

Nalidixic acid 내성 장티푸스균에 대한 항생제 시간-살균 연구

조선대학교 의과대학 내과학교실¹, 전남대학교 응급의학과교실²
 김동민¹ · 윤나라¹ · 정종훈¹ · 류현호²

Time Kill Studies of Antibiotics against a Nalidixic Acid Resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi

Dong-Min Kim, M.D.¹, Na Ra Yun, M.D.¹, Jong Hoon Chung, M.D.¹, and Hyun Ho Ryu, M.D.²

¹Department of Internal Medicine, Chosun University College of Medicine, Gwangju,

²Department of Emergency Medicine, Chonnam University Hospital, Korea

Background : We recently encountered a case of typhoid fever in a patient who visited us after travelling India. The patient received ciprofloxacin therapy, but developed typhoid pneumonia and typhoid hepatitis, and nalidixic acid resistance *Salmonella* Typhi (NARST) was identified. The aim of this study was to assess the *in vitro* efficacy of several antimicrobial combinations, which are commonly used in clinical practice.

Materials and Methods : Time-kill studies were performed for a clinical NARST strain to evaluate synergy. Synergy was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ decrease (100-fold drop) in CFU per mL at 24 hours by a drug combination compared to the most active constituent.

Results : The combination regimen of cefotaxime plus ciprofloxacin significantly reduced the bacterial counts ($>3 \log$ CFU) at 3/4 MIC and at 24 hours compared to the ciprofloxacin or cefotaxime alone and showed synergistic effect against a NARST strain.

Conclusions : In conclusion, our time-kill studies showed that ciprofloxacin plus cefotaxime was the best *in vitro* combination against a NARST. This combination may improve efficacy compared to fluoroquinolone alone in typhoid fever patient with NARST. Time kill studies with more NARST strains and clinical studies are required to test the relevance of our findings

Key Words : Typhoid fever, *Salmonella* Typhi, Cefotaxime, Ciprofloxacin.

서 론

장티푸스는 *Salmonella enterica* serotype Typhi에 의한 전신적 감염 질환이다(1). 국내의 장티푸스 발생은 위생상태가 좋아짐에 따라 감소하였으나 아시아와 아프리카의 개발도상국에서 장티푸스는 아직도 상당히 흔한 질환이며 때때로 치명적인 질환이다. Chloramphenicol에 내성을 보이는 균주가 출현한 이래 ciprofloxacin이 일차 치료약제로 사

용되어 왔다. 그러나 1997년 이후부터 베트남, 타지키스탄, 영국, 인도 등에서 quinolones 항균제의 모체인 nalidixic acid 내성 균(nalidixic acid-resistant *Salmonella* Typhi, NARST)에 의한 감염 증례가 보고되었다(2). NARST에 감염된 환자에서 항생제 감수성 검사상 fluoroquinolone에 감수성임에도 불구하고 임상적으로 quinolones으로 치료 시 치료 반응이 지연되거나 치료 실패가 초래될 수 있다(3). 이러한 NARST 감염에 대한 치료법은 고용량의 fluoroquinolone을 오래 투여하거나, 3세대 cephalosporin이나 azithromycin을 단독 투여하는 방법, 그리고 두 가지 약제의 병합 투여를 고려해 볼 수 있다(4). 그러나 아직까지 이러한 항생제의 병합요법의 효과에 대한 연구는 시행된 바 없다. 저자 등은 최근 인도 여행 후 발열이 지속되어 장티

Submitted 18 June 2008, Accepted 12 August 2008

Correspondence : Jong Hoon Chung, M.D.

Department of Internal Medicine, Chosun University College of Medicine

588 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-717, Korea

Tel : +82-62-220-3016, Fax : +82-62-234-9653

E-mail : jhchung@mail.chosun.ac.kr

푸스 의심 하에 ciprofloxacin을 투여 받았으나 항생제 투여 도중에 장티푸스 폐렴과 간염의 합병증이 발생하였고, 혈액 배양 검사상 NARST로 확인된 증례를 경험하였다.

