

Methicillin 저항성 포도구균의 β -Lactam계 항생제 함유배지에서의 증식 양상

고신대학 의학부 미생물학교실
조명훈, 김광혁, 장명웅

Growth Patterns of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in β -Lactam Antibiotic Containing Muller-Hinton Broth

Myung Hoon Joh, Kwang Hyuk Kim, Myung Woong Chang

*Department of Microbiology
Kosin Medical College, Pusan, 602-702, Korea*

= Abstract =

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a major pathogen in patients with nosocomial or community-acquired infections.

In the present study, we examined the minimum inhibitory concentration (MIC) and maximum bactericidal concentration (MBC) of methicillin, oxacillin, cefatrizine and tetracycline on MRSA, then followed growth patterns of MRSA and formation of L-form at the respective MIC for various strains to elucidate the mechanism of paradoxical effect of penicillin antibiotics on MRSA.

Following results were obtained

1. In twenty strains of MRSA, the MBC of methicillin equal to MIC was 15%, the MBC two fold greater than MIC was 60%, the MBC three fold greater than MIC was 20% and the MBC four fold greater than MIC was 20%.
2. With oxacillin, the MBC with equal to MIC was 10%, the MBC two fold greater than MIC was 50%, the MBC three fold greater than MIC was 20% and the MBC four fold greater than MIC was 20%.
3. With cefatrizine, the MBC with equal to MIC was 10%, the MBC two fold greater than MIC was 60%, the MBC three

fold greater than MIC was 20% and the MBC four fold greater than MIC was 10%.

4. With tetracycline, the MBC with equal to MIC was 10%, the MBC two fold greater than MIC was 55%, the MBC three fold greater than MIC was 25% and the MBC four fold greater than MIC was 5%.
5. In all strains of MRSA showing a paradoxical effect of methicillin, growth was significantly more with 0.5xMIC than with 1xMIC in using Muller-Hinton.
6. In some strains of MRSA, the paradoxical effect was observed at 0.5xMIC in the 50% serum containing Muller-Hinton broth.
7. The paradoxical effects of oxacillin and cefatrizine occurred at 1xMIC in Muller-Hinton broth and at 0.5xMIC in 50% serum containing Muller-Hinton broth.
8. With tetracycline, the paradoxical effect was not observed both in Muller-Hinton broth and 50% containing Muller-Hinton broth.
9. MRSA strains formed L-form in the media containing 0.5xMIC of methicillin, oxacillin, cefatrizine containing agar, but not in tetracycline containing agar.

These results indicate that in some strains of MRSA paradoxical effects of methicillin, oxacillin, and cefatrizine can be observed at 0.5-1x MIC, and this is due to the formation of L-form bacteria.

Key Words : MRSA, β -lactam antifiotics, Growth pattern.

서 론

포도구균(*Staphylococcus aureus*)은 인체에서 가장 흔히 검출되는 세균중에 하나이며, 사람에게 감염되어 각종의 화농성염증을 일으키는 균으로 특히 병원내 감염의 15~20%를 차지하는 중요한 병원성 세균이다.^{11, 15, 33)}

포도상구균은 원래 penicillin에 감수성인 균종이었으나 penicillin의 사용 빈도가 증가되면서 균체가 penicillin을 분해하는 요소인 penicillinase 생성하는 능력을 획득하여 penicillin에 저항성인 변이균주가 출현하게 되

었다.^{46, 52, 53)} 국내에서 임상가검물로 부터 penicillin에 저항성인 포도구균의 분리빈도는 보고자에 따라 차이가 있으나 57%~85%로 높게 나타나고 있다.^{4, 5, 6, 33)}

이와같이 penicillin에 저항성인 포도구균의 출현빈도가 증가됨에 따라 penicillinase에 의해 분해되지 않는 반합성제재(semisynthetic)인 methicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin 등의 새로운 항생물질이 개발되었으나 이들 약제에 저항성인 포도구균이 다시 출현하게 되었다.^{19, 29, 36, 40, 47, 50)}

Methicillin등에 저항성인 포도구균 즉 methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

(MESA)가 1961년 영국에서 처음으로 분리 보고된 후 이탈리아, 독일, 미국, 오스트레일리아, 일본 한국등 전세계적으로 보고되고 있으며, 이 MRSA에 의한 감염증이 증가추세에 있어 이들균에 의한 감염증의 치료가 중요한 문제로 대두되고 있다.^{9,12,20,26,28,42,44,46)}

이들 MRSA는 oxacillin등의 저항성일 뿐만 아니라 제3세대 항생제인 cephalosporin 제제에도 내성을 나타내는 균주가 출현함으로써 이들균의 치료를 위한 항생제의 선택에 어려움을 주고있다.^{29,50)} 환자로 부터 MRSA의 분리 빈도는 보고자에 따라 차이가 많으나 국내에서 분리되는 포도구균의 약 40% 정도가 MRSA로 보고되고 있다.^{2,8,22)} 이들 MRSA에 대한 치료제로는 vacomycin, fusidic acid, rifapin, quinlone제제의 항생물질이 이용되고 있으나, MRSA는 다제내성인 균주가 많으며, 항균제나 배지의 염의 농도나 pH 등 환경에 따라 MRSA의 특성이 변하기 쉬우므로 정확히 MRSA를 구별해내기가 어려운 문제점이 있다.^{7,17,23,45,51)} MRSA는 homo-resistant와 heterorestant의 두가지로 나누고 있으며, 한 균주에서 증식된 균중 일부만이 methicillin등 penicillinase resistant penicillin (PRP)에 저항성을 나타내는 것을 heteroreistant또는 occult resistance라고 한다.^{25,30,43)}

MRSA의 β -lactam계 항생제에 대한 내성 획득기전은 명확히 규명되지는 않았으나 첫째 β -lactamase의 생성, 둘째 균체의 내인성 요인으로 β -lactam계 항생물질에 친화력이 낮은 penicillin binding protein(PBP)를 생성, 셋째 β -lactam계 항생물질에 대한 관용성 획득등으로 설명하고 있다.^{14,38)}

