

젖소 유방염에서 분리된 메티실린 내성 황색포도상구균에 대한 항생제와 Sulbactam 병합의 항균효과

유종현 · 한홍율* · 박희명¹

건국대학교 수의과대학

*서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2008년 6월 23일)

Susceptibilities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Milk of Bovine Mastitis to Antibiotics Combined with Sulbactam

Jong-Hyun Yoo, Hong-Ryul Han* and Hee-Myung Park¹

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract : Various kinds of antibiotic intramammary infusions are used for treatment of bovine mastitis. As antibiotic-resistant bacteria are increased, the therapeutic rate for bovine mastitis is decreased. The goal of this research is to detect significant synergic effects of combination of antibiotics with sulbactam, β -lactamase inhibitor, on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). We used 5 strains of MRSA isolated from bovine mastitis with clinical and subclinical signs. All of the bacteria isolated had resistance to oxacillin and showed multi-resistant patterns in the antimicrobial susceptibility tests. Minimal bactericidal concentrations of ampicillin, amoxicillin, cephalexin, ampicillin/sulbactam(2 : 1), amoxicillin/sulbactam (2 : 1), and cephalexin/sulbactam (1 : 1) were measured according to broth microdilution method suggested by National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M31-A2) to compare the synergic effects of sulbactam combination with each antibiotic alone. Ampicillin and amoxicillin showed synergic antibacterial activity to 4 and 3 respectively in 5 strains of MRSA in combination with sulbactam. This study demonstrates that ampicillin/sulbactam and amoxicillin/sulbactam can be therapeutic choices for mastitis associated with MRSA.

Key words : bovine mastitis, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), sulbactam.

서 론

젖소 유방염은 낙농업에서 가장 경제적인 손실이 큰 질병 중에 하나이다. 비유기 및 건유기에 항생제의 사용은 유방염은 근절시킬 수 있는 필수적인 치료 방법이며, 국내에서도 이미 수십 종류의 항생제들이 유방염 제품으로 유통되어 시장에서 소비되고 있다. 그러나 젖소에서 항생제의 사용은 우균에 발생 또는 상존하는 세균의 항생제 내성을 높일 뿐만 아니라, 시판 중인 유제품에 항생제 잔류문제를 야기하여 국민들의 식탁까지 위협하고 있다(20,25). 최근 우리나라에서 메티실린(methicillin)에 내성을 보이는 황색포도상구균이 사람(15)뿐만 아니라, 개(24), 닭(16), 젖소의 유방염(21)에서

분리되었다. 일반적으로 메티실린은 페니실린 내성을 초래하는 베타락타마제에 분해되지 않으므로 베타락탐계 항생제에 내성을 보이는 세균을 사멸시킬 수 있지만, 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 경우 항균제에 친화성이 낮은 페니실린 결합 단백질을 인코딩하는 *mecA* 유전자를 보유하고 있어 대다수의 항생제에 치료반응을 보이지 않는다(9). Sulbactam은 합성 베타락탐으로서 베타락타마제를 억제하고(32) 페니실린계열 항생제와 조합할 때 항생제 내성을 극복하여 항균작용을 발휘하며, 페니실린결합단백질-2와 결합함으로써 내재적 항균작용을 나타낸다(23). 또한 sulbactam은 다량의 항생제 사용에 의하여 형성된 베타락타마제에 의한 획득 내성을 보이는 균주들에 대하여 효과를 나타낼 수 있으며(10,18), 아직 기전이 밝혀지지는 않았으나 MRSA에 효과를 나타낸 경우도 보고되었다(13).