본 연구의 목적은 NARST의 치료로 ciprofloxacin과 cefotaxime의 병합과 ciprofloxacin, cefotaxime, azithromycin 각각의 단독의 효과를 time-kill studies를 통하여 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 증례

24세 여자환자가 내원 1개월 전 인도여행 중 거리에서 즉석 조제한 유제품을 섭취하였고 복통과 고열을 동반한 설사가 발생하였으며 약물치료 후 증상 호전되었으나 귀국 후(내원 2주일전) 다시 39℃에 이르는 고열과 설사가 재발되어서 내원하였다. 입원 당시 급성병색이었으며 체온은 39℃, 맥박100회/분, 혈압 100/60 mmHg, 호흡수 20회/분이었다. 흉부청진상 심잡음 및 호흡음 이상이나 감소는 없었다. 복부 진찰에서 간이 1횡지 촉진되었고 배꼽주위 압통이 있었다. 입원 시 혈액 검사상 혈색소 11.0 g/dL, 적혈구 용적률 31.8 %, 백혈구 8,420/mm³이었고 혈액 생화학 검사는 알부민 2.95 g/dL, 빌리루빈 0.76 mg/dl, ALP 68 IU/L, AST 49.3 IU/L, ALT 40.7 IU/L, creatinine 0.86 mg/dL이었다. Widal test 상 *Salmonella* Typhi O titer 1:20, H titer 1:320이었다. HBsAg, Anti HCV, HAV IgM 모두 음성하였고 HBsAb는 양성이었다. 입원 시 시행한 흉부, 복부 방사선검사에서는 특이소견 관찰되지 않았다(Fig. 1). 환자의 병력, 신체검사, 검사실 소견으로 장티푸스가 의심되어 혈액 배양 검사 후 ciprofloxacin을 3일간 투여하였으나 고열 및 복통이 지속되었다. 혈액 배양 검사상 *Salmonella* Typhi가 동정

되었고, VITEK II (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) 감수성 검사상 cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole에 감수성을 보였다. 입원 4일째 환자는 호흡곤란 및 마른 기침을 호소하였으며 흉부 청진상 양측 폐 기저부에 호흡음이 감소되었고 악설음이 청진되었다. 흉부 방사선 촬영 검사상 양측 폐야에 폐렴 소견 및 다량의 흉수가 관찰되었다. 흉강 천자술을 시행하여 700 mL의 흉수를 뽑았다. 흉수는 약간 혼탁한 담황색으로 pH는 7.45, 백혈구 237/mm³ 이었고 이중 호중구가 60%, 임파구가 40%였다. 단백질은 2.36 g/dL, 당은 138 mg/dL, LDH는 417 IU/L이었다. 흉수성상은 삼출액이었으며(LDH ratio: 0.79) 흉수에서 특별히 동정되는 균은 없었다. 이와 함께 내원 4일째 시행한 생화학 검사상 AST/ALT: 260/205 U/L, T-bilirubin: 5.1 mg/dL로 상승하였다. Ciprofloxacin 투여에도 불구하고 환자의 증상이 악화되어 NARST 감염 의심 하에 azithromycin을 투여하였다. 혈액에서 동정된 *Salmonella* Typhi 이외에도 대변 배양 검사도 *Salmonella* Typhi가 동정되었으며, 혈액과 대변 배양검사상 동정된 균으로 nalidixic acid 디스크 확산법 검사상 둘 다 NARST 임이 확인되었다. Ciprofloxacin 투여와 함께 azithromycin을 추가 투여 후 해열되었고, 장티푸스 폐렴 및 간염도 호전되어 퇴원하였다.

2. 균주

증례 보고한 NARST환자의 혈액에서 배양된 *Salmonella* Typhi 분리주를 영하 70℃에 보관하였고, 이 균주를 이용하여 최소억제농도(MIC)측정과 time-kill study를 수행하였다.