MRSA는 β -lactam계 항생제에 대하여 paradoxical effect를 나타내는 균주가 있는것으로 보고되고 있으며, 그 기전으로 構田등은 MRSA가 고농도의 항생물질이 첨가된 배지에서 배양될때 항생제에 친화성이 낮은 PBP-2를 유도생성하므로써 항생제에 의해 손상을 받지않고 증식이 가능하다고 보고하고 있다.^{32,46,51,54)}

그러나 이들 MRSA의 β -lactam계 항생제에 대한 paradoxical effect의 기전은 명확히 규명되지 않고 있으며, 이들균의 β -lactam계 항생제에 대한 최소발육억제농도(minimum inhibitory concentration : MIC)와 paradoxical effect와의 상호관계에 대하여 명확히 밝혀지지않고 있다. 따라서 MRSA의 효과적인 치료를 위한 기초자료로서 이들 MRSA에 대한 세균학적 제반 특성의 연구가 절실히 요구된다.

이에 본 연구에서는 환자로 부터 분리된 S. aureus중 MRSA를 선별하고, 이들 MRSA의 methicillin, oxacillin, cefatrin, tetracycline에 대한 MIC와 최소살균농도(minimum bactericidal concentration : MBC)를 조사하고, 각 균을 각각의 항생제에 대한 0.5xMIC, 1xMIC, 2xMIC, 4xMIC, 8xMIC농도의 항생제가 첨가된 배지에서 배양하면서 각 균의 증식곡선을 비교하고, L-form세균의 생성 유무를 조사하므로써 MRSA의 paradoxical effect와 MIC및 L-form 세균 형성과의 관계를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용균주 : 표준균주로는 S. aureus ATCC 25389주를 사용하여 대조균주로 하였으며, 1991년 3월 부터 1991년 12월 사이에 본 대학부속병원에 래원한 환자로 부터 분리된 균주를 mannitol salt agar DNase agar에 배양하여 형성된 집락은 Gram염색, 혈장응고 시험, novobiocin감수성시험들을 실시하여 S. aureus를 분리 동정하고, 이들 각 균주의 methicillin에 대한 MIC를 조사하여 MIC가 32 μ g/ml이상인 균주를 실험대상균주로 하였다.^{2,7,41)}

2. 사용배재 : S. aureus의 분리동정에는 mannitol salt agar DNase agar, S. aureus의 각종 항생제에 대한 MIC조사에는 Muller-Hinton broth를, 각균주의 증식양상의 관찰에는 Muller-Hinton broth와 50% 말혈청 첨가 Muller-Hinton 배지를 사용하였다. L-

form균의 배치는 Brain Heart Infusion broth (BHI)에 5% NaCl, 5% sucrose, 10% horse serum, 0.5% yeast extract, 1.5% agar, 각각의 항생물질을 각각의 농도로 첨가한 배지를 사용하였으며, 정상세균수의 산정을 위하여는 BHI 한천배지를 사용하였다.^{21,34,35,41)}

3. 사용약제 : Methicillin(Sigma, M1757, USA), Oxacillin(Sigma, 01002, USA), cefatrizine(Dong-A Co., Korea), tetracycline(Sigma, T3383, USA)등을 사용직전에 Muller-Hinton broth에 최고 농도가 4096 μ g/ml되게 녹인 다음 여과 멸균하고 이를 새로운 Muller-Hinton broth에 2배 계단희석법으로 희석하여 각 균의 MIC와 증식양상의 조사에 사용하였다.

4. S. aureus의 MIC측정 : S. aureus 표준균주와 환자로 부터 분리동정된 균주를 5ml의 Muller-Hinton broth에 접종하여 35 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양시킨 다음 흡광도를 McFarland No.1로 조정하였다. 이 균액을 5ml을 새로운 Muller-Hinton배지에 접종하여 4시간 배양시킨 다음 흡광도를 McFarland No. 0.5로 조정하고 이를 다시 10배 희석하여 접종균액으로 하였다.^{21,41)}

Methicillin등 각각의 항생물질은 최고농도가 4096 μ g/ml 되게 Muller-Hinton broth에 녹인 다음 여과 멸균하고, 200 μ l Muller-Hinton broth가 들어있는 96 well plate에서 2배 계단희석법으로 11계열의 희석한 다음 상기 균액을 well당 10 μ l씩 접종한 후 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 다음 균의 증식 유무를 육안적으로 관찰하여 균의 증식이 억제된 최대희석계열의 농도를 각 균종에 대한 각 항생물질의 MIC를 판정하였다.^{31,41)}

MIC농도 이상의 각 well의 균액을 각각 항생물질이 함유되지않은 Muller-Hinton배지에 접종하여 균의 집락 유무를 확인하여 균의 집락이 확인되지 않는 최대희석계열의 농도를 각 균종에 대한 각 항생물질의 MBC로 판정하였다.⁴¹⁾

5. S. aureus의 증식곡선 : 실험대상 S. aureus의 증식곡선은 Temperature Gradient Biophotorecorder(TGB : TN-112D : Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan)를 이용하여 기록하였다.^{9,13,16,24)}

기록은 각 12 chamber의 온도를 35 $^{\circ}$ C로 고정시키고, 1-6 chamber의 L-tube에는 Muller-Hinton broth를, 7-12 chamber에는 50% 말혈청을 첨가한 Muller-Hinton broth를 각각 5ml씩분주하고, 1,7번은 각 배지의 대조균으로 하고, 2-6, 8-12번에는 각각 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC 농도의 각 항생물질을 첨가한 다음 준비된 각 균액을 10 μ l씩 접종하였다. 흡광도 측정을 위한 광선의 파장은 660nm로 고정하고 균 접종 후 각 chamber의 흡광도를 "0"으로 조정한 다음 60시간까지 배양하면서 균의 증식에 따른 흡광도의 변화를 자동으로 기록하였다. 각 chamber당 흡광도를 3회 기록하는데 소요되는 시간은 3분으로 고정하고, 30분 간격으로 각 chamber의 흡광도를 기록하도록 조정하였다. chamber의 진탕속도는 1분간에 30회 진탕하도록 조정하여 사용하였다.

