

*Orientia tsutsugamushi*에 대한 항균제 병용의 실험실 효과

대성병원 내과¹, 인하대학교 의과대학 임상의학연구실², 내과학교실³, 미생물학교실⁴
 김은실¹ · 김미경² · 이혜명² · 정문현³ · 이진수³ · 강재승⁴

In vitro Efficacy of Antibiotic Combinations against *Orientia tsutsugamushi*

Eun Sil Kim¹, Mee Kyung Kim², Hye Myung Lee², Moon-Hyun Chung³, Jin-Soo Lee³ and Jae-Seung Kang⁴

¹Department of Internal Medicine, DaeSung General Hospital, Bucheon,

²Clinical Research Center, and ³Department of Internal Medicine, and ⁴Department of Microbiology, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

Background : Occasionally, combinations of antibiotics are used for the treatment of scrub typhus. However, the effectiveness of such combined therapies has rarely been evaluated. To date, no experimental studies have been performed; only 1 clinical study has assessed the efficacy of combined doxycycline and rifampin therapy. To elucidate the efficacies of other antibiotic combinations, we performed an experiment to evaluate the *in vitro* efficacy of antibiotic combinations against *Orientia tsutsugamushi*.

Materials and Methods : *O. tsutsugamushi* strain Boryong was inoculated into the ECV304 cell line. The infected cells were cultured in antibiotic-containing media for 3–5 days and stained with FS15, a monoclonal antibody reacting against the linear epitope on the 56-kDa major outer membrane protein of *O. tsutsugamushi*. Thereafter, antimicrobial susceptibility was measured by flow cytometry and expressed as a growth index (total mass of *Orientia*). The growth indices of doxycycline (0.1 µg/mL), azithromycin (0.1 µg/mL), rifampin (0.0125 µg/mL), cefotaxime (2 and 20 µg/mL), and their various combinations (doxycycline+cefotaxime, doxycycline+rifampin, azithromycin+cefotaxime, and rifampin+cefotaxime) were measured. The above mentioned antibiotic concentrations, except for that of cefotaxime, represent the minimal inhibitory concentrations of each antibiotic.

Results : The growth indices of doxycycline (4.67% and 0.52%), rifampin (2.35% and 0.26%), and azithromycin (7.54%) were within the range of full suppression of *O. tsutsugamushi*; in contrast, cefotaxime (87.60%) was ineffective. The growth indices of doxycycline + rifampin were 0.10% and 0.10%, which were similar to those obtained with doxycycline or rifampin alone. The growth indices of doxycycline+cefotaxime were 3.99% and 3.65% in low-dose cefotaxime (2 µg/mL), and 3.69% and 4.40% in high-dose cefotaxime (20 µg/mL). The growth indices of rifampin + cefotaxime (2.19% and 2.19% at 2 µg/mL; 1.84% and 2.04% at 20 µg/mL cefotaxime) were similar to those obtained with rifampin alone (2.35% and 0.26%). Azithromycin+cefotaxime (11.06–14.63%) showed higher growth indices than azithromycin alone; this suggests that this combination may be antagonistic.

Conclusions : The anti-*Orientia* efficacies of doxycycline+rifampin, doxycycline+cefotaxime, and rifampin+cefotaxime were not antagonistic. The efficacy of the azithromycin+cefotaxime combination needs to be confirmed by more sensitive methods to exclude the possibility of antagonistic interactions between the antibiotics.

Key Words : *Orientia tsutsugamushi*, Scrub typhus, Doxycycline, Azithromycin, Rifampin, Cefotaxime, Combination drug therapy

Submitted : 4 August 2008, Accepted : 22 October 2008
 Corresponding author : Moon-Hyun Chung, M.D.
 Department of Internal Medicine, Inha University Hospital
 Shinheung-dong, Jung-gu, Incheon 400-712, Korea
 Tel : +82-32-890-2202, Fax : +82-32-882-6578
 E-mail : mhchungid@paran.com

