

## 호중구감소 생쥐 감염모델로 평가한 황색포도알균 접종량 차이에 따른 Vancomycin의 효능

신현호<sup>1</sup> · 한승훈<sup>2</sup> · 임동석<sup>2</sup> · 이동건<sup>3</sup> · 박철민<sup>4</sup> · 김시현<sup>3</sup> · 권재철<sup>3</sup> · 홍경욱<sup>3</sup> · 박선희<sup>3</sup> · 최수미<sup>3</sup> · 최정현<sup>3</sup> · 유진홍<sup>3</sup>  
가톨릭대학교 의과대학 일반대학원 생명과학과<sup>1</sup>, 가톨릭대학교 의과대학 약리학교실<sup>2</sup>, 내과학교실<sup>3</sup>, 가톨릭대학교 의학연구소<sup>4</sup>

### Efficacy of Vancomycin against *Staphylococcus aureus* according to Inoculum Size in a Neutropenic Mouse Infection Model

**Background:** *Staphylococcus aureus* is one of the most important gram-positive pathogens in many clinical situations. Use of vancomycin against methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) has been anecdotally associated with treatment failure, which could be attributable to an inoculum effect (IE). Using a neutropenic mouse thigh infection model, we tried to evaluate the *in vivo* IE of vancomycin against *S. aureus*.

**Materials and Methods:** Twenty strains of *S. aureus* were used. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute guideline. Six-week-old specific-pathogen-free, female CD-1 mice weighing 23-27 grams were used. The neutropenic mice received inoculations of 5.02-5.74 log<sub>10</sub> CFU/thigh in one thigh (low inoculum, LI), and 7.22-7.73 log<sub>10</sub> CFU/thigh in the other thigh (high inoculum, HI) before therapy. The mice were treated with 6 hourly subcutaneous doses of vancomycin (3.125-100 mg/kg) for 24 h. Single-dose serum pharmacokinetics of vancomycin was determined. Dose-response data were analyzed by an  $E_{max}$  model using non-linear regression. Static doses and area under the curve (AUC)/MIC for bacteriostatic effect at each inoculum were calculated and compared. The ratio of static dose and AUC/MIC between HI and LI (IE index) provided the magnitude of IE for each organism.

**Results:** Five methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strains and 15 MRSA strains were used. Vancomycin MICs of the 20 strains varied by 4-fold (0.5-2 mg/L). The AUC/MIC ratio was the major parameter determining the efficacy of vancomycin against *S. aureus*. Mean (range) static dose on LI and HI was 20.7 (11.8-35.1) and 136.7 (32.1-314), respectively. The mean IE index of static dose between them was 7.39. Mean (range) of AUC/MIC on LI and HI was 27.0 (6.61-66.6) and 152.3 (46.2-344), respectively, which produced a mean IE index of AUC/MIC of 7.47. The IE indices of the MSSA strains were significantly higher than those of the MRSA strains (11.3 vs. 6.1 on static dose [ $P=0.018$ ], 11.4 vs. 6.2 on AUC/MIC [ $P=0.034$ ]).

**Conclusions:** With a 100-fold inoculum increment of *S. aureus*, at least a 7-fold dose of vancomycin would be required to show the same bacteriostatic effect. Thus, IE as well as MICs is an important parameter in selecting and adjusting a dose and dosage interval along with the resistance profile in the treatment of *S. aureus* infections. IE to vancomycin observed in the *in vivo* neutropenic mouse model was more evident for MSSA strains than for MRSA strains.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, Vancomycin, Inoculum effect, *In vivo*

Hyun-Ho Shin<sup>1</sup>, Seunghoon Han<sup>2</sup>, Dong-Seok Yim<sup>2</sup>, Dong-Gun Lee<sup>3\*</sup>, Chulmin Park<sup>4</sup>, Si-Hyun Kim<sup>3</sup>, Jae-Cheol Kwon<sup>3</sup>, Kyung-Wook Hong<sup>3</sup>, Sun-Hee Park<sup>3</sup>, Su-Mi Choi<sup>3</sup>, Jung-Hyun Choi<sup>3</sup>, and Jin-Hong Yoo<sup>3</sup>

Department of <sup>1</sup>Biomedical Science, The Catholic University of Korea, Graduate School; Departments of <sup>2</sup>Pharmacology, <sup>3</sup>Internal Medicine, College of Medicine, <sup>4</sup>Catholic Research Institutes of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Copyright © 2011 by The Korean Society of Infectious Diseases | Korean Society for Chemotherapy

Submitted: February 1, 2011

Revised: March 28, 2011

Accepted: April 1, 2011

Correspondence to Dong-Gun Lee, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, #505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

Tel: +82-2-2258-6003, Fax: +82-2-535-2494

E-mail: symonlee@catholic.ac.kr

[www.icjournal.org](http://www.icjournal.org)

## 서론

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 피부 연조직 감염을 비롯하여 패혈증, 폐렴, 심내막염, 독성쇼크 증후군 등을 일으키는 주요 원인균 중 하나이다. 특히 메티실린 내성 황색포도알균(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)은 1960년대 유럽에서 처음 보고된 후, 전 세계적으로 병원 및 지역사회에서 감염 빈도가 점차 증가하면서 vancomycin 사용 역시 늘어나고 있다[1-3]. 그러나 MRSA에 의한 심내막염이나 골수염 등 중증 감염에서 vancomycin에 대한 치료 실패율이 37-50%로 보고되고 있고[3-5], 메티실린 감수성 황색포도알균(methicillin susceptible *S. aureus*, MSSA)은  $\beta$ -lactam 항생제에 비해 vancomycin의 효능이 떨어진다고 발표되기도 하였다[6-8].