3. 항생제 감수성 검사

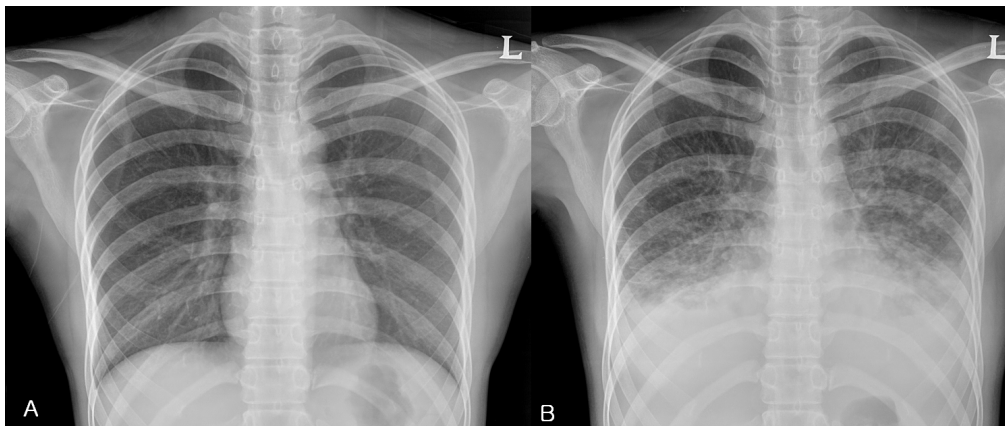


Figure 1. Chest images of the patient with typhoid fever. A) Chest PA image on admission. B) Chest PA on hospital day 4, as the patient presented with dyspnea and dry cough.

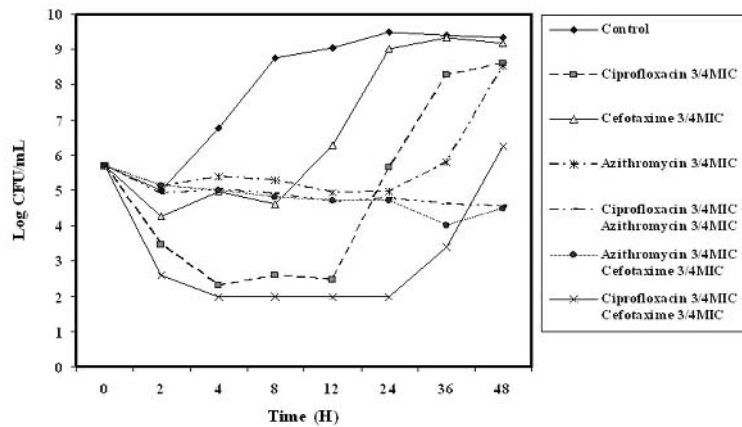


Figure 2. Time-kill curves for a clinical isolate of *Salmonella* Typhi after incubation with cefotaxime, azithromycin or ciprofloxacin alone and the combination of cefotaxime plus ciprofloxacin, azithromycin plus cefotaxime and azithromycin plus ciprofloxacin at 3/4 MIC.

NARST 임상 균주에 대해 제조회사로부터 제공 받은 원액 분말을 이용하여 최소억제농도를 측정하였다. Cefotaxime (Handok-Aventis, Korea), ciprofloxacin (Bayer HealthCare, Korea), azithromycin (Pfizer Inc. Groton). 각각의 항생제의 최소억제농도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 기초하여(5, 6), 최소억제농도(MIC)는 배양된 세균의 육안적 증식을 억제할 수 있는 항균제의 가장 낮은 농도로 정의하였다. *Escherichia coli* ATCC 25922가 대조균으로 이용되었다. 추가적으로 NARST 임상 균주에 대해 Kirby-Bauer 방법에 따라 디스크 확산법을 시행하여 nalidixic acid, ampicillin, cefepime, cefotetan, imipenem, chloramphenicol, gentamicin, ticarcillin, trimethoprim/sulphamethoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, cefotaxime, tetracycline 항생제에 대한 감수성 검사를 확인하였다(5, 6).

4. Time-kill studies

Time-kill study는 임상 분리주에 대한 항균제의 상승작용을 알아보기 위해 수행하였다(7, 8). 세균은 각각 다른 농도의 항생제를 넣은 250 mL 삼각플라스크 안에 50 mL의 신선한 Mueller-Hinton 액체배지(MHB)에 약 5.0×10^5 CFU/mL로 표준화된 세포 현탁액으로 희석되었다. 시험관 내에서 항생제의 병합 효과를 확인하기 위해 ciprofloxacin, cefotaxime, azithromycin의 각각의 3/4 최소억제농도(MIC)를 병합 후 성장 곡선을 확인하였다. 각각의 플라스크는 220 rpm으로 흔들리는 배양기에서 35°C 온도로 배양되었다. 세균의 생존 곡선은 각각 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 시간에 Mueller-Hinton Agar (Difco Laboratories)에서 자

란 세균 집락을 측정하였다. 상승 효과(synergy)는 time kill studies에서 24시간 후 단독 투여 항생제 중 효과적인 항생제와 비교하여 병합 투여 시 mL당 집락수가 $2 \log_{10}$ 이상 감소한 경우로 정의하였다. 모든 실험은 최소한 두 번 이상 시행되었다.