6. L-form균의 산정 : 각 항생물질이 각 농도로 함유된 배지에 상기와 동량의 균액을 접종하고 배양하면서 0, 6, 12, 24, 48시간 후에 각각의 균액을 0.1ml씩 취하여 BHI 한천 평판배지와 L-form 한천평판배지에 각각 접종하여 배양한 다음 집락수를 산정하여 정상균수와 L-form균수를 비교하였다.^{36,37,48)}

실험 성적

1. S. aureus의 MIC 및 MBC : 실험에 사용된 각 균주의 각 항생물질에 대한 MIC MBC를 검사한 성적은 표1과 같다.

환자에서 분리된 포도구균 20균주의 각 항생물질에 대한 MIC와 MBC는 표1에서와 같이 균주에 따라 상이하였다. 분리균주의 methicillin에 대한 MIC의 범위는 32 -1024

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration and minimum Bactericidal concentration of Methicillin, Oxacillin, Cefatrizine and Tetracycline against isolated Strains of *S. aureus*

S. aureus	MIC (ug/ml)				MBC (ug/ml)			
	Meth.	Oxac.	Cefa.	Tetr.	Meth.	Oxac.	Cefa.	Tetr.
4589	64	128	64	128	128	256	256	256
4724	1024	256	16	64	2048	516	32	128
4766	32	32	2	64	128	256	4	128
4817	64	32	2	16	128	256	4	64
1907	32	128	128	128	1024	256	256	256
8221	256	256	64	64	1024	512	256	128
8220	256	128	128	64	1024	1024	1024	512
4806	512	256	32	64	1024	512	64	64
4841	32	64	32	32	512	256	32	64
4873	512	512	128	2	1024	1024	512	4
6487	1024	512	—	64	2048	512	—	128
2521	1024	64	—	128	1024	128	—	256
6516	1024	512	—	8	1024	1024	—	128
6493	512	256	—	128	1024	512	—	128
6279	1024	512	—	128	2048	512	—	256
6351	128	9	—	256	512	128	—	512
6354	1024	1024	—	4	2048	2048	—	16
6063	512	256	—	4	1024	512	—	8
6146	512	256	—	2	1024	1024	—	4
6266	512	256	—	2	512	512	—	8
25389	1	2	0.5	0.5	2	4	1	1

Meth. : Methicillin, Oxac. : Oxacillin, Cefa. : Cefatrizine.

Tetr. : Tetracycline, — : Not tested

$\mu\text{g/ml}$ 이었으며, MBC의 범위는 128 -2048 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

Oxacillin에 대한 MIC범위는 32 -1024 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, MBC범위는 128 -2048 $\mu\text{g/ml}$ 이었다 cefatrizine에 대한 MIC의 범위는 2-128 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, MBC범위는 4-512 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

분리균주 20주중 에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우가 3주(15%), MBC가 MIC의 2배인 경우가 12주(60%), MBC가 MIC의 3배인 경우가 3주(15%), MBC가 MIC의 4배 및 5

배인 경우가 각각 1주(5%)이었다.

분리균주 20주중 oxacillin에 대한 MIC MBC가 같은 경우가 2주(10%), MBC가 MIC의 2배인 경우가 10주(50%), MBC가 MIC가 같은 경우가 2주(10%), MBC가 MIC의 2배인 경우가 10주(50%), MBC가 MIC의 3배인 경우가 4주(20%), MBC가 MIC의 4배인 경우가 3주(15%), MBC가 MIC의 5배인 경우가 1주(5%)이었다.

분리균주 10주중 cefatrizine에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우는 1주(10%), MBC가

MIC의 2배인 경우는 6주(60%), MBC가 MIC의 3배인 경우는 2주(20%), MBC가 MIC의 4배 이상인 경우는 1주(10%)이었다.

분리균주 20주중 tetracycline에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우가 2주(10%), MBC가 MIC의 2배인 경우가 11주(55%), MBC가 MIC의 3배인 경우가 5주(25%), MBC가 MIC의 4배 및 5배인 경우가 각각 1주(5%)이었다.

표준균주인 *S. aureus* 25389주의 methicillin에 대한 MIC는 1 μ g/ml 이었으며, oxacillin에 대한 MIC는 2 μ g/ml 이었고, cefatrizine과 tetracycline에 대한 MIC는 각각 0.5 μ g/ml이었다. Methicillin과 oxacillin에 대한 MBC는 각각 1 μ g/ml, 4 μ g/ml이었으며, cefatrizine과 tetracycline에 대한 MBC는 각각 1 μ g/ml이었다.

2. 표준균주의 증식곡선 : Methicillin이 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 3x MIC, 8x MIC농도로 첨가된 Muller-Hinton broth와 50% 말혈청이 첨가된 Muller-Hinton broth에서 표준 균주인 *S. aureus* 25389의 증식 양상은 그림 1과 같다.

Muller-Hinton배지에서 표준균주인 *S. aureus* 25389의 증식상은 균 접종 6-18 시간 사이에 대수증식기였으며, 30-66시간 까지 극기정지기로 사멸기가 나타나지 않았다. 대수증식기의 흡광도는 0.1-0.6으로 급속히 증가하여 극기정지기에는 흡광도가 1.0-1.5 사이를 지속적으로 유지하였다. Methicillin이 0.5x MIC인 0.5 μ g/ml와 1x MIC인 1.0 μ g/ml 함유된 Muller-Hinton배지에서 25389 균주의 증식상은 균접종 18-30시간 까지 균이 약간 증식하여 흡광도가 0.06-0.08까지 증가하였으나 30-66시간 까지는 더이상 균이 증식하지 못하고 흡광도는 0.06-0.08를 유지하였다. Methicillin이 2x MIC인 2.0 μ g/ml, 4x MIC인 4.0 μ g/ml, 8x MIC인 8.0 μ g/ml 함유된 Muller-Hinton배지에서 25389균주는 증식이 완전히 억제되었다. 한편 50% 말혈청

