable cells after incubation}}{\text{No. of organisms inoculated}} \times 100$$

결 과

분리된 황색포도상구균 40주를 대상으로 액체배지희석법에 의하여 512–2 μg/ml로 순차희석된 Mt를 함유하는 배지에서 항균제 감수성검사를 실시 하였으며, 황색포도상구균의 Mt에 대한 내약성 실태를 파악하기 위하여 MIC를 측정한 후 고농도의 Mt (256 μg/ml)가 함유된 시험관내용물을 TSA 평판배지에 이식배양하여 생존균수를 계산하였다 (표 1). 공시균 40주 중 Mt의 MIC가 4 μg/ml 이하 즉 감수성균 (Mt-susceptible *S. aureus*, MSSA)으로 판정된 균은 36주 였으며, 나머지 4주는 Mt의 MIC가 16 μg/ml 이상인 Mt 내성균 (Mt-resistant *S. aureus*, MRSA)으로 판정되었다. 배양 24시간 후 Mt가 256 μg/ml 농도로 함유된 배지에서의 공시균의 균생존율을 비교한 결과, MSSA는 총 36주 중 균생존율이 1.0% 이상으로 나타나 것이 18주, 1–0.1%로 나타나 것이 14주, 그리고 0.1% 미만으로 나타난 것이 4주 였으나, MRSA는 81번 균주를 제외하고는 모든 균생존율이 0.1% 미만으로 나타난 MRSA보다 MSSA가 고농도의 Mt하에서 생존하는 균수가 더 많음을 알 수 있다.

표 1의 성적을 토대로, MSSA하면서 고농도의 Mt하에서 균생존율이 높은 균과 낮은 균을 임의로 선택하여 두농도의 Mt (128, 8 μg/ml)하에서 시간경과에 따르는 균수변화를 비교하였다 (표 2, 그림 1). 저농도의 Mt (8 μg/ml)하에서는 모든 공시균들의 균생존율 차가 크지 않았으며, 배양 24시간 내에 생존균수가 현저히 감소하였다. 고농도의 Mt

Table 2. Bactericidal activity of two concentrations of methicillin to *Staphylococcus aureus*

Strain no. ^a	Conc. of Mt in MHBY ^b ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colony-formers/ml (% survival) at incubation (hr) of		
		6	24	48
15	128	1.2×10^5 (13.3)	8×10 (0.009)	<10(<0.001)
	8	2.5×10^3 (0.28)	2×10 (0.002)	1×10 (0.001)
102	128	1.4×10^4 (4.6)	3×10 (0.009)	<10(<0.003)
	8	3.6×10^3 (1.2)	1×10 (0.003)	<10(<0.003)
48	128	1.5×10^5 (14.0)	5×10^3 (0.5)	<10(<0.001)
	8	2.6×10^3 (0.26)	2×10 (0.002)	<10(<0.001)
124	128	3.5×10^6 (28.3)	1.2×10^4 (1.0)	1×10 (<0.001)
	8	1.0×10^3 (0.083)	<10(<0.001)	<10(<0.001)
129	128	5.7×10^6 (52.0)	1.2×10^3 (0.11)	<10(<0.001)
	8	1.0×10^3 (0.09)	5×10 (0.005)	<10(<0.001)

^a MSSA selected at random. Inoculum size (CFU/ml) and MIC of Mt ($\mu\text{g/ml}$) of strain 15, 102, 48, 124 were respectively 9.0×10^5 , 2 ; 3.0×10^5 , 2 ; 1.0×10^6 , 4 ; 1.2×10^6 , 2 ; 1.1×10^6 , 2.

^b Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract.

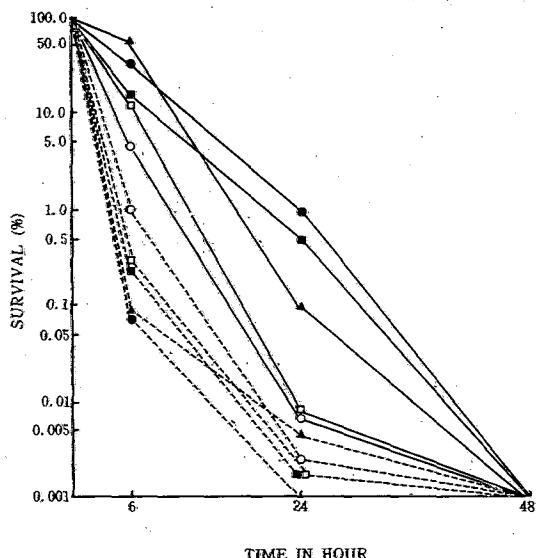


Fig. 1. Killing curve of *S. aureus* at $128 \mu\text{g/ml}$ (—), and $8 \mu\text{g/ml}$ (---) of Mt in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract. MICs of Mt to strains tested are 48(■), 4;124(●), 2;129(▲), 2;15(□), 2;102(○), 2 $\mu\text{g/ml}$.

($128 \mu\text{g/ml}$) 하에서는 48, 124, 129번균의 균생존율은 높으나, 15, 102번균은 모두 0.01% 이하로 매우 낮게 나타났다. 본실험에 쓰인 36주의 MSSA 중에서 48, 124 또는 129번 균과 같이 항균제감수성검사에서 Mt 농도가 증가할수록 생존균수도 많아지는 균주는 32주이며, 15, 102번 균주와 같이 Mt 농도 및 배양기간에 관계없이 생존균수가 현저히 감소하는 균주, 즉 MIC와 MBC가 비슷하게 나타나는 균주는 모두 4주였다(표 1).