서 론

*Orientia tsutsugamushi*에서 doxycycline에 대한 저감수

성이 보고되면서(1), 쓰쓰가무시병 치료가 과거보다는 어려워졌다. 일부 연구에서 azithromycin (2, 3)이나 rifampin (4)도 치료 효과가 있음이 증명되었고, 이보다 더 우수한 약제는 아직 증명되지 않았으므로(5), 당분간 기존에 사용되던 항균제를 사용하는 것이 치료의 주축이 되리라 생각한다. 항균제들의 조합도 생각해 볼 수 있으나, 병용 치료 시 효과에 대해서는 연구가 별로 없다. 실험실 연구는 보고된 적이 없으며, 임상 연구로는 doxycycline + rifampin 병용이 연구되었다(4). 이 연구에서 doxycycline과 rifampin의 병용 사용이 해열까지 시간이 더 길었다고 하여 길항작용의 가능성도 고려를 해야 하나, 2가지 이상 항균제를 동시에 사용하면 길항작용 외에도 약제간 상호 작용이나 부작용이 더 흔해지므로 효과가 낮다고 평가될 수 있다.

한편, 다른 이유로 이전부터 쓰쓰가무시병 치료에서 항균제 병용 요법을 사용하곤 했는데, 쓰쓰가무시병에서 쇼크나 폐렴이 동반될 때 쓰쓰가무시병의 합병증인지 쓰쓰가무시병에 박테리아 감염이 동반된 것인지 구분이 어려워 항균제를 병용해서 사용했다. 또한 쓰쓰가무시병이 지역사회 발생 폐렴으로 발생하는 경우에도 처음에는 원인균 진단이 불분명하므로 β -lactam계 항균제와 macrolide계 항균제를 투여하게 된다(6).

이상과 같은 이유로 쓰쓰가무시병 치료를 위해 2가지 이상 항균제를 사용하게 되는데, 추가된 항균제가 doxycycline의 *O. tsutsugamushi* 치료에 미치는 영향에 대해서는 연구가 적었다. 임상 연구가 더 진행되지 않을 것이라면 실험실 연구가 도움이 될 수 있지만 현재까지 병용 요법 효과를 결정하는데 도움이 되는 실험은 보고된 적이 없다. 이에 저자들은 임상에서 사용이 예상되는 항균제들의 조합이 포함된 배지에 *O. tsutsugamushi*를 배양하여 균 억제 정도를 측정하였다.

재료 및 방법

실험의 개요를 간략히 기술하면 *O. tsutsugamushi* Boryong주를 사람 배꼽정맥 유래 내피세포주(human umbilical vein-derived endothelial cell line)인 EDV304 세포에 감염시킨 후, 이를 단클론항체인 FS15로 염색을 하여 유세포 분석법(flow cytometry assay)으로 억제정도를 측정하는 것이다(7).

6-well plate에 ECV304 세포를 배양한 후 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 M199 medium으로 유지하다가, *O. tsutsugamushi* 균주를 접종하였다. 감염되고 3일된 ECV304 단층(monolayer)을 떼어낸 후 유리구슬(glass

bead)로 2번 갈아 얻은 상청액 9-10 mL 중에서 1mL씩 접종하였다. 한 번에 모든 항균제와 항균제 조합의 항균 효과를 검사하지 못하고, 여러 번에 걸쳐 실험을 하여, 감염량을 일정하게 할 수가 없었다. 접종을 시키고 3시간 후, 항균제가 포함된 새로운 배지로 교환하였다. 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 3-5일 배양하였다. Doxycycline (0.1 μ g/mL), azithromycin (0.1 μ g/mL), rifampin (0.0125 μ g/mL)의 농도는 이전 실험에서 측정한 최소억제농도를 사용하였다(5). Doxycycline + rifampin, doxycycline + cefotaxime, azithromycin + cefotaxime, rifampin + cefotaxime의 조합을 만들어 배양을 한 후 성장지수를 비교하였다. 배지에서 최종 농도가 doxycycline 0.1 μ g/mL, azithromycin 0.1 μ g/mL, rifampin 0.0125 μ g/mL가 되게 하였고, cefotaxime 농도는 2 μ g/mL과 20 μ g/mL로 실험을 하여 농도가 높은 부위와 농도가 낮은 감염부위의 상황을 재현하였다.