이 첨가된 Muller-Hinton배지에서 25389의 증식상은 균 접종 후 6-12 시간에 대수증식기로 흡광도가 0.58까지 증가하였으며, 12-18 시간 까지 극기정지기를 이루다가 24-66시간 까지 서서히 감소하여 흡광도가 0.35까지 감소하였다. Methicillin이 0.5x MIC 농도로 함유된 말혈청배지에서 이균의 증식양상은 균 접종 후 18-24시간까지 대수증식기로 흡광도가 0.25까지 증가하였으며, 24-30시간 까지는 대수사멸기로 흡광도가 0.08까지로 감소한 후 30-54시간 까지는 흡광도가 0.08로 유지되다가, 54-66시간 까지는 흡광도가 0.15까지 서서히 증가하였다. Methicillin이 1x MIC농도에서는 균의 증식이 약간 있었으나 흡광도가 0.01 정도였고, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC농도로 함유된 말혈청 배지에서 모두 균의 증식이 억제되었다.

이로서 methicillin에 감수성인 균주에서 0.5x MIC 농도의 methicillin에 의해서 균의 증식이 억제되었으며, 1x MIC 농도에서는 균의 증식이 현저히 억제되었으나 사멸하지는 않았으나 2x MIC 농도 이상에서는 사멸하였으며, 각 농도의 methicillin 에서 paradoxical effect는 나타나지 않았다.

3. 환자에서 분리된 MRSA균주의 methicillin 함유배지에서 증식곡선 : 환자로 부터 분리 동정된 MRSA 8220주의 methicillin에 대한 MIC는 256 μ g/ml이었으며, Muller-Hinton배지와 50% 말혈청이 첨가된 Muller-Hinton배지에 methicillin을 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC 농도로 첨가한 후 이균의 증식은 균접종 후 6-12시간에 대수증식기였으며, 24시간에 극기정지기에 달하여 흡광도가 0.8이었으며, 48-66시간까지 흡광도가 0.63를 유지하여 서서히 감소하였다. Methicillin이 0.5x MIC인 128 μ g/ml함유된 배지에서 이균의 증식상은 균 접종 후 12-24시간이 대수증식기였으며, 30시간에 극기정지기로 흡광도가 0.6에 달하였으며 36-66시간이 사멸기로 흡광도가 0.25로 감소하였다. Methicillin이 1x MIC인 256 μ g/ml함유된

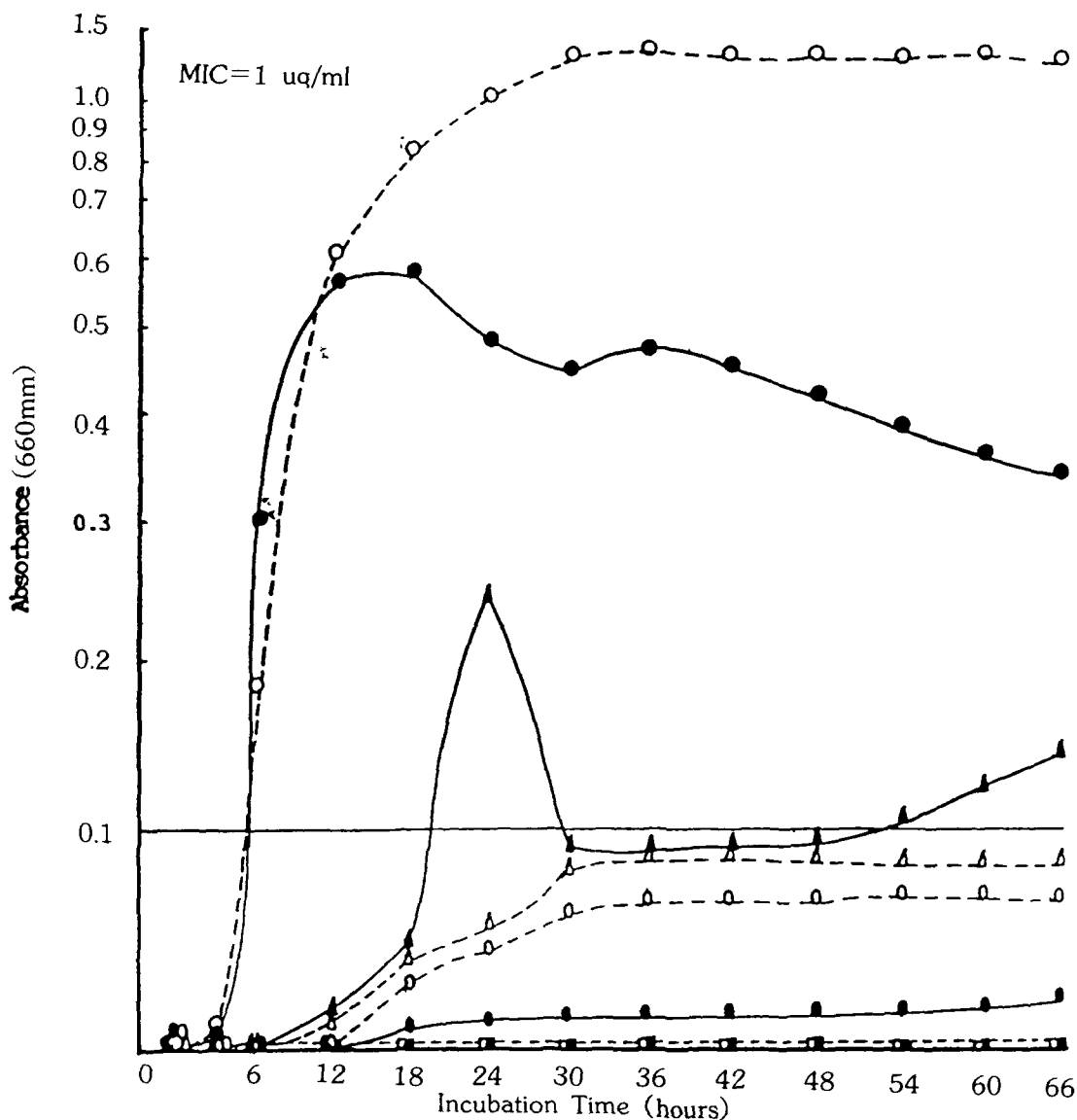


Fig. 1 : Growth curves of *S. aureus* 25389 in the Muller-Hinton broth containing various concentrations of methicillin.