공시한 각균들의 내약성 정도를 파악하기 위하여 NHBH, SPC를 이용한 항균제감수성검사를 실시한 후, 배양 6, 24, 48시간 때 생균수를 측정하고 각각의 균생존율을 구하여 그 대표적인 결과를 time killing curve와 표로 나타내었다(표 3, 4, 그림 2-4). 황색포도상구균 124번에 대한 Mt의 효과를 본바(표 3, 그림 2), Mt의 MIC는 배양 24, 48, 72시간 때 각각 2, 4, $4 \mu\text{g/ml}$ 였다. 이 균의 생존균수는 Mt 농도와 배양시간에 따라 큰 차이를 보였는 바, 배양 24시간 때에 512, 256, 128 및 $64 \mu\text{g/ml}$ 농도의 Mt하에서의 생존균수는 각각 2.3×10^4 , 1.2×10^4 , 9.0×10^3 및 1.5×10^3 CFU/ml로 매우 많았으나 32, 16, 8 및 $4 \mu\text{g/ml}$ 농노하에서는 모두 1.0×10^2 CFU/ml 이하로 생존균수가 적었다. 배양 48시간 후의 생균수는 Mt 농도에 관계없이 모두

—박종옥·전도기·하대유: 황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상—

1.0×10^2 CFU/ml 이하로 저하되었다. 나머지 31주의 MSSA도 이와 유사한 양상을 보였으며, 124번 균주는 Ox에 대해서는 이와같이 MIC는 낮으나 Ox 농도가 높을수록 생존균수가 많아지는 양상을 보였다(표 생략). 황색포도상구균 102번을 대상으로 동일한 실험을 하였는 바(그림 3), 이균에 대한 Mt의 MIC는 배양시간에 관계없이 모두 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, 생존균수도 Mt 농도 및 배양시간에 관계없이 저하되며 감소하여 배양 24시간 이후에는 모두 1.0×10^2 CFU/ml 이하로 나타났다. MRSA를 대상으로 액체배지희석법을 이용한 항균

제감수성 및 균생존율검사를 실시한 바 표 4, 그림 4에서 보는 바와 같이 81번의 균의 MIC는 배양 24, 48, 72시간 때에 각각 16 , 32 , $64 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 배양시간이 지남에 따라 MIC는 점차 증가하였고, 생존균수는 MIC이상의 Mt농도하에서 모두 1×10^3 CFU/ml 이하로 나타났으며, 나머지 3주의 MRSA도 이와 유사한 양상을 보였다.

MSSA 중 124번 균과 같이 고농도의 Mt하에서 생존한 균들이 Mt에 대해서 내성을 가지고 있는가를 보기 위하여, TSA와 TSA에 각균에 대한 MIC량의 Mt를 첨가한 배지(Mt-TSA)를 균생존검사

Table 3. Bactericidal activity of methicillin on *Staphylococcus aureus* (strain no. 124)^a

Conc. of Mt in MHBY ^b ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of colony-formers/ml (% survival) at incubation (hr) of		
	6	24	48
512	4.3×10^5 (35.8)	2.3×10^4 (2.76)	3×10 (0.003)
256	4.0×10^5 (33.3)	1.2×10^4 (1.0)	1×10 (<0.001)
128	3.4×10^5 (28.3)	9.0×10^3 (0.75)	1×10 (<0.001)
64	1.1×10^5 (9.2)	1.5×10^3 (0.125)	<10(<0.001)
32	9.6×10^4 (8.0)	4×10 (0.003)	<10(<0.001)
16	3.0×10^3 (0.25)	2×10 (0.002)	<10(<0.001)
8	1.0×10^3 (0.083)	<10(<0.001)	<10(<0.001)
4	5×10^2 (0.042)	<10(<0.001)	<10(<0.001)
2	1.5×10^4 (1.25)	2.4×10^6 (200)	9.0×10^7 (7500)

^a Inoculum size of organism tested was 1.2×10^6 CFU/ml.

^b MHBY ; Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract.

Table 4. Bactericidal activity of methicillin on *Staphylococcus aureus* (strain no. 81)^a

Conc. of Mt in MHBY ^b ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of colony-formers/ml (% survival) at incubation (hr) of			
	6	24	48	72
512	1.2×10^4 (4.0)	1.4×10^2 (0.047)	1.5×10 (0.005)	<10(<0.003)
256	1.2×10^4 (4.0)	3.9×10^2 (0.13)	1×10 (0.003)	1×10 (0.003)
128	1.0×10^4 (3.3)	1.8×10^2 (0.06)	5×10 (0.016)	<10(<0.003)
64	1.4×10^4 (4.7)	1.4×10^2 (0.047)	2.0×10^2 (0.07)	8×10 (<0.027)
32	9.3×10^3 (3.1)	2.3×10^4 (7.7)	1×10^7 (3333)	5.7×10^7 (> 10^5)
16	1.2×10^4 (4.0)	5.2×10^5 (172)	5×10^8 (> 10^5)	1.0×10^5 (> 10^5)
8	2.1×10^4 (7.0)	2.2×10^7 (7333)	2×10^8 (> 10^5)	

^a Inoculum size of organism tested was 3.0×10^5 CFU/ml.

^b MHBY ; Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract.

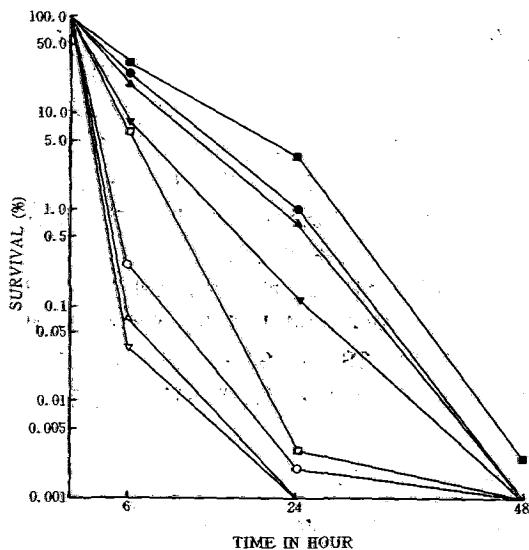


Fig. 2. Killing curve of *S. aureus* (strain no. 124; MIC of Mt. $2\mu\text{g}/\text{ml}$) at various concentrations of Mt in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract. Symbols ; 512(■), 256(●), 128(▲), 64(▼), 32(□), 16(○), 8(△), and 4(▽) $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Mt.

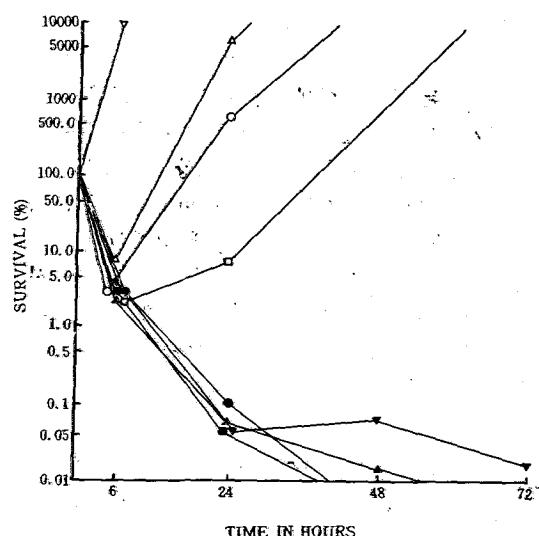


Fig. 4. Killing curve of *S. aureus* (strain no. 81; MIC of Mt. $8\mu\text{g}/\text{ml}$) at various concentrations of Mt in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3 % yeast extract. Symbols ; 512(■), 256(●), 128(▲), 64(▼), 32(□), 16(○), 8(△) $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Mt and control(▽).