Vancomycin 효능 감소의 원인으로 황색포도알균에 대한 감수성 감소 혹은 내성 등이 알려져 있지만[5, 9], 접종효과(inoculum effect)도 그 이유 중의 하나로 추정되고 있다. 접종효과란 초기 세균 접종량이 높을 경우 항생제에 대한 효능이 감소하는 현상으로, vancomycin에 노출된 황색포도알균에서 보고된 바 있다[9-11]. 현재까지 시험관내 실험이나 임상비교연구에서 황색포도알균에 대한 vancomycin의 접종효과가 확인되어 있지만[6, 12, 13], 동물모델에서는 보고가 많지 않았다. 따라서 최근 활발히 이루어지고 있는 동물모델을 이용한 항생제 약동학/약역학 연구, 특히 vancomycin에 대한 접종효과와 동물모델 연구는 사람에게 응용이 가능하고, 항생제 용법 및 용량을 재고하는데 도움이 될 것으로 기대된다[14, 15].

저자들은 호중구감소 생쥐 감염모델을 이용해 황색포도알균 접종량에 따른 vancomycin의 효능 차이를 알아보려 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주, 배지, 항생제

*S. aureus* ATCC 29213과 *S. aureus* 임상분리주 19주, 총 20주를 대상으로 하였다. 세균배양과 생균수 측정을 위해 cation adjusted Mueller Hinton II broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), Mueller Hinton II agar (Becton, Dickinson and Company), tryptic soy agar (Becton, Dickinson and Company) 등을 이용하였다. 감수성 검사를 위해 vancomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 oxacillin (Sigma Aldrich)을 사용하였고, 동물실험에는 vancomycin (씨제이 염산반코마이신-주, 씨제이제일제당주식회사, 인천, 대한민국)을 사용하였으며 매 실험 직전에 적정 농도로 제조하여 4℃에서 보관하였다.

### 2. 시험관내 항생제 감수성 시험

실험 균주에 대한 oxacillin과 vancomycin의 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentrations, MICs)를 측정하였다. Oxacillin의 최소억제농도 측정에는 cation adjusted Mueller Hinton II broth에 염화나트륨을 첨가해 2% 농도가 되도록 조정하였다[16]. 균의 희석은

tryptic soy agar 배지에 균을 도말한 후 24시간 배양하여 멸균된 생리식염수에 균을 현탁하였고, 분광광도계(SPECTRONIC 20D+, Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA) 580 nm에서 0.3 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL)이 되도록 조정하고 희석하여 최종농도는 각 well 당  $5 \times 10^5$  CFU/mL로 하였다. 정도관리를 위해 *S. aureus* ATCC 29213을 사용하였다.

### 3. 생쥐 감염모델

무균상태의(specific pathogen free, SPF) 암컷, 6주령(23-27 g)의 CD-1 (ICR/Swiss, 오리엔트바이오, 가평, 대한민국)을 사용하였다. 본 연구는 실험동물에 관한 법률에 의거한 가톨릭대학교 성의교정 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee [IACUC] in School of Medicine, The Catholic University of Korea)의 허가(CUMC-2008-0136-05)를 얻었고 동물보호법(Animal welfare act, 전면개정 2007.1.26, 법률 제 8282호, 시행일 2008.1.27) 13조, 14조에 따른 규정과 절차를 준수하며 실시하였다.

호중구감소증( $<100/\text{mm}^3$ ) 유도를 위해 cyclophosphamide monohydrate (Sigma Aldrich)를 실험 5일 전(D-5) 150 mg/kg, 2일 전(D-2) 100 mg/kg의 용량으로 2회 피하 주사하였다.

실험 균주는 Mueller Hinton II broth에 실험 전날 37℃에서 계대배양하였고 분광광도계로 흡광도 580 nm에서 0.3으로 조정하였다. 그 후 생리식염수로 각각 10배, 1,000배 희석하여 0.1 mL씩 양쪽 대퇴부에 접종하였다. 생쥐의 왼쪽 대퇴부( $1 \times 10^{4.8-5.4}$  CFU/thigh, 낮은 접종량, Low Inoculum, LI)와 오른쪽 대퇴부( $1 \times 10^{6.7-7.53}$  CFU/thigh, 높은 접종량, High Inoculum, HI)에서의 접종량을 각각 확인하였다. 2시간 후 vancomycin을 피하 주사하면서 실험을 시작하였다. 마취는 isoflurane (포란, 중외제약, 화성, 대한민국)을 사용하였다.