유세포 분석법은 감염된 ECV304 세포주 단층을 트립신(trypsin)으로 처리한 후, 인산염완충식염수(PBS)로 세척하고 300×g에서 5분간 원심분리하였다. 얼음 위에서 70% 에탄올로 1시간 고정한 후, 유세포 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 유세포 분석 시, 인산염완충식염수로 세척 후 FITC-conjugated FS15로 반응시킨 후 flow cytometer (Becton Dickinson, Mansfield, MA, U.S.A.)로 분석하였다. 감염된 전체 균 수를 계산하기 위해 형광이 양성인 세포 수(infected cell, %)에 평균 형광 정도(mean fluorescence intensity)를 곱하여, 성장 지수(growth index)로 표현하였다. 항균제가 포함되지 않은 배지에서 키운 경우의 성장 지수를 100으로 하여 항균제 처리를 한 배지에서 보인 성장 지수를 비율로 환산하여 백분율(%)로 나타냈다. 성장 지수 10% 이하를 항균제로 완전히 억제된 것으로 정의하였다.

FS15는 *O. tsutsugamushi* 외막의 56-kDa 단백질에 반응하는 단클론항체로, Boryong, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, AFSC-4 등에 반응하고 Gilliam, TA678, TA716 혈청형과는 반응을 하지 않는 항체이다. Boryong주에 대해 검사했을 때 다른 단클론 항체에 비해 형광이 강하여 유세포 분석에 사용하였다.

결 과

Doxycycline 0.1 μ g/mL에 단독 배양 시 성장지수는 4.67%와 0.52%, rifampin 0.0125 μ g/mL로 단독 배양 시 2.35%와 0.26%였고, doxycycline + rifampin은 0.10%와 0.10%로 doxycycline 또는 rifampin 단독과 비슷하거나 약간 낮아, doxycycline과 rifampin 병용은 길항효과가 아닌 것으로 판

Doxycycline에 cefotaxime을 병용했을 때 *Orientia*의 억제 정도는 cefotaxime 용량($2\text{ }\mu\text{g/mL}$, $20\text{ }\mu\text{g/mL}$)과 관계없이 3.7-4.4%로 doxycycline 단독 사용(4.67%와 0.52%)과 비슷하였다.

Rifampin과 cefotaxime (2, 20 $\mu\text{g/mL}$) 병용도 1.84-2.19 %로, rifampin 단독 배양 시 성장지수(2.35%, 0.26%)에 비해 차이가 없었다.

고찰

다. 병용 요법의 열등한 효과가 길항효과 때문인지 다른 원인에 의한 것인지는 밝혀지지 않았다(4). 이번 실험에서는 다른 변수를 배제할 수 있었기에 doxycycline + rifampin 조합의 *O. tsutsugamushi*에 대한 항균력만을 조사할 수 있었으며, 결과를 보면 doxycycline + rifampin 조합은 doxycycline이나 rifampin 단독 사용과 비교해서 항균력에 차이가 없었다. 따라서 항균제의 길항 효과보다는 다른 원인 때문에 해열이 늦었던 것으로 생각된다. Rifampin은 부작용이 다양한 항균제로, 과민 반응에 의한 발열 외에도 약물 대사에 관련되어 glucocorticoid 농도를 떨어Em린다. 부신결절 부족(adrenocortical insufficiency)도 발열의 원인일 수 있으며, rifampin의 단기간 사용에서 이런 내분비계 부작용이 문제되지는 않겠지만 환자군에 대한 정보가 부족한 상황이므로 이런 가능성을 완전히 배제하기는 어렵다. 타일랜드에서 시행된 rifampin의 쯔쯔가무시병 치료 효과 연구에서 보면, rifampin 600 mg 투여군에서 3%에서, 900 mg 투여군에서 16%에서 부작용이 발생하였고, 설명이 되지 않는 발열의 빈도도 흔했다. 따라서 이런 부작용과 원인 규명이 되지 않은 발열이 doxycycline + rifampin 군에서도 발생했으리라 생각되며, 해열이 지연되었던 이유도 항균력이 약한 것보다는 rifampin의 약리작용 또는 부작용으로 열이 난 것을 치료 반응이 늦은 것이라고 해석했으리라 생각한다. 환자군이 달라지면 부작용의 빈도가 달라질 수 있으므로 doxycycline + rifampin의 조합을 한국 사람에게 사용해보는 것이 금기는 아닐 것으로 생각된다. 하지만 rifampin 치료는 결핵이 흔한 지역에서는 rifampin에 대한 내성 증가에 관여할 수 있으므로 doxycycline + rifampin의 쯔쯔가무시병 치료에서 상승 효과가 분명하지 않은 상태에서 구대여 사용할 이유는 없으리라 생각한다.