- | | | | |
|---------|--------------------------|---------|------------------------------|
| ○ --- ○ | Muller-Hinton broth | ● --- ● | MAM contained 50 horse serum |
| △ --- △ | 0.5 µg/ml of methicillin | ▲ --- ▲ | 0.5 µg/ml of methicillin |
| ◐ --- ◐ | 1 µg/ml of methicillin | ◒ --- ◒ | 11 µg/ml of methicillin |
| ◑ --- ◑ | 2 µg/ml of methicillin | ◓ --- ◓ | 2 µg/ml of methicillin |

배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 18-36시간이 대수증식기였으며, 36-42시간이 극기정지기로 흡광도가 0.7에 달하였으며, 48-66시간이 사멸기로 흡광도가 0.43으로 감소하였다. Methicillin이 2x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 48-60시간이 대수증식기였으며, 60시간이 극기정지기로 흡광도가 0.7에 달하였으며, 66시간후 사멸기에 들어갔다. Methicillin이 4x MIC, 8x MIC 농도로 함유된 배지에서 이 균은 증식되지 않았다. 이 균도 0.5x MIC와 1x-2x MIC의 methicillin 농도에서 paradoxical effect가 나타났다. 그림 5에서와 같이 50% 말 혈청이 첨가된 Muller-Hinton배지에서 이 균의 증식은 균 접종 후 3-8시간이 대수증식기였으며, 12시간이 극기정지기로 흡광도가 1.3이었으며, 18-66시간 까지 서서히 감퇴하여 흡광도가 0.85이었다. Methicillin이 0.5x MIC인 128 μ g/ml 함유된 배지에서 이 균의 증식상은 18-24시간이 대수증식기였으며, 30시간이 극기정지기로 흡광도가 0.5이었으나, 36-66시간에 사멸기로 흡광도가 0.27까지 감소하였다.

Methicillin이 1x MIC인 256 μ g/ml 함유된 배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 24-30시간이 대수증식기였으며, 36시간이 극기정지기로 흡광도가 0.66이었으며, 42-66시간은 사멸기로 흡광도가 0.4로 감소하였다. Methicillin이 2x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 48-54시간이 대수증식기였으며, 60-66시간이 극기정지기로 흡광도가 0.66이었으며, 42-66시간은 사멸기로 흡광도가 0.4로 감소하였다. Methicillin이 2x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 48-54시간이 대수증식기였으며, 60-66시간이 극기정지기로 흡광도가 0.66이었다. 그러나 4x 및 8x MIC 농도에서는 균이 증식하지 못하였다. 이 균은 혈청이 첨가된 배지에서도 0.5x MIC와 1x-2x MIC 농도의 methicillin에서 paradoxical effect가 나타났다.

4. 환자로 부터 분리된 MRSA균주의 oxacillin 함유배지에서 증식곡선 : 환자로 부터 분리동정된 MRSA 8220균주의 oxacillin에 대한 MIC는 128 μ g/ml이었으며, Muller-Hinton배지와 50% 말 혈청이 첨가된 Muller-Hinton배지에 oxacillin이 0.5x MIC, 2x MIC, 4x, MIC, 8x MIC 농도로 첨가한 후 이균의 증식은 그림 4과 5와 같다. 그림 4에서와 같이 Muller-Hinton배지에서 이균의 증식상은 균 접종 직후 부터 6시간 이 대수증식기였으며, 12-72시간이 극기정지기로 흡광도가 1.2-1.0을 유지하였다. Oxacillin이 0.5x MIC인 64 μ g/ml 함유된 배지에서는 6-18시간이 대수증식기였으며, 24-72시간 까지 극기정지기로 흡광도가 0.77-0.70을 유지하였다. Oxacillin이 1x MIC인 128 μ g/ml 함유된 배지에서는 12-18시간이 극기정지기로 흡광도가 0.77-0.70을 유지하였다. Oxacillin이 4x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서는 54-6-시간이 대수증식기였으며, 66-72시간이 극기정지기로 흡광도가 0.48-0.44를 유지하였다. 이 균은 oxacillin의 1x MIC와 2x MIC 농도에서 paradoxical effect가 나타났다. 그림 9에서와 같이 50% 말 혈청이 첨가된 배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 직후 부터 6시간이 대수증식기였으며, 12시간이 극기정지기로 흡광도가 0.80이었으며, 18-72시간에 사멸기로 흡광도가 0.48를 감소하였다. Oxacillin이 0.5x MIC인 64 μ g/ml 함유된 배지에서는 6-12시간이 대수증식기였으며, 18-72시간 까지 극기정지기로 흡광도가 0.4를 유지하였다. Oxacillin이 1x MIC인 128 μ g/ml 함유된 배지에서는 12-18시간이 대수증식기였으며, 24-30시간이 극기정지기로 흡광도가 0.65였으며, 36-72시간 까지는 사멸기로 흡광도가 0.4로 감소하였다.