Vancomycin 투여 24시간 후 이산화탄소 가스로 생쥐를 안락사 시켜 대퇴부를 분리하였고 생리식염수 시험관에 넣고 homogenizer (POLYTRON System PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucerne, Switzerland)로 잘게 부숴다. 10배씩 희석하면서 Mueller Hinton II agar 배지에 도말하였고 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 생균수를 측정하였다. 결과는 CFU/thigh로 표기하였고 실험실의 생균수 측정 한계는  $1 \times 10^2$  CFU/thigh였다.

Vancomycin 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg/일의 용량을 0.2 mL씩 피하 주사하였다. 모든 실험에 실험군과 대조군을 설정하였고, 각 군별로 최소 3마리 이상의 생쥐를 사용하였다. 대조군에는 vancomycin 대신 생리식염수를 피하 주사하였고 실험시작 직전과 실험 종료 직후에 안락사 시키고 대퇴부를 분리하여 실험군과 같은 방법으로 생균수를 측정하였다.

### 4. 약동학 측정

약동학 측정을 위해 vancomycin을 농도별(25, 50, 100, 200 mg/kg)으로 각각 0.2 mL씩 피하 주사하였다. 각 실험군은 용량과 시간에 따라 3마리씩 사용하였고 마취상태에서 거드랑동맥 혹은 심장천자로 시간대별(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8시간) 혈액을 채취하였다. 10,000×

g, 5분간 원심분리(MIKRO 200R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) 후 혈장 농도 측정 때까지 -70℃에 보관하였다.

Vancomycin 농도 측정은 fluorescence polarization immunoassay (TDx/FLx, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 시료를 모아 하루에 모두 측정하여 측정일내 변이계수(intraday coefficients of variation)는 측정하지 않았으며, 측정 민감도는 2 mg/L이었다.

## 5. 용량-분할 실험(Dose Fractionation Study)

호중구감소 생쥐의 대퇴부에 *S. aureus* ATCC 29213을 접종하고( $1 \times 10^{6.8}$  CFU/thigh) 2시간 후 vancomycin을 피하 주사(12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg/일)하였다. 투여간격은 3, 6, 12, 24시간 마다로 실험하였고 각 시간군 간 18마리(2배씩 증량한 6개의 용량, 각 용량 당 3마리씩)씩 24시간 동안 서로 다른 vancomycin 용법, 용량으로 투여한 다음 안락사 시킨 후 대퇴부를 해부하여 생균수를 측정하였다. 대조군은 실험 전과 24시간 후에 각 3마리씩 안락사시켰다. 용량-분할실험으로 항생제의 특성을 파악하기 위해 Area Under the Curve/MIC (AUC/MIC), Maximum Concentration/MIC ( $C_{max}$ /MIC), percentage of time above MIC ( $T > MIC$  [%]) 등의 약동학/약역학 지표(Pharmacokinetics and Pharmacodynamics [PK/PD] index) 중 효과를 예측하는데 가장 적합한 변수를 확인하였다.

## 6. Data 분석

Vancomycin의 약동학적 분석을 위해 집단약동학적 방법을 도입하였으며, NONMEM (ICON, Ellicott city, MD, USA, Ver. 6.2)을 이용하여 확보된 데이터에 대한 분석을 수행하고, 이를 바탕으로 미지의 용량에 대한 시뮬레이션을 실시하였다. 또한 Sigmoid dose-effect 모델을 이용하여 약역학 자료를 분석하였다[17, 18]. Sigmoid Emax 모델은 Hill's equation에서 유도한 것으로  $E = (E_{max} \times D^N) / (ED_{50}^N + D^N)$ 이다. E는 효과(efficacy)를 의미하며 24시간 실험동안 대조군과 치료군 사이의 균수의 변화( $\log_{10}$  CFU/thigh)이다.  $E_{max}$ 는 최대효과(maximal effect)이고, D는 24시간 항생제 총 용량,  $ED_{50}$ 은  $E_{max}$ 의 50%에 도달하는데 필요한 항생제 용량(mg/kg/일), N은 용량-효과 곡선의 기울기이다.  $E_{max}$ ,  $ED_{50}$ , N은 nonlinear least-squares regression을 이용하여 계산하였다(SigmaStat version 3.10, Systat Software, San Jose, CA, USA). AUC/MIC,  $C_{max}$ /MIC,  $T > MIC$  (%)와 효과의 관련성은 nonlinear least-squares multivariate regression법을 이용하여 계산하였다(SigmaStat). 각 PK/PD 지표의 회귀에 의한 효과분산을 추정하기 위해 결정계수(coefficient of determination,  $R^2$ )를 사용하였다.