결 과

1. 최소억제농도

Microdilution방법으로 시행한 환자의 *Salmonella* Typhi 균주에 대한 ciprofloxacin의 최소억제농도는 $0.244 \mu\text{g/mL}$ 이고, cefotaxime과 azithromycin은 $0.061 \mu\text{g/mL}$, $3.9 \mu\text{g/mL}$ 였다. Kirby-Bauer 디스크 확산법에 검사상 *Salmonella* Typhi의 임상 균주는 amikacin, cephalothin, cefazolin, cefepime, cefotetan, imipenem, chloramphenicol, gentamicin, ticarcillin, trimethoprim/sulphamethoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, cefotaxime, tetracycline에 감수성을 보였으나, nalidixic acid와 ampicillin에 내성을 보였다.

2. Time-kill studies

Time-kill study 검사상 cefotaxime 3/4 최소억제농도인 $0.046 \mu\text{g/mL}$ 에서 2시간에 억제 효과를 보였다. 그러나 이후 다시 증식하여 24시간에는 항생제 투여하지 않은 대조군(control) 수준까지 증식되었다. Ciprofloxacin $0.183 \mu\text{g/mL}$ (3/4최소억제농도)에서 12시간에 억제효과를 보였으며, 이후 다시 증식하여 24시간에 최초 접종 시점 수준에 도달하였다. Ciprofloxacin과 cefotaxime의 세균 억제 효과는 항생제 투여 농도를 증량함에 따라 증식이 더욱 억제되는

농도 의존 경향을 보였다(data not shown).

Cefotaxime과 ciprofloxacin의 각각 3/4 최소억제농도 병합 투여 시 처음 접종시점 보다 3 log CFU 이상으로 현저하게 세균수가 감소되는 결과를 보여주었고, 24시간에 ciprofloxacin이나 cefotaxime의 단독요법에 비하여 3 log CFU 이상으로 크게 감소하였으며 이러한 효과는 48시간 이상 지속됨이 확인되었다(Fig. 2). 즉 ciprofloxacin과 cefotaxime 3/4 최소억제농도 병합 시 효과적으로 *Salmonella* Typhi를 억제시켰으며, 상승효과를 확인할 수 있었다.

Azithromycin과 ciprofloxacin의 병합요법이나 azithromycin과 cefotaxime의 병합시 24시간에 상승효과를 확인할 수 없었다(Fig. 2).

고 찰

Quinolones내성은 주로 DNA gyrase의 돌연변이와 연관되어 있다. DNA gyrase에 추가적으로 돌연변이가 발생하면 NARST에 감염된 환자에서 fluoroquinolone에 내성이 발생할 수 있음이 보고되었다(9, 10). *E. coli* 연구에서 gyrA 유전자에서 돌연변이가 추가로 발생시 ciprofloxacin의 최소억제농도가 0.5에서 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가됨이 보고된 바 있다(11). NARST 감염 환자에서 fluoroquinolone 디스크 감수성 검사에서 감수성임이 확인된 경우에도 fluoroquinolone 투여 시 임상적으로 발열의 지속이나 치료 실패가 초래될 수 있으며, nalidixic acid에 감수성인 경우 97%의 치유를 보이는 반면, NARST인 경우는 50%로 치유율이 낮음이 보고되었다(9, 11). 다행히 이런 내성 균주들이 ceftriaxone이나 azithromycin에는 감수성을 보이나, 이러한 항생제로 투여한 경우에도 임상적 치료 반응이 느려, 발열 소실 시간은 7일이 넘고, 치료 실패율도 20% 이상임이 보고되었다(12). Azithromycin을 투여 받은 장티푸스 환자는 azithromycin의 세포 내 농도가 혈청 내 농도에 비해 100배 이상 높아, 혈액에서 azithromycin 농도가 낮은 단점이 있어 장티푸스 환자에서 세포 외 균혈증으로 인한 증상이 지속될 수 있으며, 실제 일부 환자에서 항생제 투여에도 불구하고 균혈증이 지속되는 원인으로 알려져 있어 추가적으로 효과적인 항생제 치료를 필요로 하는 경우가 있다(3, 13). 또한 *Salmonella*종에서 azithromycin 치료농도 이하의 농도에 노출되었을 때 azithromycin 내성이 발생할 수 있다(3). 그러므로 azithromycin은 주의 하여 사용되어야 하며, 치료 효과를 평가하기 위해 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