		Growth index (%)	
		1st test	2nd test
Doxycycline (0.1 $\mu\text{g/mL}$)		4.67	0.52
Rifampin (0.0125 $\mu\text{g/mL}$)		2.35	0.26
Cefotaxime (2 $\mu\text{g/mL}$)		87.60	
Azithromycin (0.1 $\mu\text{g/mL}$)		7.54	
Doxycycline (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	+ rifampin (0.0125 $\mu\text{g/mL}$)	0.10	0.10
Doxycycline (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	+ cefotaxime (2 $\mu\text{g/mL}$)	3.99	3.65
	+ cefotaxime (20 $\mu\text{g/mL}$)	3.69	4.40
Azithromycin (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	+ cefotaxime (2 $\mu\text{g/mL}$)	14.63	13.37
	+ cefotaxime (20 $\mu\text{g/mL}$)	11.06	11.61
Rifampin (0.0125 $\mu\text{g/mL}$)	+ cefotaxime (2 $\mu\text{g/mL}$)	2.19	2.19
	+ cefotaxime (20 $\mu\text{g/mL}$)	1.84	2.04

른 항균제의 병용을 더 많이 사용하며, 쯔쯔가무시병을 의심하지 못해 원인불명열로 치료할 때에는 말할 것도 없고, 쯔쯔가무시병으로 진단된 경우에도 쇼크나 폐렴이 동반된 경우 박테리아 감염이 동반되었을 가능성이 있으므로 doxycycline에 β -lactam계 항균제 등을 추가하였다. 이럴 때 우려되는 사항은 살균 항균제인 β -lactam계 항균제와 정균 항균제인 doxycycline 또는 azithromycin을 병용했을 때, 과거 *S. pneumoniae* 수막염에서 보였던 길항 효과(8)가 *Orientia*에서도 나타나는지 여부이다. 이런 가능성으로, doxycycline, azithromycin, rifampin, cefotaxime을 선정하여 각각의 항균력과 항균제 조합의 효과를 조사하였다. 결과를 보면 임상에서 흔히 사용하는 조합인 doxycycline + cefotaxime은 *O. tsutsugamushi*에 대해 길항작용을 보이지 않아, 쇼크나 폐렴이 동반된 쯔쯔가무시병에서 길항작용을 우려해 사용을 꺼릴 필요는 없으리라 생각한다.

Azithromycin과 cefotaxime의 병용은 성장 지수가 높게 나와 검사 방법 상의 문제인지 길항작용인지 구분이 어려웠다. Azithromycin은 세포내 농도가 높은 항균제로 실험에 사용한 세포의 종류나 배지의 pH에 따라 실험실에서 측정된 항균력이 큰 차이를 보인다. Cefotaxime이 azithromycin의 세포내 축적에 영향을 미쳤거나 배지의 pH를 낮추게 되면 azithromycin+cefotaxime의 효과가 azithromycin 단독보다 낮게 나오게 된다. 폐렴으로 발현한 쯔쯔가무시병에서 azithromycin+cefotaxime에 반응이 좋은 예가 있기는 하지만, 발병 2일째 치료한 것이므로 일반적인 쯔쯔가무시병 예를 반영하였다고는 할 수 없다(6). 앞으로 azithromycin의 검사실 효과를 실험할 때에는 이런 요인들에 대해서도 감안을 해서 실험을 하는 것이 필요하다.

이번 실험의 단점은, 이번 실험에 사용한 유세포분석법은 아직 정량화된 검사가 아니어서 10% 정도의 오차는 감안을 해야 하므로, 성장지수가 10% 이내로 차이가 나는 것은 항균력의 차이도 있지만 검사 방법에 의한 변수로도 가능하다. 특히 이번 실험과 같이 한 가지 항균제의 효과가 우수하여 이미 90%이상 억제가 되면 다른 항균제의 영향을 평가하기가 어렵다. Doxycycline+cefotaxime, rifampin+cefotaxime, doxycycline+rifampin 조합이 doxycycline이나 rifampin 단독에 비해 성장지수가 약간 차이가 나지만, 이것이 상승작용 또는 길항작용인지는 확신할 수 없었다. Doxycycline+rifampin의 병용은 임상 연구가 중단될 정도로 효과가 열등했으므로 이 정도 민감도의 실험으로도 doxycycline + rifampin 조합의 열등성이 증명되리라 예상하였으나 결과는 예상과 달랐고, 적어도 임상적으로 의미가 있는 길항작용은 없으리라 생각한다. 현재의 검사 방법에 제한점

이 있고, 검사실 내성과 임상적 내성이 관련되는지가 밝혀지지 않았으므로 이번 결과를 임상에 적용할 때에는 주의를 요한다.