각 용량별, 항균제별 치료효과 차이를 비교하기 위해 24시간 static dose, 1  $\log_{10}$  kill dose, 2  $\log_{10}$  kill dose를 이용하였고 아래의 공식을 따랐다.

$$\log_{10} D = \frac{\log_{10} [E/(E_{max} - E)]}{N} + \log_{10} ED_{50}$$

E는 24시간 동안의 대조군 성장정도(D는 용량), 1  $\log_{10}$  kill은  $E =$  대

조군 성장정도 + 1  $\log$ , 2  $\log_{10}$  kill은  $E =$  대조군 성장정도 + 2  $\log$ 로 계산하였다.

또한 서로 다른 접종량(HI, LI)에서 vancomycin의 접종효과를 비교하기 위해 접종효과 지표(Inoculum Effect index, IE index)를 계산하였다. 접종효과 지표는 static dose와 정균효과(bacteriostatic effect)를 얻기 위한 AUC/MIC 등의 2가지 방법으로 HI와 LI간 비율을 계산하였고, t-test 또는 Mann-Whitney rank sum test (SigmaStat)로 확인하였다.

## 결과

### 1. 시험관내 항생제 감수성 시험

20균주의 oxacillin과 vancomycin에 대한 감수성 결과는 Table 1과 같았다. MSSA는 5개, MRSA는 15개 균주였고, 모두 vancomycin 감수성이었다. MSSA와 MRSA의 vancomycin MIC 범위는 각각 0.5-1, 0.5-2 mg/L였다.

### 2. 호중구감소증 지속기간

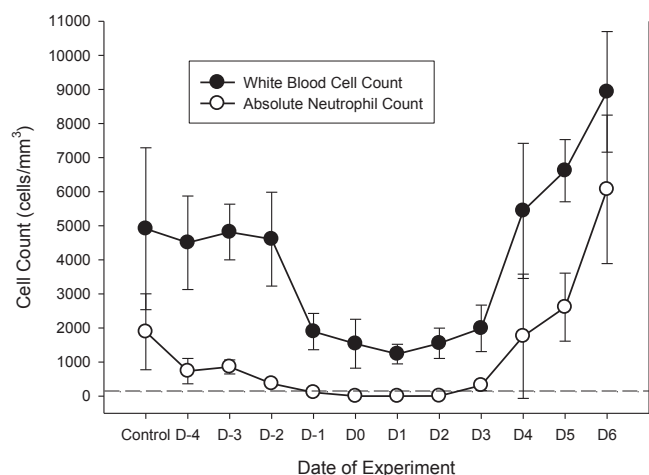
Cyclophosphamide 투여 직전(실험 5일 전)부터 실험 후 6일까지(D6) 12일간 백혈구수와 호중구수를 측정하였다. Cyclophosphamide 투여 시작 4일째부터 호중구감소증이 시작되었고 실험 후 2일까지 4일 간 지속되었다(Fig. 1).

### 3. 약동학측정

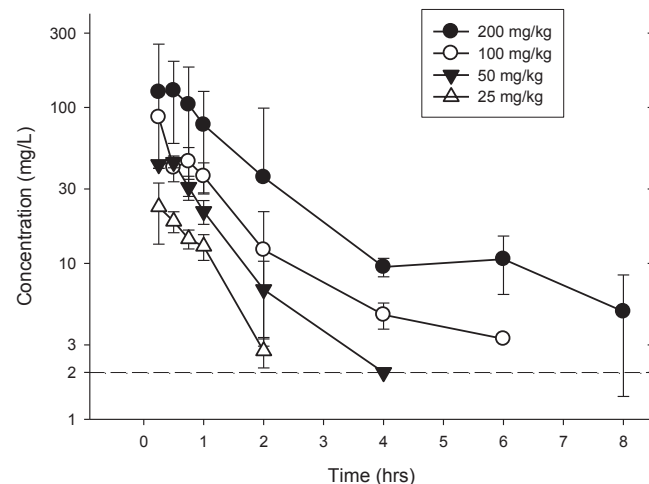
호중구감소 생쥐 감염모델에서 vancomycin 25, 50, 100, 200 mg/

**Table 1.** *In vitro* Activities of Oxacillin and Vancomycin against Isolates of *Staphylococcus aureus*

Strains	MICs (mg/L)	
	Oxacillin	Vancomycin
ATCC 29213	0.25	0.5
ES 6	0.5	1
ES 29	0.5	1
YS 5	0.5	1
YS 29	0.25	1
13B-382	16	1
13B-394	16	1
13B-421	≥256	1
ES 8	64	2
ES 21	≥256	1
JA 11	128	1
JA 54	64	0.5
PA 7	≥256	2
PA 23	≥256	0.5
R 12	≥256	2
WE 10	16	0.5
WE 12	≥256	0.5
WE 23	64	0.5
WE 28	128	2
YS 100	128	2



**Figure 1.** Changes of mean white blood cell and neutrophil counts during cyclophosphamide treatment in the mouse model. Mice were rendered neutropenic (polymorphonuclear cell count  $<100/\text{mm}^3$ , dashed horizontal line) for 4 days starting from 1 day before experiment by two subcutaneous injections of cyclophosphamide (150 mg/kg at 5 days and 100 mg/kg at 2 days before experiment or infection).