Oxacillin이 2x MIC인 256 μ g/ml 함유된 배지에서는 12-18시간이 대수증식기였으며, 24시간에 흡광도가 0.65이었다가 30-72시

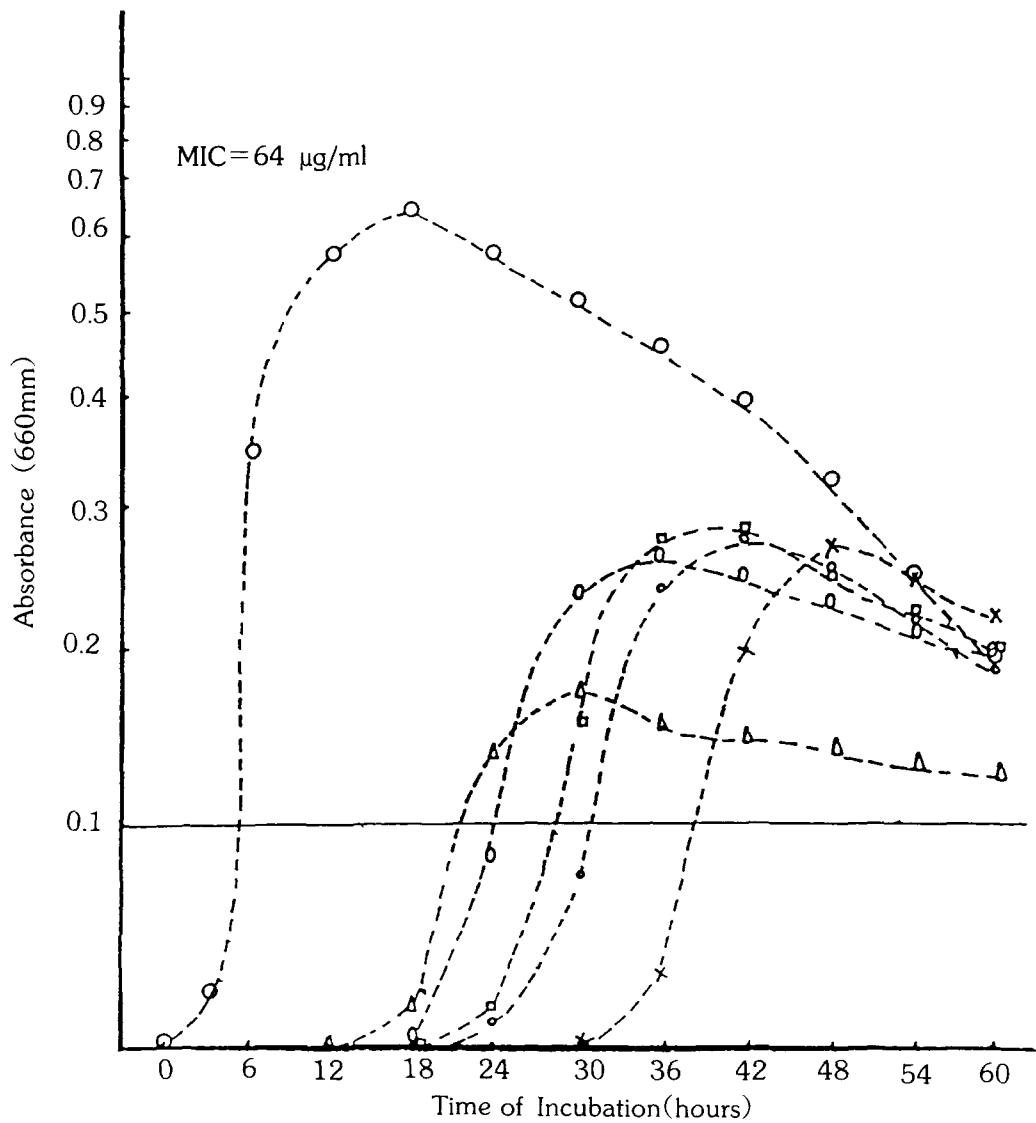


Fig. 2. Growth curve of *S. aureus* 4817 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

○ — ○ Muller-Hinton broth; △ — △ 32 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 □ — □ 64 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; ◇ — ◇ 128 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 × — × 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; × — × 512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;