이번 연구에 사용한 항균제들의 농도는 이전 연구에서 각 항균제의 최소억제농도로 밝혀진 농도를 사용하였고(5), 이 농도는 상용량을 투여했을 때 환자에서 얻는 혈중 농도보다는 낮은 농도이다. 농도가 높으면 효과가 미약한 항균제도 항균력을 보이기에 병합 요법의 효과를 알기가 어려울 것이라 생각했기 때문이며, doxycycline 치료가 실패하거나 치료 후 재발하는 이유가 혈액에 있는 *Orientia*보다는 항균제가 침투하기 어려운 부위에 *Orientia*가 남아 있다가 재증식을 하면서 증상을 일으킬 가능성이 높으리라 생각하였고 이런 부위는 대개 농도가 더 낮기 때문이기에 낮은 농도로 검사하였다. 또한 앞으로 doxycycline 저감수성 *O. tsutsugamushi* 감염이 더 문제가 된다면 저감수성 주는 최소억제 농도가 높기에 우리가 상용 용량을 투여해서 얻는 농도도 저감수성 주에게는 적은 용량일 것이므로 이번 실험 모델과 비슷할 것으로 생각하였다. 농도가 달라지는데 따라 다른 결과가 나올지에 대해서는 앞으로 연구가 필요하다.

정리하면, 방법에 제한점이 있으나, 이번 연구 결과를 보면, doxycycline + cefotaxime이나 doxycycline + rifampin 조합은 doxycycline이나 rifampin 단독 치료와 억제 정도에서 차이가 없어 길항작용이나 상승작용은 없을 것으로 생각한다. Azithromycin과 cefotaxime 병용 시 성장 지수가 증가했으며, 검사 상 편차인지 길항작용인지를 구분하기는 어려웠고, 다른 검사 방법으로 구분해야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Jongsakul K, Teja-Isavadharm P, Bhodhidatta D, Corcoran KD, Dasch GA, Strickman D. Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand. *Lancet* 348:86-9, 1996
- 2) Kim YS, Choi SY, Lee MS, Cheung DR, Kim EO, Woo JH, Ryu JS. Clinical and molecular biological investigation of therapeutic modalities and treatment duration of tsutsugamushi disease (scrub typhus). *J Korean Soc Chemother* 17:385-93, 1999
- 3) Chung MH, Han SW, Choi MG, Chang WH, Pai HJ, Shin HS, Jung HJ, Kang MH, Jung JY. Comparison of a 3-day course of azithromycin with doxycycline for the treatment of scrub typhus. *Korean J Infect Dis* 32:433-8, 2000
- 4) Watt G, Kantipong P, Jongsakul K, Watcharapichat

- P, Phulsuksombati D, Strickman D. Doxycycline and rifampicin for mild scrub-typhus infections in northern Thailand: a randomised trial. *Lancet* 356:1057-61, 2000
- 5) Kim ES, Kim MK, Lee HM, Chung MH, Lee JS, Park JE, Kang JS. In vitro antibiotic susceptibility of *Orientia tsutsugamushi* strain Boryong measured by flow cytometry. *Infect Chemother* 40:212-7, 2008
 - 6) Park SD, Chung MH, Lee HM, Kim MK, Kang JS. A case of scrub typhus in summer presenting as atypical pneumonia. *Infect Chemother* 40:241-5, 2008
 - 7) Kim MJ, Kim MK, Kang JS. Improved antibiotic susceptibility test of *Orientia tsutsugamushi* by flow cytometry using monoclonal antibody. *J Korean Med Sci* 22:1-6, 2007
 - 8) Lepper MH, Dowling HF. Treatment of pneumococcal meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin; studies including observations on an apparent antagonism between penicillin and aureomycin. *AMA Arch Intern Med* 88:489-94, 1951