**Figure 2.** Serum vancomycin concentrations after administration of single doses of 25, 50, 100, 200 mg/kg in neutropenic infected mice. Each symbol represents the mean  $\pm$  standard deviation of the levels in the sera of three mice. The dashed horizontal line represents the analytic sensitivity threshold (2 mg/L).

kg 약동학은 Fig. 2, Table 2와 같았다. 용량 범위 연구에서 50 mg/kg과 100 mg/kg을 비교하였을 때 반감기는 2.3배 차이(50 mg/kg: 0.58 h, 100 mg/kg: 1.36 h), 50 mg/kg과 200 mg/kg에서는 2.7배 차이(200 mg/kg: 1.57 h)를 보여 약동학 지표는 용량 의존적이었다. AUC/용량(dose)은 1.02-1.45,  $C_{\text{max}}$ /용량(dose)은 0.64-0.92의 범위를 보였다.

#### 4. 용량-분할실험

실험 시작 시 접종량은  $6.80 \log_{10}$  CFU/thigh였고 24시간 후 대조군은  $8.82 \log_{10}$  CFU/thigh로  $2.02 \log_{10}$  CFU/thigh까지 잘 자람을 확인하였다. Vancomycin을 3, 6, 12, 24시간의 간격으로 피하 주사하여 용

**Table 2.** Single-dose Pharmacokinetics of Vancomycin in the Infected Mice

Dose (mg/kg)	Mean $C_{\text{max}}$ (mg/L) $\pm$ SD	$t_{1/2}$ (h)	AUC (mg·h/L)
25	23.0 $\pm$ 9.74	0.53	25.5
50	43.1 $\pm$ 2.39	0.58	52.2
100	86.5 $\pm$ 45.7	1.36	103.2
200	128.3 $\pm$ 69.5	1.57	289.2

SD, Standard Deviation; AUC, Area Under the Curve.

량-반응 그래프로 계산했을 때 6시간 간격으로 투여한 실험군에서의 static dose는 57.64 mg/kg/일( $R^2=0.80$ )로 24시간 200.99 mg/kg/일( $R^2=0.86$ ), 12시간 98.30 mg/kg/일( $R^2=0.79$ ), 3시간 222.82 mg/kg/일( $R^2=0.90$ )과 비교해 가장 낮았다.

*S. aureus* ATCC 29213에 대한 vancomycin 효과와 AUC/MIC,  $C_{\text{max}}$ /MIC,  $T>\text{MIC}$  (%) 등과 같은 약역학 지표들의 상관관계는 Fig. 3과 같았다. AUC/MIC의 결정계수는 84%로  $C_{\text{max}}$ /MIC 59%,  $T>\text{MIC}$  (%) 61%보다 높아 PK/PD index 중 AUC/MIC가 가장 효과적인 지표임을 알 수 있었다(Fig. 3).

#### 5. 접종효과 지표(Inoculum Effect index, IE index)

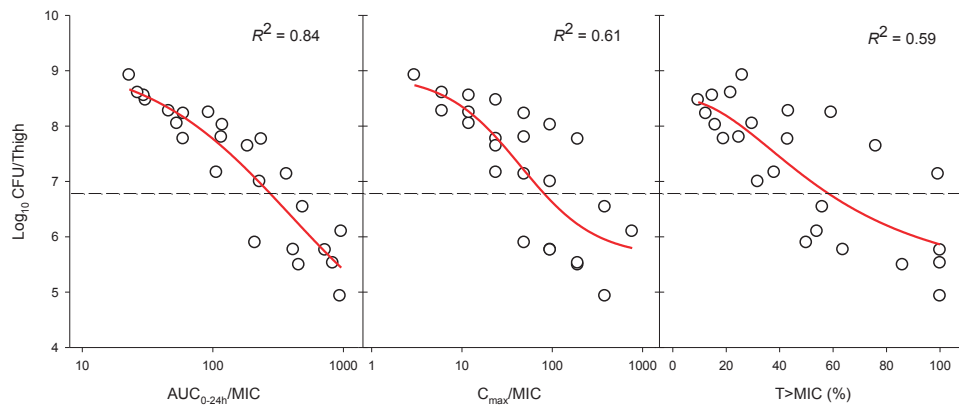
용량-분할실험 결과에 따라 6시간 간격으로 vancomycin을 피하 주사하였고 투여 용량은 12.5-400 mg/kg/일이었다. 20균주의 초기 접종량은 LI에서 평균  $5.41 \log_{10}$  CFU/thigh (범위, 5.02-5.74)였고, HI에서 평균  $7.43 \log_{10}$  CFU/thigh (범위, 7.22-7.73)로 각 군주에서 LI와 HI간의 초기 접종량 차이는  $2.02 \log_{10}$  CFU/thigh (범위, 1.71-2.54)였다(Table 3). 24시간 후 LI에서 평균  $8.23 \log_{10}$  CFU/thigh (범위, 6.92-8.85), HI에서 평균  $9.03 \log_{10}$  CFU/thigh (범위, 8.14-9.67)까지 잘 자람을 확인하였다. Static dose는 LI에서 평균 20.7 mg/kg/일(범위, 11.8-35.1)이었고, HI에서 평균 136.7 mg/kg/일(범위, 32.1-314)로, 20균주의 접종효과 지표 평균은 7.39이었다. 또한 정균효과를 얻기 위한 AUC/MIC는 LI에서 평균 27.0 (범위, 6.61-66.6)이었고, HI에서 평균 152.3 (범위, 46.2-344)로, 20균주의 접종효과 지표 평균은 7.47이었다(Table 3).