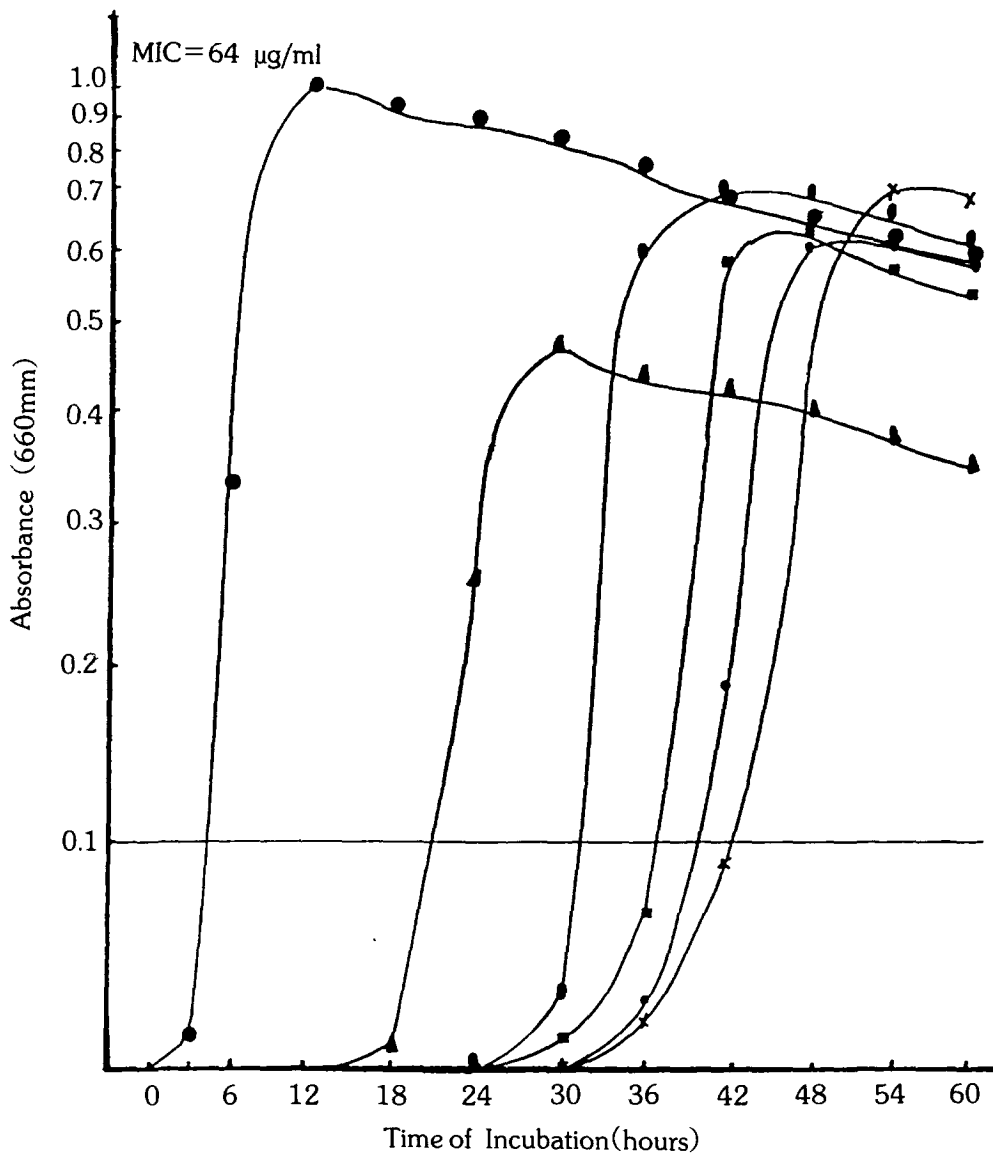


Fig. 3. Growth curve of *S. aureus* 4817 in the 50% serum added Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

- | | |
|--|--|
| ●—● Muller-Hinton + 50% serum; | ▲—▲ 32 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; |
| ■—■ 64 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; | ■—■ 128 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; |
| ●—● 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; | x—x 512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; |

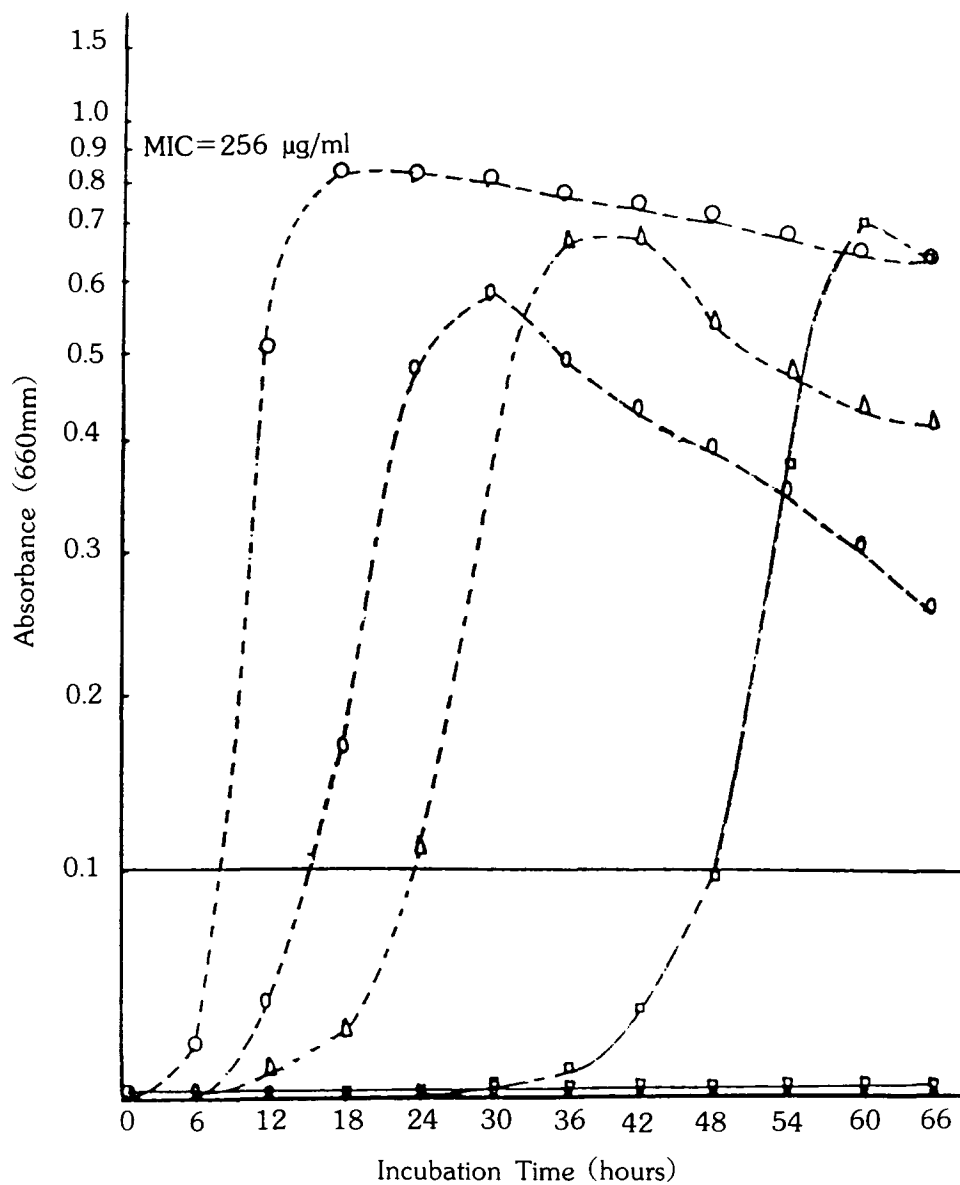


Fig. 4. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

○—○ Muller-Hinton broth; ◯—128 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 △—△ 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; ◻—512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 ◯—1024 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; ▽—2048 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;