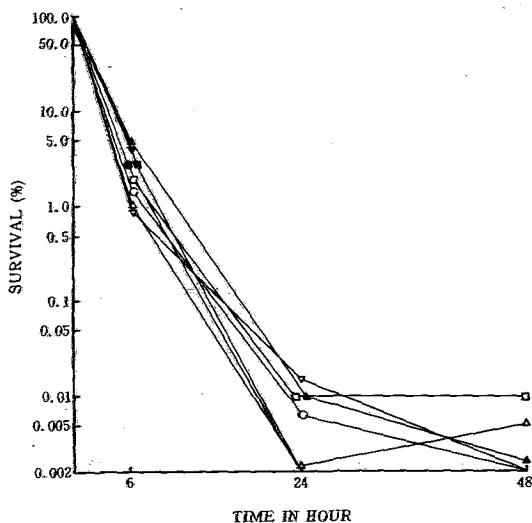


Fig. 3. Killing curve of *S. aureus* (strain no. 102; MIC of Mt. $2\mu\text{g}/\text{ml}$) at various concentrations of Mt in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract. Symbols ; 512(■), 256(●), 128(▲), 64(▼), 32(□), 16(○), 8(△), and 4(▽) $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Mt.

용 배지로 사용하여 생균수를 검사하였다(표 5). 항균제감수성검사에서 Mt 농도가 높은 곳일수록 TSA에서 접락을 형성하는 균수가 많으나, Mt-TSA에서는 Mt 농도에 관계없이 접락형성균이 모두 $1.0 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{ml}$ 미만으로 생존균이 극히 적게 검출되었다. 이결과는 항균제감수성검사에서 접종균중 일부가 배양 24시간 때 죽지않고 살아남으나, 이들의 Mt에 대한 감수성은 모세포와 동일함을 의미한다.

액체배지회석법에 의한 항균제 감수성 및 균생존율을 검사함에 있어서 접종균의 발육상이 균의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 256, 128, 8 또는 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 Mt이 함유된 MHBY 배지에 대수증식기의 배양균(LPC)을 접종하고 24시간 배양한 후 생존균수를 측정하였으며, 그성격을 정균기의 배양균(SPC)을 대상으로 동일하게 실험한 결과와 비교하였다(표 6). 저농도의 Mt($8, 4\mu\text{g}/\text{ml}$)하에서는 어느 발육상을 사용하였던 간에 공시균 20주 모두 균생존율이 0.1% 미만이었다. 그러나 고농도의 Mt($256\mu\text{g}/\text{ml}$)하에서는 SPC를 사용한 경우 20주 중 2주가 10% 이상의 균생존율을 보

—박종옥·전도기·하대유:황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상—

였으며, 17주가 9-0.1% 사이의 균생존율을 보였으나, LPC를 사용한 경우 공시균주 모두 균생존율이 0.1% 미만으로 나타나, SPC를 대상으로 실험에서 볼 때 있었던 황색포도상구균의 내약성이 LPC

를 대상으로 실험할 때는 사라짐을 알 수 있다.

Mt의 MSSA에 대한 살균능이 공시배지에 따라 어떻게 영향을 받는가를 관찰하기 위하여, NB, NB-NaCl, MHB, MHBY, CSMH 배지에 Mt를 512

Table 5. Selection of survivors in TSA and TSA containing 1 MIC of methicillin for the detection of their resistance to methicillin

Conc. of Mt in MHBY ^a (μ g/ml)	No. of colony-formers (% survival) ^b of strain no. 48 ^c in:		No. of colony-formers (% survival) of strain no. 100 ^c in:	
	TSA	Mt-TSA ^d	TSA	Mt-TSA
512	7.3×10^3 (1.33)	$<10^2$ (<0.02)	7.0×10^3 (0.7)	$<10^2$ (<0.01)
256	5.7×10^3 (1.0)	$<10^2$ (<0.02)	1.2×10^4 (1.2)	$<10^2$ (<0.01)
128	2.4×10^3 (0.44)	$<10^2$ (<0.02)	2.0×10^4 (2.0)	$<10^2$ (<0.01)
64	7.4×10^2 (0.13)	$<10^2$ (<0.02)	1.0×10^2 (1.0)	$<10^2$ (<0.01)
32	3.7×10^2 (0.067)	$<10^2$ (<0.02)	<10 (<0.01)	$<10^2$ (<0.01)
16	1.1×10^2 (0.02)	$<10^2$ (<0.02)	<10 (<0.01)	$<10^2$ (<0.01)
8	4.0×10 (<0.02)	$<10^2$ (<0.02)	<10 (<0.01)	$<10^2$ (<0.01)
4	1.2×10^2 (0.02)	$<10^2$ (<0.02)	<10 (<0.01)	$<10^2$ (<0.01)
2	$>10^6$ (>182)	$<10^2$ (<0.02)	$>10^6$ (>100)	$<10^2$ (<0.01)

^a MHBY ; Mueller-Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract.

^b CFU/ml (%)

^c Inoculum sizes of strain 48, 100 were 5.5×10^5 , 1.0×10^6 CFU/ml respectively.

^d Recovery media which containing 1 MIC of Mt to each strains.

Table 6. Effect of bacterial growth phase on the susceptibility of 20 strains of *Staphylococcus aureus* to methicillin

Conc of Mt in MHBY ^a (μ g/ml)	Growth phase ^b	Range of % survival				
		>10	9-1	0.9-0.1	0.09-0.01	<0.01
256	SPC	2 ^c	10	7	0	1
	LPC	0	0	0	0	20
128	SPC	0	7	11	1	1
	LPC	0	0	0	0	20
8	SPC	0	0	0	9	11
	LPC	0	0	0	1	19
4	SPC	0	0	0	7	13
	LPC	0	0	0	0	20

^a MHBY ; Mueller Hinton broth supplemented with 0.3% yeast extract.

^b SPC, stationary-phase culture ; LPC, log-phase culture.

^c No. of strains.