Methicillin 감수성 여부에 따라 static dose를 이용한 접종효과 지표를 비교했을 때 MSSA와 MRSA의 접종효과 지표는 각각 11.3, 6.1이었고, MSSA에서 통계적으로 유의하게 접종효과 지표가 높았다( $P=0.018$ ). AUC/MIC로 비교하였을 때 MSSA와 MRSA에서 각각 11.4, 6.2로 MSSA에서 접종효과 지표가 통계적으로 유의하게 높았다( $P=0.034$ ).

#### 고찰

성공적인 치료와 올바른 항생제 선택을 위해서 임상에서는 시험관내 감수성 결과 및 약동학적 특성 등을 파악하게 되는데[16, 19] 표준화된 시험관내 실험과 생체내 상황은 다를 수 있다. 접종효과는 70여 년 전 시험관내 실험을 통해 확인되었고[20], 심내막염, 골수염 등 비교적 높은 접종량에 의한 감염에서 vancomycin의 살균효과 감소 또는 치료 실패의 원인으로 알려져 있다[21]. 본 연구는 호중구감소 생쥐 한 개체의 양쪽 다리에 각각 세균 접종량을 달리하여 접종하되 항생제 투여 환경은





**Figure 3.** Correlation of vancomycin PK/PD indices with efficacy against *S. aureus* ATCC29213. Each circle represents the mean data from three mice. The dashed horizontal line is the starting inoculum (6.8 log<sub>10</sub> CFU/thigh).  $R^2$  is the coefficient of determination.

**Table 3.** Inoculum Effect and Index for Each Organism

Organisms	Low Inocula			High Inocula			Inoculum Effect	
	Inoculum Size (log <sub>10</sub> CFU/thigh)	Static		Inoculum Size (log <sub>10</sub> CFU/thigh)	Static			
		Dose (mg/kg/day)	AUC/MIC		Dose (mg/kg/day)	AUC/MIC	Inoculum Size	AUC/MIC
ATCC 29213	5.02	15.2	16.8	7.56	215	254	14.2	15.1
ES 6	5.36	18.5	19.4	7.26	314	325	17.0	16.8
ES 29	5.59	16.4	18.0	7.72	142	144	8.66	8.00
YS 5	5.62	26.9	28.0	7.43	219	227	8.14	8.11
YS 29	5.37	20.1	21.0	7.39	173	188	8.61	8.95
13B-382	5.31	23.8	24.9	7.73	71.4	75.6	3.00	3.04
13B-394	5.74	35.1	37.0	7.64	121	127	3.45	3.43
13B-421	5.21	14.3	15.1	7.44	95.7	101	6.69	6.69
ES 8	5.68	11.8	6.82	7.51	91.8	48.0	7.78	7.04
ES 21	5.30	20.4	21.4	7.30	110	115	5.39	5.37
JA 11	5.24	27.0	28.1	7.24	111	116	4.11	4.13
JA 54	5.25	20.6	43.5	7.31	86.4	182	4.20	4.18
PA 7	5.49	12.8	6.78	7.32	133	69.4	10.4	10.2
PA 23	5.37	18.5	38.8	7.37	52.8	113	2.85	2.91
R 12	5.46	15.5	8.21	7.22	210	109	13.5	13.3
WE 10	5.35	21.1	44.2	7.37	53.8	115	2.55	2.60
WE 12	5.22	31.8	66.6	7.25	32.1	67.0	1.00	1.00
WE 23	5.22	33.2	70.0	7.63	134	280	4.04	4.00
WE 28	5.64	12.5	6.61	7.49	88.1	46.2	7.05	6.99
YS 100	5.68	18.5	19.5	7.39	280	344	15.1	17.6
Mean±SD	5.41±0.20	20.7±6.94	27.0±18.2	7.43±0.16	137±76.4	152±90.0	7.39±4.62	7.47±4.89

SD, Standard Deviation.

동일한 모델을 고안하여 황색포도알균에 대한 vancomycin의 생체내 접종효과와 methicillin 내성 유무에 따른 접종효과 차이를 확인하고자 하였고, 추후 임상에서 vancomycin의 적정 용법, 용량 재고에 도움이 되고자 하였다.