¹Corresponding author.
E-mail : parkhee@konkuk.ac.kr

따라서 항생제 내성이 강한 유방염 원인균에 대하여 sulbactam과 항생제의 합제를 적용할 경우 내성을 극복할 가능성이 있으리라 예상되지만, 현재까지 이에 관한 연구 결과는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 국내 목장에서 분리된 메티실린 내성의 유방염의 대표적인 병원체인 황색포도상구균에 대하여 ampicillin, amoxicillin, cephalexin의 단독 사용과 이들 항생제와 sulbactam 조합의 효력을 액체배지 미량희석법을 이용하여 비교 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 황색포도상구균은 1998년과 2003년 사이 경기도 및 충청도, 강원도의 목장에서 임상적 또는 준임상적 유방염에 이환된 젖소의 유즙에서 분리된 균주이다. 이 균주들은 National Mastitis Council (NMC)에서 제시한 표준동정방법(22)에 따라 동정되었고, 항생제 감수성 검사에서 oxacillin(옥사실린)에 대한 저항성 및 다재내성을 보이는 균주만을 선별하였다. 선별된 균주들은 시험에 사용될 때까지 10% glycerol이 함유된 trypticase soy broth (Becton, Dickinson and Company, USA)에 넣어 -70°C 로 냉동 보관하였고, 시험시 재배양하여 사용하였다.

디스크 확산법에 의한 항생제 감수성검사

각 유방염 세균에 대하여 항생제 감수성을 평가하기 위해 상용 항생제 디스크 (BBLTM, USA)를 이용하여 ampicillin (AM), kanamycin (K), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), cefoxitin (FOX), doxycycline (D), chloramphenicol (C), tylosin (TyL), lincomycin (L)에 대해 표준디스크 확산법(29)을 시행하였다. 메티실린 감수성 시험을 위하여 oxacillin (OX) 디스크를 사용하였다.

액체배지 미량희석법에 의한 항균제 감수성 시험

각 항생제 및 sulbactam 병합의 효능을 평가하기 위해 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 권장안에 따라 액체배지 미량희석법 (broth microdilution method)를 사용하여 최소살균농도 (minimal bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다(29). 본 시험에 사용된 항생제는 ampicillin, amoxicillin 및 cephalexin (동원신약)이며, 이들 항생제를 단독 또는 sulbactam (근화제약)과 병합하여 ampicillin/sulbactam (2:1), amoxicillin/sulbactam (2:1) 및 cephalexin/sulbactam (1:1)의 합제를 만들어 사용하였다. 각 항생제에 대하여 증류수로 512 mg/ml (w/v)의 희석을 만들고 이것을 2배씩 희석하여 512, 256, 128, 66, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 mg/ml (w/v) 단계별 희석액을 만들어 살균력을 시험하였다. MBC는 표준시험법에 의하여 각 희석배수의 항생제에 동량의 균주를 접종한 후, 37°C 24시간 배양한 후 0.01 ml를 채취하였고, 5% sheep blood agar plate에 접종

하여 24시간 배양 후, 집락이 생기지 않는 농도를 최소 농도로 정하였다.

결 과

디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 검사

시험에 사용된 황색포도상구균 5개 균주는 모두 oxacillin을 포함하여 ampicillin, kanamycin, doxycycline, chloramphenicol, tylosin 및 lincomycin에 저항성을 보였으며, 총 10개의 항생제 디스크 중 8개 이상에 대해 내성을 보이는 다재내성 균주임을 확인하였다(Table 1).

한천액체배지 미량희석법에 의한 항균제 감수성 시험

Ampicillin 단독제제에 비해 ampicillin/sulbactam (2:1) 병합이 5개 시험균주 중 4개의 균주에서 살균력의 상승을 나타내었다(Table 2). 또한, amoxicillin의 경우에는 5개 시험균주 중 3개의 균주에서 sulbactam 병합 (2:1)의 적용시 살균력이 상승되었다. 그러나 cephalexin의 경우, 모든 시험균주에 대해 단독사용과 sulbactam 병합 (1:1)의 살균력을 비교하였을 때 차이를 보이지 않았다(Table 2).

균주 4에 대하여 모든 항생제가 단독 사용과 sulbactam 합제의 사용시 살균력의 차이가 없었고, amoxicillin/sulbactam 조합은 amoxicillin 단독 사용에 비해 오히려 살균력이 감소하였다(Table 2).