Table 7. Effect of media on the killing activity of methicillin to *Staphylococcus aureus* (strain no. 124)

Media ^a	Incuba- tion time (hr)	Percent survival at the various concentrations of Mt ($\mu\text{g/ml}$) :								
		512	256	128	64	32	16	8	4	2
NB	24	<0.001	<0.001	0.006	0.001	0.008	0.001	0.001	<0.001	<0.001
NB-NaCl	24	1.63	1.25	0.49	0.23	0.081	0.016	0.009	0.005	0.004
	48	0.004	0.013	0.001	0.003	0.004	0.001	<0.001	0.001	<0.001
MHB	24	3.38	1.63	0.16	0.038	0.02	<0.001	<0.001	0.001	>125
	48	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
MHEY	24	0.58	0.26	0.113	0.013	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>125
	48	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CSMH	24	10.12	8.25	2.5	0.19	0.001	<0.001	<0.001	0.048	>125
	48	1.5	1.18	0.19	<0.001	<0.001	0.013	<0.001	<0.001	<0.001
	72	0.21	0.113	0.028	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a NB, nutrient broth ; NB-NaCl, NB with 2% NaCl ; MHB, Mueller-Hinton broth ; MHEY, MHB with 0.3% yeast extract ; CSMH (cation-supplemented MHB), MHB with Ca (50mg/l), Mg (25mg/l), and NaCl (2%).

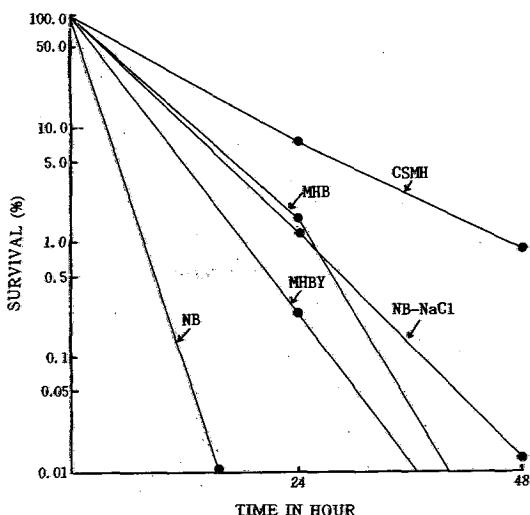


Fig. 5. Killing curve of *S. aureus* (strain no. 124) in the presence of $256 \mu\text{g/ml}$ of Mt in media of various compositions. NB, nutrient broth ; NB-NaCl, NB with 2% NaCl ; MHB, Mueller-Hinton broth ; MHEY with 0.3% yeast extract ; CSMH(cation-supplemented MHB), MHB with Ca(50mg/ l), Mg(25mg/ l), and NaCl(2%).

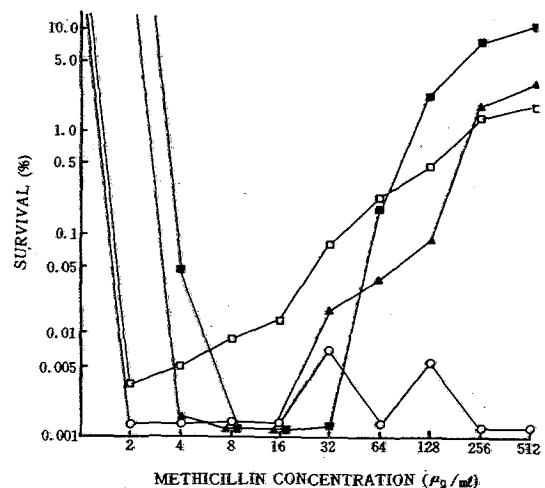


Fig. 6. Survival rates of *S. aureus* (strain no. 124) in the presence of various concentrations of Mt in media at 24 hr of incubation. Symbols ; NB (○), NB-NaCl(□), MHB(▲), and CSMH(■).

-박종욱·전도기·하대유: 황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상-

$-2\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석시키고 황색포도상구균 124 (SPC)를 접종하여 시간별 균생존율을 구하였다 (표 7, 그림 5,6). 저농도의 Mt ($32-2\mu\text{g/ml}$) 하에서는 공시배지 종류와 배양시간에 관계없이 균생존율이 모두 0.1% 미만으로 나타났다. 그러나 고농도의 Mt ($512-64\mu\text{g/ml}$) 하에서는 공시배지와 배양시간에 따라 균생존율 차가 매우 심하였다는 바, CSMH, MHB, MHBY 및 NB-NaCl을 사용한 경우

배양 24시간 때 균생존율이 거의 모두가 0.1%를 넘었으며, 이중 생존균수가 가장 많이 나타난 것은 CSMH 배지를 사용하였을 때로 배양 24시간 때 512, 256, 128, $64\mu\text{g/ml}$ 의 Mt 농도하에서 균생존율이 각각 10.12, 8.25, 2.5, 0.19%였으며, 배양 48, 72시간 때도 상당히 높은 균생존율을 나타내었다. NB를 사용한 경우는 특이하게 배양 24시간 이내에 모든 Mt 농도하에서 균생존율이 0.1% 미만으

Table 8. Effects of supplements of media on the susceptibility of *Staphylococcus aureus* (strain no. 100) to methicillin

MHB supplemented with	Conc. of Mt in media ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colony-formers when tested with ^a :	
		LPC ^b	SPC ^b
Yeast extract (0.3%)	128	1.0×10^2	1.3×10^4
	8	<10	6.0×10
Calcium ion (50mg/ℓ)	128	6.8×10^2	5.9×10^4
	8	4.0×10	<10
Magnesium ion (25mg/ℓ)	128	5.0×10^2	3.6×10^4
	8	<10	2.2×10^2
NaCl(2%)	128	3.2×10^4	1.7×10^5
	8	1.0×10	6.0×10

^a CFU/ml.

^b Inoculum sizes of LPC and SPC were 9×10^5 , 1.3×10^6 CFU/ml, respectively.

Table 9. Effects of sodium deoxycholate on susceptibility of *S. aureus* (strain no. 100)^a to Mt in MHBY and CSMH media

Conc. of Mt in media ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colony-formers when tested in ^b :			
	MHBY	MHBY-SD ^c	CSMH	CSMH-SD ^c
512	7.0×10^3	<10	1.2×10^5	1.1×10^5
256	1.2×10^4	<10	7.2×10^4	7.4×10^4
128	2.0×10^4	<10	2.9×10^4	7.2×10^4
64	1.0×10^2	3×10	4.2×10^3	1.2×10^4
32	<10	2×10	6×10	1.1×10^2
16	<10	<10	1×10	1×10
8	<10	<10	1×10	2×10
4	2×10	<10	$>10^6$	$>10^6$

^a Inoculum size of organism was 1.8×10^6 CFU/ml.