황색포도알균 접종량은 실험조건이나 모델 등에 따라 달라질 수 있고, 본 연구에 사용한 접종량은 LI의 경우 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 MIC 실험조건과 비슷하게 모의 한 것이 고[16], HI은 시험관내 실험보다 높은 접종량에 의한 실제 감염질환을 모의하고자 약 100배 높은 양을 적용하였다[22]. 황색포도알균의 HI

감염의 경우 LI 감염에 사용되는 vancomycin의 평균 7.39배의 용량을 사용해야 정균효과가 나타났고, AUC/MIC는 HI 감염에서 LI 감염에 비해 평균 7.47배 높았다. 동일한 군주라도 초기 세균 접종량에 따라 필요한 vancomycin의 용법, 용량이 달라질 수 있음을 알 수 있었고, 102.02 CFU/thigh의 접종량 차이로 정균효과를 얻기위한 AUC/MIC는 7.47배의 차이를 보였다. 최근 시험관내 실험이나 동물실험, 일부 임상결과를 기초로 하여 vancomycin의 AUC/MIC가 400에 도달하는 것이 최적의 효과와 관련된다는 지침이 발표되었다[23, 24]. 황색포도알균 20군주에서 10<sup>5.41</sup> CFU/thigh 접종량의 경우 정균효과를 얻기 위한 AUC/MIC

는 27.0,  $10^{7.43}$  CFU/thigh 접종량의 경우 AUC/MIC는 152로 위에 제시한 지점인 400보다는 낮았다. 이는 접종량에 따라 AUC/MIC가 <400이라도 효과가 있음을 의미하지만, 본 연구에서 제시한 AUC/MIC는 평균 효과를 위한 것으로 실제 임상에서 요구하는 살균효과를 얻기 위하여  $>7.43 \log_{10}$  CFU/thigh의 접종량에 의한 감염에서는 AUC/MIC 값이 더 높아질 수 있어 치료에 반응이 없는 경우 세균 접종량에 따른 용법, 용량 재고가 필요할 수 있겠다.

저자들은 황색포도알균에 대한 vancomycin 접종효과의 원인을 아래와 같이 추측한다. 황색포도알균은 HI일 때 세포 내로 침투하는 경향이 있고, 분자량이 큰(1,449 Da) vancomycin은 세포 내 침투가 어렵기 때문에 HI에서는 감염이 더 오래 지속되고 치료기간은 길어지게 된다[25, 26]. 또한 HI에서는 생체막을 형성하여 황색포도알균에 대한 vancomycin의 MIC 증가와 효능저하를 일으킬 수 있고[27], heterogeneous vancomycin intermediate *S. aureus* (hVISA) 또는 small colony variants (SCVs) 등의 부분모집단(subpopulation)을 형성하며[28-30], 많은 황색포도알균 개체와 세균이 생산하는 부산물에 vancomycin의 과도한 접촉으로 인해 HI에서 유리(free) vancomycin의 분획(fraction)이 감소할 수 있다는 것 등이다[31]. MIC 등 시험관내 실험에서 흔히 쓰이는 약  $10^5$  CFU 접종량은 임상에서 경험하는 감염질환의 실제 세균수와는 다를 수 있고, 본 실험의 HI인  $10^7$  CFU 보다 높은 경우도 있을 수 있으므로 생체환경과의 차이를 고려해야 하겠다.

한편 소그룹별 추가 분석한 결과 MSSA에서 MRSA와 비교해 통계적으로 의미있게 IE index가 높았다. Glycopeptide 계열의 항생제는 포도알균에 대해  $\beta$ -lactam계 항생제보다 효과가 낮다고 보고된 바 있었다[32]. 또한 MSSA는 MRSA에 비해 vancomycin의 효과가  $\beta$ -lactam계 항생제보다 낮으므로  $\beta$ -lactam계 항생제가 가능할 경우 vancomycin 사용은 자제해야 한다는 임상 사례대조연구가 있었고[7], Stryjewski 등은 MSSA 균혈증을 가진 혈액 투석환자에서 vancomycin은 cefazolin 보다 치료실패 확률이 높다고 하였다[8]. MSSA에서 vancomycin의 효과가 1세대 cephalosporin 등  $\beta$ -lactam계 항생제보다 떨어지는 기전은 명확히 밝혀지지 않았으나 본 연구의 결과로 추측해 볼 때 MSSA의 HI 감염에서는 vancomycin의 접종효과가 MRSA 감염에서보다 더 높은 것이 원인 중 하나로 고려할 수 있겠고,  $\beta$ -lactam계 항생제와 접종효과를 비교하는 추가 실험이 필요하겠다.

결과에서 언급하지 않았지만 MIC 2 mg/L인 MRSA 균주 5개의 평균 효과를 얻기 위한 AUC/MIC는 LI에서 9.58, HI에서 123으로 12.9배 차이가 있었다. 이는 MIC  $\leq 1.0$  mg/L인 MRSA 균주의 3.74보다 높았다 ( $P=0.003$ ). CLSI에서는 황색포도알균에 대한 vancomycin의 변곡점(breakpoint)을 2 mg/L로 변경하였고[33], 국내에서도 최근 hVISA, VISA가 보고되고 있다[34]. hVISA, VISA 등에서 vancomycin의 효능감소는 이미 알려져 있고[35] 접종효과가 효능감소의 원인 중 하나로 제시될 수 있겠다. 추후 hVISA, VISA를 포함하는 vancomycin MIC에 따른 접종효과 차이 등을 추가 실험할 예정이다.