고 찰

현재 낙농현장에서는 과도한 항생제의 사용으로 항생제 내성 세균의 출현이 증가하였고(3), 기존의 내성균으로 잘 알려진 황색포도상구균 뿐만 아니라 *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* 및 *Klebsiella* spp.와 *E. coli* 등의 세균에서도 내성율이 높아지고 있다(4,17). 최근에는 여러 항생제에 내성을 띠는 MRSA가 소에서 사람으로 직접 감염된다고 보고도 있어(12), 공중위생상의 중요한 문제로 부각되고 있다. 본 연구에 사용되었던 균주 들은 우리나라 중부지방의

Table 1. Antibiotic susceptibility pattern in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis

Strain no.	Antibiotic disk									
	AM*	K	CIP	SXT	FOX	D	C	TyL	L	Ox
1	R*	R	R	S	S	R	R	R	R	R
2	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
3	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R

*AM: Ampicillin, K: Kanamycin, CIP: Ciprofloxacin, SXT: Trimethoprim-sulfamethoxazole, FOX: Cefoxitin, D: Doxycycline, C: Chloramphenicol, TyL: Tylosin, L: Lincomycin, Ox: Oxacillin. *R: resistant, I: intermediate, S: susceptible.

Table 2. Comparative bactericidal activity of three antibiotics (ampicillin, amoxicillin, and cephalexin) and their combinations with sulbactam against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis

Strain no.	Minimal bactericidal concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	Ampicillin	Ampicillin/sulbactam	Amoxicillin	Amoxicillin/sulbactam	Cephalexin	Cephalexin/sulbactam
1	8	2*	16	2*	4	4
2	16	1*	32	1*	16	16
3	4	2*	2	2	4	4
4	0.5	0.5	< 0.25	2*	4	4
5	64	2*	> 256	2*	< 0.25	< 0.25

*Increased bactericidal activity with combination of sulbactam compared with single agent.

*Decreased bactericidal activity with combination of sulbactam compared with single agent.

임상 또는 준임상 젖소 유방염에서 분리한 병원균으로서, 메티실린 뿐만 아니라 광범위한 항생제에 대해 다제내성을 가지고 있었으며, 이러한 가축에서의 내성균 위험성을 나타내고 있다. 특히 균주 4는 시험에 사용한 10개의 모든 항생제의 디스크에 저항성을 보였고, 내성을 극복하기 위해 항생제/sulbactam 조합에 대해서도 실험관적 시험에 전혀 살균력의 상승을 보이지 않았다. 최근 이러한 고병원성 황색포도상구균이 젖소 유방염에서 분리되고 있으며, 공중보건측면에서 이러한 유방염 유래 내성세균의 잠재적인 위험성이 부각되고 있다(8,12).

베타락타마제 차단제는 세균이 분비하는 베타락타마제의 활성부위와 비가역적으로 결합하며, 베타락탐 계열의 항생제는 베타락타마제 차단제와 함께 사용할 경우 베타락타마제를 통한 항생제 내성을 차단하고 세균 감염증에 대한 치료 효과를 높일 수 있다(32,33). 임상적으로 사용되는 베타락타마제 차단제로는 sulbactam, tazobactam, clavulanic acid 세 가지가 있으며, 이중 sulbactam은 합성 베타락탐 분자로서 aminopenicillin과 유사한 화학적, 약력학적 특성을 지니고 있다(19). 이렇게 베타락탐 항생제가 sulbactam과 병합하여 사용될 때, Enterobacteriaceae와 혐기성 세균 뿐만 아니라 *Streptococci* spp. 및 *Enterococci* spp.에 대해서까지 항균 범위가 증가되고(27,31), 여러 세균의 혼합 감염에도 효과적으로 작용함이 보고되었다(5). 젖소 유방염 병원균에 대하여 항생제와 베타락타마제 차단제의 합제에 관한 감수성 검사에 대한 일부 연구에서도 이와 일치하는 결과가 보고되었는데, 다른 항생제에 비해 ampicillin/sulbactam에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났다(6,7).