^b CFU/ml.

^c MHBY or CSMH media with 1/2-1/4 MIC of sodium deoxycholate.

로 나타나 NB에서는 황색포도상구균의 생존이 연장되는 현상을 볼 수 없었다. 그러나 NB에 NaCl를 첨가한 경우 (NB-NaCl)에서는 CSMH, MHBY, MHB를 사용했을 때와 마찬가지로 다시 균생존율이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. Mt에 내약성을 가지고 있는 48번 및 100번 균주를 대상으로 동일한 실험을 한 바 이와 유사한 결과를 볼 수 있었다(표 생략).

CSMH 배지에서 균생존율을 현저히 증가시키는 요소가 무엇인가를 알아보기 위하여, 황색포도상구균 100번을 대상으로 MHB에 Ca, Mg 또는 NaCl을 각각 단독으로 첨가하여 두농도의 Mt (128, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 하에서의 생존균수를 측정하였다(표 8). 같은 배지에서는 표 6의 결과와 마찬가지로 접종균의 발육상이 LPC 일때 보다 SPC 일때 생존균수가 훨씬 많음을 확인하였다. MHB에 여려성분을 각각 첨가하고 SPC를 접종하여 실험한 결과, MHB에 NaCl을 넣었을 때의 생존균수가 가장 높게 나타났으며, MHBY 또는 MHB에 Ca 또는 Mg을 첨가한 경우에 비해 생존균수가 각각 12.7, 2.8, 4.3배나 높았다. LPC를 MHB에 NaCl을 첨가한 배지에 접종하여 생존균수를 측정한 결과에서도 역시 NaCl을 첨가한 경우의 검출생균수 (3.2×10^4 CFU/ml)가 첨가치 않은 경우에 비해 약 320–64 배나 높았으며 이때의 균생존율도 2.4%로 MBC 기준치 (0.1%)보다 훨씬 높았다. 그러므로 CSMH 배지에서 생존균을 가장 증가시키는 요인은 NaCl임을 알 수 있으며, NaCl로 말미암아 대수증식기의 배양균도 약제에 의해 살균되는 속도가 지연되고 생존균수가 증가하는 현상이 일어남을 알 수 있다. 또 표 9에서 SD를 MHBY 배지에 첨가할 때, 이를 절은 Mt의 살균작용을 도와 일관적으로 높았던 고농도의 Mt (512–64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 하에서의 생존수를 현저히 감소시켰다. 그러나 SD를 CSMH 배지에 첨가시켰을 경우 (CSMH-SD)에는 다시 생존균수가 많이 나타남으로 SD의 효과도 NaCl이 든 배지에서는 차단됨을 알 수 있었다.

고 안

황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성은 이 균의 Mt 내성을의 증가와 더불어 이 균에 의한 감염증의 치료를 어렵게 만드는 중요한

요소이다. 그러나 이러한 내약성의 임상적 중요성에도 불구하고 내약성 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 또 약제의 MBC를 측정하는 실험과정에 여러가지 기술적인 문제점이 있기 때문에 황색포도상구균의 각종 beta-lactam계 항균제내약성에 대한 실험실 보고는 연구자마다 많은 차이가 있어 온갖 사실이다. 따라서 약제의 살균능 또는 균의 내약성 표현에 영향을 미치는 여러 요소들을 규명하여 내약성 검사방법을 표준화 또는 규격화 하며, 실험실에서는 물론 임상적으로도 의미가 있는 내약성 기준을 정하여, 황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성 실태를 파악하고 그 대책을 세우는 일이 매우 중요한 일이라 생각된다.

본실험에서는 항균제감수성검사 및 균생존율을 검사하는 방법은 Taylor 등 (1983)의 방법을 응용하여, 접종균액의 splashing effect를 제거하기 위해 균-항균제 혼합액을 다시 멀균된 새 시험판 하부에 분주하였으며, 배양 20시간 및 24시간 때 시험판 내용물을 전탕하였고, 균-항균제 혼합액을 회석하여 이식배양 함으로써 잔여항균제 효과를 줄였으며, 생존균검출을 높이기 위해 접종한 균생존검사용 배지를 48시간 이상 배양하여 실험한 결과, 표 1에서와 같이 36주의 MSSA 중 32 (89%)주가 고농도의 Mt (256 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 하에서 높은 균생존율을 보였다. 그러나 이러한 내약성은 배양시간이 48시간 이상으로 길어짐에 따라 소실되었으며 (표 2, 3, 그림 1, 2), 배양 24시간 때 Mt에 의해 죽지 않고 살아 남은 균들도 Mt에 대한 감수성은 보세포와 동일함을 보였다. 황색포도상구균의 Mt 내약성에 대한 다른 연구가들의 보고를 보면, Shanholtzer 등 (1984)은 임상분리균 66주 중 46주에서 Mt의 MBC/MIC비가 8:1 이상을 보인다고 보고하였으며, Pelletier (1984)와 Goessens 등 (1982)은 각각 임상분리균 101주와 15주 중 41(41%)주와 14(93%)주에서 Mt의 MBC/MIC 비가 32이상이었다고 보고하였으며, Goessens 등 (1984)은 Mt에 대한 내약성백분율이 0.1% 이상으로 나타난 균은 전체 공사균의 72%이며 2.0% 이상 아주 높게 나타난 균은 12.5%라고 보고하였다. 본실험의 결과를 포함하여, 황색포도상구균의 Mt내약성에 대한 보고가 이렇게 실험실 간에 차이가 큰 것은 각연구자마다 사용한 방법에 다소의 차이가 있으며, 또 내약성 기

준도 서로 달랐기 때문으로 사료되며, 이상의 보고들과 유사하게 황색포도상구균의 다른 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성 보고들에서도 내약성 균 빈도가 44~100%까지 다양하게 나타나고 있음을 볼 수 있다 (Mayhall et al., 1976; Sabath et al., 1977; Bradly et al., 1978 & 1979). 배양기간에 따른 균의 내약성 변화와 내약성균의 항균제 감수성을 모세포와 비교한 보고들을 보면, Mayhall 등 (1976)과 Ishida 등 (1982)은 배양 48시간 때 황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성이 사라진다고 보고하였으며, Mayhall 등 (1976)은 이식배양에서 나타난 균들도 모세포와 동일한 항균제감수성을 가지고 있다고 보고하여 본실험의 결과와 일치함을 보였다.