결론적으로, 약  $10^7$  CFU/thigh의 접종량에 의한 황색포도알균 감염을 vancomycin으로 치료하기 위해서는 약  $10^5$  CFU/thigh 접종량에 의한 감염을 치료하는 것보다 7배 정도의 용량 혹은 AUC/MIC가 더

필요하다는 것을 본 실험으로 알게 되었다. 또한 MSSA에서는 MRSA보다 vancomycin의 접종효과가 더 커 치료실패의 가능성이 높음을 확인하였다. 임상에서 세균 감염을 치료하는데 필요한 항생제를 선택할 때 MIC 뿐만 아니라 접종효과를 고려하는게 도움이 되겠고, 앞으로 약동학/약역학을 이용해 항생제의 효과를 높일 수 있는 용법, 용량 재고 등 많은 연구가 필요하겠다.

## 감사의 글

본 연구는 2009년 식품의약품안전청 용역개발과제의 연구개발비지원(09152의약안237)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
2. Weber JT. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2005;41 (Suppl 4):S269-72.
3. Levine DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* 2006;42 (Suppl 1):S5-12.
4. Karchmer AW. *Staphylococcus aureus* and vancomycin: the sequel. *Ann Intern Med* 1991;115:739-41.
5. Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC; Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis* 2003;36:429-39.
6. LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4665-72.
7. Kim SH, Kim KH, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:192-7.
8. Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK Jr, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, Chu VH, Joyce MJ, Reller LB, Corey GR, Fowler VG Jr. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2007;44:190-6.

9. Rybak MJ, Akins RL. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance: clinical significance and treatment options. *Drugs* 2001;61:1-7.
10. Brook I. Inoculum effect. *Rev Infect Dis* 1989;11:361-8.
11. Lamp KC, Rybak MJ, Bailey EM, Kaatz GW. *In vitro* pharmacodynamic effects of concentration, pH, and growth phase on serum bactericidal activities of daptomycin and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2709-14.
12. Mercier RC, Houlihan HH, Rybak MJ. Pharmacodynamic evaluation of a new glycopeptide, LY333328, and *in vitro* activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1307-12.
13. Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* 2009;9:617-24.
14. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-10; quiz 11-2.
15. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, Drusano GL. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2007;44:79-86.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2008.
17. Craig WA, Andes DR. *In vivo* pharmacodynamics of ceftobiprole against multiple bacterial pathogens in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3492-6.
18. Craig WA, Andes DR, Stamstad T. *In vivo* pharmacodynamics of new lipopeptide MX-2401. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5092-8.
19. Stratton CW. *In vitro* susceptibility testing versus *in vivo* effectiveness. *Med Clin North Am* 2006;90:1077-88.
20. Woods DD. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. *Br J Exp Pathol* 1940;21:74-90.
21. Stevens DL. The role of vancomycin in the treatment paradigm. *Clin Infect Dis* 2006;42 (Suppl 1):S51-7.
22. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VG Jr, Murray BE. Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2206-8.
23. Gould IM. Is vancomycin redundant for serious staphylococcal infection? *Int J Antimicrob Agents* 2010;36 (Suppl 2):S55-7.
24. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, Dalovisio JR, Levine DP. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Infect Dis* 2009;49:325-7.
25. Nettey H, Haswani D, D'Souza M, Oettinger C. *In vitro* antimicrobial effect of encapsulated vancomycin on internalized *Staphylococcus aureus* within endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* 2007;33:133-9.
26. Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F, Tulkens PM. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* 2003;17:615-34.
27. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
28. Conly JM, Johnston BL. VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era? *Can J Infect Dis* 2002;13:282-4.
29. Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 1998;27 (Suppl 1):S68-74.
30. Park YH, Lee DG, Chun HS, Park C, Park SH, Choi SM, Lee HK, Park YJ, Kim SY, Hur JA, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kim CC. Once-daily dosing of arbekacin can suppress the formation of small colony variants of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic infection model. *Infect Chemother* 2006;38:154-63.
31. Ekdahl C, Hanberger H, Hällgren A, Nilsson M, Svensson E, Nilsson LE. Rapid decrease of free vancomycin in dense staphylococcal cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:596-602.
32. Chambers HF. Parenteral antibiotics for the treatment of bacteremia and other serious staphylococcal infections. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, Inc.; 1997:583-601.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2006.
34. Chung G, Cha J, Han S, Jang H, Lee K, Yoo J, Yoo J, Kim H, Eun S, Kim B, Park O, Lee Y. Nationwide surveillance study of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* strains in Korean hospitals from 2001 to 2006. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20:637-42.
35. Howden BP, Ward PB, Charles PG, Korman TM, Fuller A, du Cros P, Grabsch EA, Roberts SA, Robson J, Read K, Bak N, Hurley J, Johnson PD, Morris AJ, Mayall BC, Grayson ML. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis* 2004;38:521-8.