본 연구에서는 ampicillin/sulbactam (2:1) 병합 사용시 MRSA에 살균력의 상승을 보여주었다. 실제 젖소 유방염에서 황색포도상구균은 biofilm을 형성하고 유선세포 내로 침입할 수 있기 때문에 숙주면역이나 항생제 치료를 회피할 수 있고(14) 호중구에 의해 탐식된 후에도 생존 가능하므로, 세포 내로 침투할 수 있는 macrolide 계열을 제외한 다른 항생제에는 잘 사멸되지 않는다(11). Sulbactam/ampicillin은 조직 침투력과 안정성이 뛰어나 효과적으로 감염부위에 작용하여 살균력을 발휘한다고 보고되고 있고(28,30) 세포내 감염

세균인 mycobacterium에서도 살균력이 확인되었다(26). 이러한 특성은 in vivo 상태에서도 ampicillin/sulbactam 합제가 황색포도상구균에 대한 효과적 치료 제제로서의 가능성으로 제시한다.

본 연구에서 ampicillin과 amoxicillin 및 sulbactam의 병합은 메티실린 내성 황색포도상구균에 대하여 살균력의 상승 효과를 나타내었지만, cephalexin과 sulbactam의 병합은 cephalexin 단독 처리와 비교하여 살균력이 상승하지 않았고, 오히려 균주 4에 대해서는 살균력이 감소되었다. Cephalosporin과 sulbactam 병합 사용은 기존의 cephalosporin에 저항성을 가지는 세균들에게도 직접적인 항생작용을 하는 것으로 알려져 있다(32). 특히 3세대 cephalosporin에 저항성을 보이는 일부 *E. coli* 등에서 sulbactam을 혼합할 경우 45%의 균주에서 항균력을 보이지만, *S. aureus*에 대한 살균력의 항균력 향상효과가 관찰되지 않았다고 보고되었으며(34), 이는 본 연구와의 결과와도 일치한다.

항생제와 sulbactam 합제는 사람에서 다른 항생제의 사용에 비해 빠른 치료시간과 높은 예방효과로 치료비용을 상당히 낮추어 준다고 알려져 있다(1,2). 황색포도상구균에 의한 유방염이 낙농에서 가장 큰 경제적 손실을 주는 질병인 점을 감안하면, 유방염에서 문제되는 항생제 내성균에 대한 대처 방안의 하나로 sulbactam 등의 합제의 사용을 고려해보아야 할 것으로 생각된다.

결론

많은 종류의 항생제 유방염 연구가 유방염 치료에 널리 사용되고 있으며, 항생제 내성 원인균이 증가하면서 유방염 치료율은 감소하고 있다. 본 연구의 목적은 젖소유방염에서 분리된 메티실린 내성 황색포도상구균에 대하여 베타락타마제 차단제의 일종인 sulbactam과 다른 항생제를 조합 시 살균력의 상승여부를 비교 관찰하는 것이다. 시험 균주로 임상형 또는 준임상형 젖소 유방염에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 5주를 사용하였고, 모든 균주가 항생제 감수성 검사에서 oxacillin에 저항성을 보였으며, 다제내성을 나타내었다. 항생제는 ampicillin 및 amoxicillin, cephalexin을 사용하였