본실험에서 Mt에 내약성을 보이는 균과 보이지 않는 균들의 생존균수 및 균생존율을 비교해본 결과 (표 2, 그림 1), Goessens 등 (1984)의 결과와 동일하게 저농도의 Mt ($8\mu\text{g}/\text{ml}$) 하에서는 두 균의 생존균수 차가 크지 않으나, 고농도의 Mt ($128\mu\text{g}/\text{ml}$) 하에서는 배양 24시간 때 내약성균의 생존균수가 훨씬 많이 나타남을 볼 수 있으며, 내약성을 보이는 균들은 표 2, 그림 3의 124번 균주와 같이 항균제감수성검사에서 Mt 농도가 높은 곳일수록 생존균수가 증가하는 양상을 보였다. 저자는 본실험에서 대개의 내약성 균들이 $64\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Mt 농도에서부터 균생존율이 0.1%를 넘어서고 있기 때문에 (표 3, 5, 7, 9) Mt의 MIC가 약 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나는 MSSA 중에서 Mt 내약성균과 비내약성균을 서로 구분할 수 있는 Mt의 최소농도는 $64\mu\text{g}/\text{ml}$ 라고 사료된다. 본실험에서 보인 beta-lactam계 항균제의 농도가 높아질수록 생존균이 많아지는 현상에 대하여, Giesbrecht 등 (1983)은 저농도의 P_c는 포도상구균의 cross wall 합성만 억제시켜 세포가 분리될 때 용해가 일어나나 고농도의 P_c는 세포벽 합성을 물론 세포분리 까지 억제시키기 때문에 오히려 세포용해가 적게 일어난다고 보고한 바 있다.

황색포도상구균의 내약성 표현에 영향을 미치는 요소는 여러 가지가 있으나 본연구자는 공시균의 발육상태 및 발육환경이 이균의 내약성 표현에 가장 큰 영향을 미치며 내약성 기전을 밝히는데 중요한 요소로 생각되어, 대수증식기 배양균 (LPC) 및 정균기 배양균 (SPC)과 NB, NB-NaCl, MHB,

MHBY, MHBY-SD, CSMH, CSMH-SD 등의 배지를 사용하여 내약성균들을 대상으로 항균제감수성 검사 및 균생존율검사를 실시하였다. 황색포도상구균의 내약성 표현에 가장 큰 영향을 미치는 것은 접종균의 발육상으로 알려져 있는 바, 이에 대한 보고들을 보면, Mayhall 등 (1980)은 SPC를 대상으로 실험한 경우 임상분리균 47주 중 23 (57.5%) 주가 Ox에 내약성을 보였으나 이들 중 9주를 골라 대수증식시킨 후 실험에 사용한 결과 내약성을 보인 균주가 한주도 없었다고 보고하였고, Kim 등 (1981) 및 Ishida 등 (1982)도 LPC를 대상으로 실험하면 내약성이 사라진다고 보고하였다. 그러나 Goessens 등 (1982)은 이와 반대로 접종균의 발육상은 균의 내약성 표현에 아무 영향을 미치지 않는다고 보고하였으며 Sabath 등 (1977)과 Raynor 등 (1979)도 이와 유사한 보고를 하였다. 본실험에서는 (표 6) SPC를 대상으로 실험하여 내약성이 나타난 황색포도상구균 19주를 대수증식 시킨 후 Mt에 대한 내약성을 다시 검사한 결과, Mayhall 등 (1980)의 결과와 마찬가지로 공시균의 균생존율이 현저히 저하되었으며 내약성을 보인 균주는 한주도 나타나지 않았다. 최근에는 황색포도상구균의 항균제감수성 및 균생존율검사에서 LPC를 사용하고 시험관벽에 접종균이 오염되지 않게 주의하고, 배양기간 동안은 시험관을 흔들지 않으며, 접종균액에 잔여항균제 효과를 제거하기 위해 균생존 검사용 배지에 penicillinase 등을 사용하는 기술을 이용한 결과들을 볼 때, Sherris (1986)과 Mayhall 등 (1980)의 보고에서처럼 내약성은 주로 SPC를 사용했을 때 나타나는 현상이라고 받아 들여지고 있다.

발육환경이 황색포도상구균의 내약성 표현에 미치는 영향을 실험한 보고들을 보면, Kim 등 (1979)은 Todd-Hewitt broth나 MHB 보다 tryptose phosphate broth를 사용했을 때 약제의 MBC가 높아진다고 보고하였으며, Peterson 등²⁰도 MHB와 brain heart infusion broth를 사용하여 실험한 결과 대다수 실험균주 (87%)에 있어서 약제의 MBC가 사용배지에 따라서 크게 차이가 났다고 보고하고 (8배 이상), MBC 검사를 두배지에서 동시에 실시하여 MBC가 모두 낮게 나타나는 항균제를 선택하여 치료에 사용하여야 한다고 주장하였다. 본실험에서도 사용배지에 따라서 항균제의 살균능