Ceftriaxone으로 치료받은 장티푸스 환자에서 5-15%의

재발율이 보고되었으며(14), 방글라데시에서 ceftriaxone에 고도 내성을 보이는 *Salmonella* Typhi의 분리주가 이미 보고된 바 있다(15). 그러므로 NARST를 효과적으로 치료하기 위해서 장티푸스 환자에서 fluoroquinolone 투여와 함께 fluoroquinolone과 표적이 다른 항생제를 병합투여 하는 것이 fluoroquinolone의 단독 투여보다 치료 효과를 상승시킬 수 있으며, 이는 또한 잠재적으로 fluoroquinolone 내성 돌연변이의 출현을 감소 시키는데도 효과적일 수 있어 이에 대한 추가 연구가 필요하리라 사료된다.

다 약제 내성 및 nalidixic acid 내성을 보이는 합병증이 없는 베트남 장티푸스 환자를 대상으로 병합요법의 효능을 알아보는 임상 연구에서, ofloxacin 20 mg/kg/day로 7일 투여한 환자의 치료율은 64%를 보고하였고, ofloxacin 15 mg/kg/day 7일 투여와 azithromycin 10 mg/kg/day 3일 투여의 병합요법을 시행한 경우 76%의 치료율을 보였으며, azithromycin 10 mg/kg/day 7일 단독투여를 한 경우 82% 치료율을 보고하였다(3). 이 연구에서 저자들은 병합요법에서 azithromycin을 단지 3일만 투여하였고 ofloxacin의 투여 용량 또한 낮게 투여하였다. 그래서 단기간 azithromycin 투여 및 저 용량의 ofloxacin 투여로 인해 치료율의 효과를 정확히 평가하기는 어렵지만, azithromycin과 ofloxacin 병합요법 시 상승효과는 보이지 않았고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만 병합투여 시 ofloxacin 단독투여보다는 치료율이 높았다. 저자 등의 time-kill studies에서 azithromycin과 ciprofloxacin의 병합투여는 상승작용을 보이지 않았다. 이는 베트남 장티푸스 환자를 대상으로 한 임상 연구에서 이 병합요법이 azithromycin 단독요법에 비하여 더 효과적이지 않은 이유를 설명할 수 있으리라 사료된다.

NARST에 의한 감염 시 해열에 평균 일주일이 걸리며, 대변 내 보관 가능성이(stool carriage rate) 더 높아 내성균의 잠재적인 전파가능성이 높을 수 있어 효과적인 적절한 치료법이 절실한 상황이다. 우리의 time-kill study 연구 결과 ciprofloxacin과 cefotaxime 병합투여 시 상승효과(synergy)를 확인할 수 있었으며 이러한 상승효과가 48시간 이상 지속되는 것이 확인되었고, ciprofloxacin과 cefotaxime 병합의 효과가 azithromycin과 cefotaxime의 병합이나 azithromycin과 ciprofloxacin의 병합, cefotaxime, azithromycin, ciprofloxacin 각각의 단독에 비하여 우수한 결과를 보여 주었다. *Salmonella* Typhi 감염의 치료로서 ciprofloxacin과 cefotaxime의 병합의 상승효과에 대한 정확한 기전은 아직 알려지지 않다. 그렇지만 몇몇의 연구를 살펴보면, quinolone이 킬레이트제로 *E. coli*의 외벽에 작용하여 β -lactam 항생제의 투과성을 증가시킨다는 보고가 있다