고, 모든 균주를 대상으로 각 항생제의 단독사용과 sulbactam 병합 사용시 항생제의 살균력을 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M31-A2)에 따라 최소살균농도를 측정하여 비교하였다. 시험 결과, *S. aureus*에 대하여 ampicillin/sulbactam (2:1) 및 amoxicillin/sulbactam (2:1)의 병합사용이 단독 항생제에 비해 증가된 살균력이 관찰되었다. 따라서, 메티실린 내성을 보이는 *S. aureus*으로 인한 유방염에 대한 항생제 중 ampicillin/sulbactam과 amoxicillin/sulbactam의 조합이 우선적 선택대상이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Akalin HE. The role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitors in the management of mixed infections. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: S15-S20.
2. Dajani A. Use of ampicillin/sulbactam and sultamicillin in pediatric infections: a re-evaluation. *J Int Med Res* 2001; 29: 257-269.
3. Erskine R, Cullor J, Schaellibaum M, Yancey B, Zecconi A. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. *National Mastitis Council Proceedings* 2004; 400-413.
4. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1111-1118.
5. Finegold SM. In vitro efficacy of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against bacteria involved in mixed infections. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: S9-S14.
6. Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Rebuelto M, Rodriguez Fermepin M, De Torrest RA. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1913-1917.
7. Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, DeGregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 2000; 83: 1224-1227.
8. Guinane CM, Sturdevant DE, Herron-Olson L, Otto M, Smyth DS, Villaruz AE, Kapur V, Hartigan PJ, Smyth CJ, Fitzgerald JR. Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J Infect Dis* 2008; 197: 205-213.
9. Hashisaki PA, Jacobson JA. Characteristics, control, and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Pharm* 1982; 1: 343-348.
10. Hirano L, Bayer AS. Beta-Lactam-beta-lactamase-inhibitor combinations are active in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-producing oxacillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 685-690.
11. Jánosi S, Huszenicza A, Horváth T, Gémes F, Kulcsár M, Huszenicza G. Bacteriological recovery after intramuscular or intracisternal spiramycin-based drying-off therapy. *Acta Vet Hung* 2001; 49: 155-162.
12. Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, Somogyi P, Dán A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, Wagenaar JA. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 630-632.
13. Kazmierczak A, Duez JM, Pechinot A, Nordmann P, Labia R. In vitro bactericidal activity of sulbactam plus ampicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Infect Dis* 1986; 8: S549-S554.
14. Kerro Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q* 2002; 24: 181-198.
15. Kim WJ, Park SC. Bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview from Korea. *Yonsei Med J* 1998; 39: 488-494.
16. Kwon NH, Park KT, Jung WK, Youn HY, Lee Y, Kim SH, Bae W, Lim JY, Kim JY, Kim JM, Hong SK, Park YH. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet Microbiol* 2006; 117: 304-312.
17. Makovec JA, Ruegg PL. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 1582-1589.
18. McDougal LK, Thornsberry C. New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 482-488.
19. Mealey KL. Penicillins and beta-lactamase inhibitor combinations. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1893-1896.
20. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot* 1998; 61: 742-756.
21. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1176-1185.
22. National Mastitis Council. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Arlington: National Mastitis Council, Inc. 1999: 11-108.
23. Noguchi JK, Gill MA. Sulbactam: a beta-lactamase inhibitor. *Clin Pharm* 1988; 7: 37-51.
24. Pak SI, Han HR, Shimizu A. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 1013-1018.
25. Piddock LJ. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 1-3.
26. Randhawa B, Harris EB, Prabhakaran K. Bactericidal action of oral ampicillin/sulbactam against *Mycobacterium leprae*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 279-281.
27. Retsema JA, English AR, Girard A, Lynch JE, Anderson M, Brennan L, Cimochoowski C, Faiella J, Norcia W, Sawyer P. Sulbactam/ampicillin: in vitro spectrum, potency, and activity in models of acute infection. *Rev Infect Dis* 1986; 8: S528-S534.
28. Schwiersch U, Lang N, Wildfeuer DA. Concentration of sulbactam and ampicillin in serum and the myometrium. *Drugs* 1986; 31: 26-28.
29. Shryock TR, Apley M, Jones RN, Lein DH, Thornsberry C, Walker RD, Watts JL, White DG, Wu CC. Performance

- Standards for Antimicrobial disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; NCCLS M31-A2, 2nd ed. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002: 13-30.
30. Warnke JP, Wildfeuer A, Eibel G, Pfaff G, Klammer A. Pharmacokinetics of ampicillin/sulbactam in patients undergoing spinal microneurosurgical procedures. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36: 253-257.
 31. Wexler HM, Harris B, Carter WT, Finegold SM. In vitro efficacy of sulbactam combined with ampicillin against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 876-878.
 32. Williams JD. Beta-Lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 494-497.
 33. Williams JD. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: S3-S7.
 34. Zhang YL, Li JT. The in vitro activity of sulbactam combined with third generation cephalosporins against third generation cephalosporin-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 143-146.