이 현저히 변화함을 알수있었다. MHBY에 sub MIC량의 SD를 첨가한 배지 (MHBY-SD)나 NB를 사용했을 때는 공시균의 사멸이 배양 24시간 이내에 현격하였으나, NB-NaCl, MHB, MHBY, CSMH 및 CSMH-SD 배지를 사용했을 때는 Mt에 의한 공시균이 사멸이 지연되어 균의 내약성이 나타났으며, 특히 CSMH 배지를 사용했을 경우 배양 72시간 때까지 공시균의 사멸이 지연되는 현상을 보였다. 이러한 결과는 CSMH와 같이 황색포도상구균의 성장이 잘되는 배지 일수록 내약성이 잘 나타난다는 것을 의미한다. 또 본실험에서는 식염이 포도상구균의 내약성, 균의 생존을 연장시키는 가장 중요한 요소이며 (표 8), 균이 Mt에 의해 급속히 사멸되었던 NB 배지나 SD가 첨가된 배지에서도 식염이 균의 생존을 연장시켰음을 물론 (표 7,9) 내약성이 전혀 나타나지 않았던 대수증식기의 배양균의 생존마저도 연장시키는 효과를 보였다 (표 8). 본실험의 결과와 유사하게 Woods 등 (1987 & 1988)은 황색포도상구균에 대한 Ox의 MBC와 백색포도상구균에 대한 cefuroxime의 MBC가 식염에 의해 현저히 증가된다고 보고한 바 있다. 식염이 접종균의 생존을 증가시키는 이유는 식염이 배지 내에서 항균제의 활성을 저하시키거나 또는 세균의 세포벽이 항균제에 의해 결손되나 식염으로 인해 세포내압이 낮게 유지되어 세균이 일시적으로 생존해 있는 것 등으로 추측할 수 있으나 본결과만으로는 그 기전을 명확히 알수 없다. Bradley 등 (1978)은 내약성균에서 나타나는 생존균은 세포벽결손형이 아니라고 보고하였으나 이들의 실험에서는 식염을 사용하지 않았으며, Woods 등 (1988)은 식염이 약제의 MBC를 증가시키는 이유를 명확히 설명하지 못하여 추후 식염과 항균제 살균능과의 상관관계가 더 논의되어야 할것으로 사료된다. 이상의 결과에서 나타난 세균의 내약성 표현 또는 항균제의 살균능이 접종균의 밀육상 또는 공시배지에 따라서 현저히 변하는 현상은 임상적인 견지에서 볼때도 매우 중요한 의미가 있을것으로 생각된다. 대수증식기의 배양균을 공시하여 실험하면 공시균에 대한 약제의 MBC/MIC 비가 32이상으로 나타나는 경우가 거의 없으므로 실제로 LPC를 사용하면 다른 균들보다 사멸속도가 느린 균을 겸출해 낼수 없으며, 항균제감수성검사에 있어서 배지 선택이 적절치 않을 경우 실험실성적으로는 '약제

의 MBC가 낮으나 생체내에서는 혈청이나 조직액 성분 등으로 인해 약제의 MBC가 높아질 가능성이 있기 때문이다. 따라서 임상의들이 실험실 성적을 토대로 MBC가 낮은 약제를 선택하여 항균요법을 실시했으나 치료에 잘되지 않은 경우의 원인을 이러한 관점에서 다시 연구해볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. Hobby 등 (1987)은 P_c에 노출된 후 생존한 균들을 bacterial persister라고 하였으며, Bigger (1944)와 Gunnison 등 (1964)은 persisters는 대사가 불활성화 되어 있는 dormant state에서 세포분열이나 세포벽합성이 되지 않기 때문에 세포벽합성억제제에 노출되어도 생존한다고 보고하였다. 그러나 Bradley 등 (1978)은 내약성을 보이는 세포는 persisters가 아니며 세포벽결손형의 출현 때문에 아니라고 보고하였다. Holzhoffer 등 (1985)은 동조배양한 황색포도상구균을 대상으로 P_c의 MBC를 검사한 결과 휴지기 상태에 비해 오히려 세포가 분열할 때 MBC/MIC 비가 증가하였다고 보고하였으며, 이것은 세포분열주기 가운데 세포벽합성억제제에 내성을 보이는 기간 (cidal-resistant phase)이 있으며 이 기간이 긴 균일수록 내성을 잘 보일 것이라고 추측하였다. 본실험에서도 저자는 고농도의 Mt에 나타난 많은 생존균들이 Hobby 등 (1987)이 보고한 persister라고는 생각되지 않는는데, 그 이유는, persister 정의 9접종균의 99.9% 이상이 죽은 후 남은 균)에 비해 생존균수가 많으며, 공시항균제 농도가 높아짐에 따라 겸출균수가 많아지며, NB 보다는 MHB나 CSMH와 같이 균성장이 잘되는 배지를 사용할수록 생존균이 증가하기 때문이다. 또 NB에 NaCl을 첨가하거나 대수증식기 배양균을 NaCl이 든 배지에 접종하여 실험했을 때 겸출균수가 증가한 점을 보아 생존균이 운데 세포벽결손형이 포함되어 있을 것으로 생각되며, 대수증식기 보다 정균기 때 내약성이 잘 나타나는 것을 정균기 배양균내에 cidal-resistant phase의 세포들이 많이 존재하고 있기 때문인 것을 추측되나, 황색포도상구균의 beta-lactam계 항균제에 대한 내약성기전에 대해서는 추후 더 많은 연구가 필요할것으로 사료된다.

요 약

황색포도상구균의 methicillin (Mt)에 대한 감수성과 내약성 실태를 파악하고, 이 균의 Mt 내약성 표현에 영향을 미치는 요소들을 규명하기 위하여 액체배지회석법에 의한 항균제감수성검사 및 균생존율검사를 실시하여 그 결과를 보고하는 바이다.

1. 정균기배양균 (stationary-phase culture, SPC)을 0.3% yeast extract를 첨가한 Mueller-Hinton broth (MHB) 배지 (MHBY)에 접종하여 실험한 결과, 40주 중 Mt에 감수성인 균 (Mt-susceptible *S. aureus*, MSSA)은 36주 였고 이중 32주에서 Mt 내약성이 나타났으며, Mt 내성균은 4주로 이들에서는 내약성이 나타나지 않았다.
2. 배양 24시간 때의 내약성균들의 균생존율은 Mt 농도가 높아질수록 증가하는 양상을 보였으나 생존균들은 모두 모세포와 같이 Mt에 감수성이었으며, 배양 48시간 이후에는 균생존율이 현저히 저하되어 이러한 내약성이 나타나지 않았다.
3. 균의 내약성 표현 정도는 균의 발육상 및 사용 배지에 따라 다양하게 변화함을 알 수 있었다. 정균기 배양균은 nutrient broth (NB)나 sodium deoxycholate를 첨가한 MHBY 배지에서는 내약성이 나타나지 않았으나, MHB, MHBY, 식염 (2%)을 첨가한 NB배지, 또는 cation (Ca, 50mg/l; Mg, 25mg/l)과 NaCl (2%)를 첨가한 MHB 배지 (CSMH)에서는 내약성이 나타났으며 이중 CSMH를 사용한 경우에 균의 내약성표현이 가장 현저하였다.
4. 대수증식기 배양균은 CSMH배지에서만 내약성이 나타났으며 이 배지 성분 중 균의 생존율을 연장시키는 주요소는 식염이었다.