(16-18). 추측건대, ciprofloxacin과 cefotaxime의 병합이 세포벽의 부분적 파괴를 일으킨 후 세포 내로 β -lactam 항생제의 확산이 용이해져서 상승효과를 보인다고 생각해 볼 수 있다. 중증의 장티푸스 환자에서 이 병합요법이 균혈증의 증상이 호전되는 시간을 단축시키는지, 대변 내 보균율을 낮추는지, fluoroquinolone 내성 돌연변이의 출현을 감소시키는지, 치사율을 감소시키는데 대해서는 더 많은 NATST 군주를 대상으로 한 실험연구 및 추가적인 임상 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, time-kill study를 통해 ciprofloxacin과 cefotaxime 병합 시 NARST 균주에 대하여 시험관 내 상승효과를 확인하였다. 이번 연구는 실제 임상에서 NARST에 의한 장티푸스환자의 치료에 있어 ciprofloxacin과 cefotaxime 병합 요법이 fluoroquinolone 단독투여와 비교하여 치료의 효과를 향상시킬 수 있는지, 내성 돌연변이의 출현을 감소시킬 수 있는지에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제시한 논문으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 조선 대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) Frenck RW Jr, Nakhla I, Sultan Y, Bassily SB, Girgis YF, David J, Butler TC, Girgis NI, Morsy M. Azithromycin versus ceftriaxone for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children. *Clin Infect Dis* 31:1134-8, 2000
- 2) Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA, Smith HR, Lacey S. Ciprofloxacin-resistant Salmonella typhi and treatment failure. *Lancet* 353:1590-1, 1999
- 3) Parry CM, Ho VA, Phuong le T, Bay PV, Lanh MN, Tung le T, Tham NT, Wain J, Hien TT, Farrar JJ. Randomized controlled comparison of ofloxacin, azithromycin, and an ofloxacin-azithromycin combination for treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* 51:819-25, 2007
- 4) Nkemngu NJ, Asonganyi ED, Njunda AL. Treatment failure in a typhoid patient infected with nalidixic acid resistant S. enterica serovar Typhi with reduced susceptibility to ciprofloxacin: a case report from Cameroon. *BMC Infect Dis* 5:49, 2005
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 8th ed. Approved standard M2-A8, NCCLS, Wayne, PA, 2003
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 6th ed. Approved standard M7-A6, NCCLS, Wayne, PA, 2003.
- 7) Chuang YC, Liu JW, Ko WC, Lin KY, Wu JJ, Huang KY. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against Vibrio vulnificus. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2214-7, 1997
- 8) George M, Eliopoulos RC, Moellering Jr: Antimicrobial combination. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. New York. p.338, Williams & Wilkins, 1996
- 9) Wain J, Hoa NT, Chinh NT, Vinh H, Everett MJ, Diep TS, Day NP, Solomon T, White NJ, Piddock LJ, Parry CM. Quinolone-resistant Salmonella typhi in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis* 25:1404-10, 1997
- 10) Truong QC, Ouabdesselam S, Hooper DC, Moreau NJ, Soussy CJ. Sequential mutations of gyrA in Escherichia coli associated with quinolone therapy. *J Antimicrob Chemother* 36:1055-9, 1995
- 11) Rupali P, Abraham OC, Jesudason MV, John TJ, Zachariah A, Sivaram S, Mathai D. Treatment failure in typhoid fever with ciprofloxacin susceptible Salmonella enterica serotype Typhi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49:1-3, 2004
- 12) White NJ, Parry CM. The treatment of typhoid fever. *Curr Opin Infect Dis* 9:298-302, 1996
- 13) Butler T, Frenck RW, Johnson RB, Khakhria R. In vitro effects of azithromycin on Salmonella typhi: early inhibition by concentrations less than the MIC and reduction of MIC by alkaline pH and small inocula. *J Antimicrob Chemother* 47:455-8, 2001
- 14) Frenck RW Jr, Nakhla I, Sultan Y, Bassily SB, Girgis YF, David J, Butler TC, Girgis NI, Morsy M. Azithromycin versus ceftriaxone for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children. *Clin Infect Dis* 31:1134-8, 2000
- 15) Saha SK, Talukder SY, Islam M, Saha S. A highly ceftriaxone-resistant Salmonella typhi in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 18:387, 1999
- 16) Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 32:438-42, 1998
- 17) Otsuki M, Nishino T. The synergic effects of quinolones and oral cephem antibiotics on Serratia marcescens. *J Antimicrob Chemother* 38:771-6, 1996
- 18) Kim DM, Lym Y, Jang SJ, Han H, Kim YG, Chung CH, Hong SP. In vitro efficacy of the combination of ciprofloxacin and cefotaxime against Vibrio vulnificus. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3489-91, 2005