References

- 박종욱, 전도기: Methicillin 내성포도구균에 미치는 항균제병용효과. 계명의대논문집 5:168, 1986.
Ampel, N.M., Keating, M.H., Moon-McDermott, L., Peter, G., and Zinner, S.H.: Comparison of tube dilution and microtitre methods for the detection of

- antibiotic tolerance in strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 13:414, 1984.
Bigger, J.W.: The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus aureus*. *Irish J. Med. Sci.* 6:553, 1944.
Bradley, J.J., Mayhall, C.G., and Dalton, H.P.: Incidence and characteristics of antibiotic-tolerant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:1052, 1978.
Bradley, H.E., Weldy, P.L., and Hodes, D.S.: Tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i:150, 1979.
Denny, A.E., Peterson, L.R., Gerding, D.N., and Hall, W.H.: Serious staphylococcal infections with strains tolerant to bactericidal antibiotics. *Arch. Intern. Med.* 139:1026, 1979.
Eagle, H., and Musselman, A.D.: The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J. Exp. Med.* 88:99, 1948.
Garrod, L.P.: The action of penicillin on bacteria. *Br. Med. J.* 1:107, 1945.
Giesbrecht, P., Morioka, H., Krueger, D., Kersten, T., and Wecke, J.: Restoration of penicillin-damaged cell walls by de novo murein-synthesis and successive degradation in staphylococci, revealing a hitherto unknown mechanism of penicillin action. In blockage of autolytic wall processes by penicillin (Hakenbeck, R., Holte, T.V., and Labischinski, H. ed), Walter de Gruyter & Co., Berlin, p. 243, 1983.
Goessens, W.H.F., Fontijne, P., and Michel, M.F.: Factors influencing detection of tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:364, 1982.
Goessens, W.H.F., Fontijne, P., and Michel, M.F.: Response of tolerant and nontolerant *Staphylococcus aureus* to methicillin in an experimental infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:829, 1984.
Goessens, W.H.F., Fontijne, P., van Raffe, M., and Michel, M.F.: Tolerance percentage as a criterion for the detection of tolerant *Staphylococcus aureus*.

- Antimicrob. Agents Chemother.* 25:575, 1984.
- Goldman, P.L., and Petersdorf, R.G. : Significance of methicillin tolerance in experimental staphylococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:802, 1979.
- Gunnison, T.B., Fraher, M.A., and Jawetz, E. : Persistence of *Staphylococcus aureus* in penicillin in vitro. *J. Gen. Microbiol.* 35:335, 1964.
- Hilty, M.D., Venglarcik, J.S., and Best, G.K. : Oxacillin-tolerant staphylococcal bacteremia in children. *J. Pediatr.* 96:1035, 1980.
- Hobby, G.L., Meyer, K., and Chaffee, E. : Observation on the mechanism of action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 50:281, 1987.
- Holzhoffer, S., Sussmuth, R., and Haag, R. : Oscillating tolerance in synchronized cultures of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:456, 1985.
- Ishida, K., Guze, P.A., Kalmanson, G.M., Albrandt, K., and Guze, L.B. : Variables in demonstrating methicillin tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:688, 1982.
- Kaye, D. : The clinical significance of tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* 93:924, 1980.
- Kim, K.S., and Anthony, B.F. : Importance of bacterial growth phase in determining minimum bactericidal concentration of penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:1075, 1981.
- Kim, K.S., and Anthony, B.F. : Use of penicillin gradient and replicate plate for the demonstration of tolerance to penicillin in streptococci. *J. Infect. Dis.* 148:488, 1983.
- Kim, K.S., Yoshimori, R.N., Imagawa, D.T., and Anthony, B.F. : Importance of medium in demonstrating penicillin tolerance by group B streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:214, 1979.
- Kloos, W.E., and Schleifer, K.H. : Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1:88, 1975.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. Jr., Janda, W.H., Sommers, H.M., and Win, W.C. (ed) : Gram positive cocci. In color atlas and text book of diagnostic microbiology. *J.B. Lippincott Co., Philadelphia, P311*, 1988.
- Mayhall, C.G., and Apollo, E. : Effect of storage and changes in bacterial growth phase and antibiotic concentrations on antimicrobial tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:784, 1980.
- Mayhall, C.G., Medoff, G., and Marr, J.J. : Variation in the susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* to oxacillin, cephalothin, and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:707, 1976.
- Norden, C.W., and Keleti, E. : Antibiotic tolerance in strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 7:599, 1981.
- Pelletier, Jr., L.L. : Lack of reproducibility of macrodilution MBCs for *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:815, 1984.
- Peterson, L.R., Gerding, D.N., Hall, W.H., and Schierl, E.A. : Medium dependent variation in bactericidal activity of antibiotics against susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:665, 1978.
- Raynor, R.H., Scott, D.F., and Best, G.K. : Oxacillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:134, 1979.
- Sabath, L.D., Wheeler, N., Laverdiere, M., Blazevic, D., and Wilkinson, B.J. : A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i:443, 1977.
- Shanholtzer, C.J., Peterson, L.R., Mohn, M.L., Moody, J.A., and Gerding, D.N. : MBCs for *Staphylococcus aureus* as determined by macro-dilution and microdilution techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:214, 1984.
- Sherris, J.C. : Problems in vitro determination of antibiotic tolerance in clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:633, 1986.
- Taylor, P.C., Schoeknecht, F.D., Sherris, J.C., and Linner, E.C. : Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and significance of technical factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:142, 1983.

- 박종옥 · 전도기 · 하대우 : 황색포도상구균의 Methicillin에 대한 Tolerance 현상 -

- Thornsberry, C., Anhalt, J., Barry, A.L., Gerlac, E. H., Hossom, J., Jones, R.N., Matsen, J.M., Moellering, R.C., and Norton, R. (ed) : *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, P36, 1983.
- Yomasz, A., Albino, A., and Zanati, E. : *Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system*. *Nature (London)* 227:138, 1970.
- Tuomanen, E., Durack, D.T., and Tomasz, A. : *Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:521, 1986.
- Venglarcik, J.S. III, Blair, L.L., and Dunkel, L.M. : *pH-dependent oxacillin tolerance of Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:32, 1983.
- Watananakorn, C., Tan, J.S., and Phair, J.P. : *Some salient feature of Staphylococcus aureus endocarditis*. *Am. J. Med.* 54:473, 1973.
- Woods G.L., Knapp, C.C., and Washington II, J. A. : *Relationship between cefamandole and cefuroxime activity against oxacillin-resistant Staphylococcus epidermidis and oxacillin resistance phenotype*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1332, 1987.
- Woods, G.L., and Yam, P. : *Bactericidal activity of oxacillin against beta-lactamase hyperproducing Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1614, 1988.
- Woolfrey, B.F., Lally, R.T., and Ederer, M.N. : *Evaluation of oxacillin tolerance in Staphylococcus aureus by a novel method*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:381, 1985.