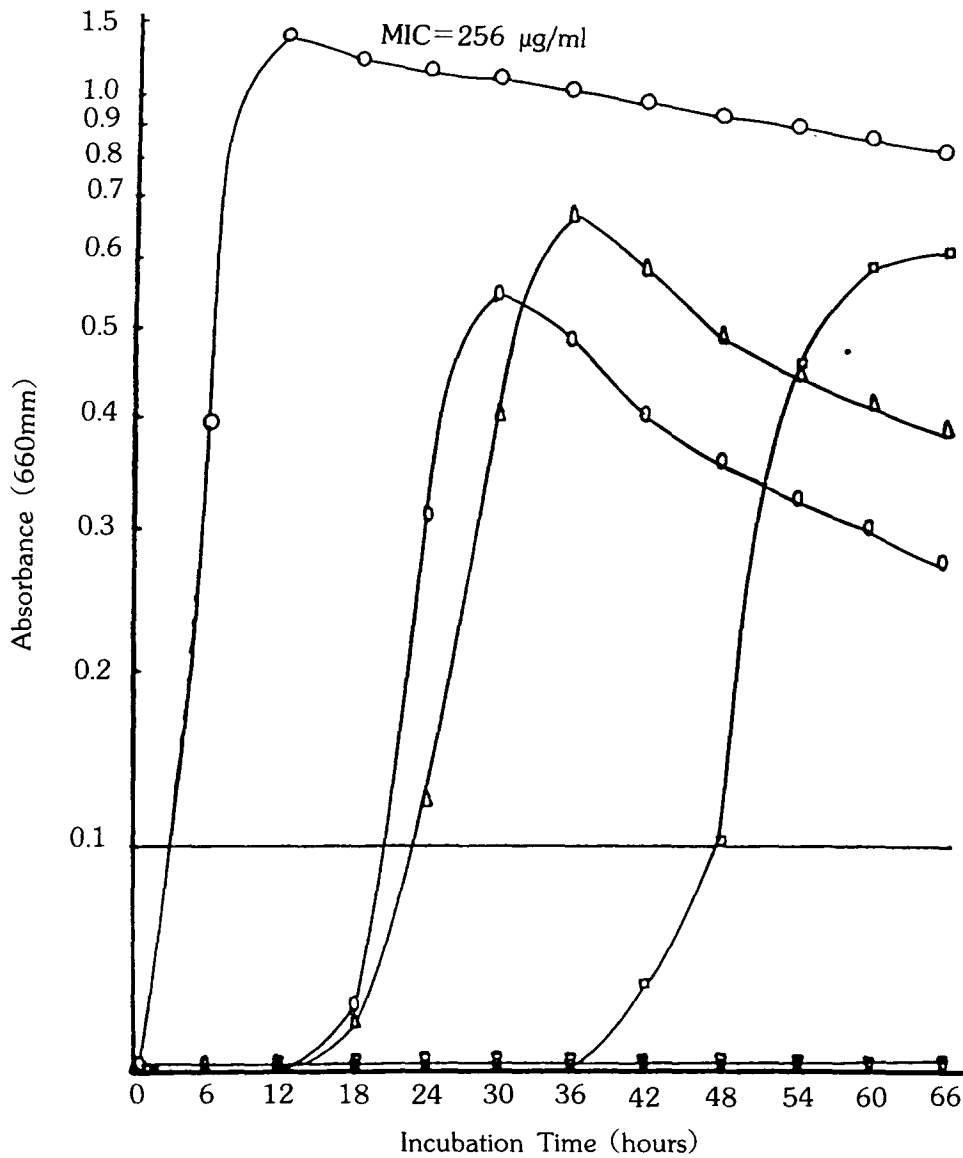


Fig. 5. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the 50% serum added Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

O—O 50% serum containing MHB, Q—Q 128 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 Δ — Δ 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; $\square$ — $\square$ 512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 $\bullet$ — $\bullet$ 1024 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin; ∇ — ∇ 2048 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;

간은 사멸기로 흡광도가 감소하였다. Oxacillin이 8x MIC 함유된 배지에서는 이 균은 증식하지 못하였다. 이 균은 혈청이 첨가된 배지에서 0.5x MIC와 1x-2x MIC 사이에 paradoxic effect가 현저하였다.

5. 환자로 부터 분리된 MRSA균주의 cefatrizine함 유배지에서 증식곡선 : 환자로 부터 분리동정된 MRSA 8220주의 cefatrizine에 대한 MIC는 128 μ g/ml이었으며, Muller-Hinton배지와 50% 말 혈청이 첨가된 Muller-Hinton배지에서 cefatrizine이 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC농도로 첨가한 후 이균의 증식상은 그림 10, 11과 같다. 그림 10에서와 같이 Muller-Hinton배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 직후 부터 6시간이 대수증식기였으며, 12-54시간까지 극기정지기로 흡광도가 1.1-0.9를 유지하였다. Cefatrizine이 0.5x MIC인 64 μ g/ml함유된 배지에서는 6-12시간이 대수증식기였으며, 12-18시간이 극기정지기로 흡광도가 0.48이었으며, 18-24시간에 흡광도가 0.4로 감소하여 54시간까지 유지되었다. Cefatrizine이 1x MIC인 128 μ g/ml함유된 배지에서는 12-18시간이 대수증식기였으며, 18-24시간이 극기정지기로 흡광도가 0.36이었으며, 24-54시간이 사멸기로 흡광도가 0.08까지 감소하였다. Cefatrizine이 2x MIC인 256 μ g/ml함유된 배지에서는 18-24시간이 대수증식기였으며, 24-30시간이 극기정지기로 흡광도가 0.5이었으며, 30-54시간은 사멸기로 흡광도가 0.12까지 감소하였다. Cefatrizine이 4x MIC인 512 μ g/ml함유된 배지에서는 18-30시간이 대수증식기였으며, 30-54시간 까지 점차 증가하여 54시간에 흡광도가 0.36이었다. Cefatrizine이 8x MIC인 1024 μ g/ml함유된 배지에서는 24-40시간이 대수증식기였으며, 42-50시간이 극기정지기로 흡광도가 0.39를 유지하였다. 이 균은 1x MIC와 2x MIC 농도의 cefatrizine에서 paradoxic effect가 나타났다.

그림 11에서와 같이 50% 말 혈청이 첨가된 Muller-Hinton배지에서 이균의 증식상은 균 접종 직후 부터 6시간이 대수증식기였으며, 12-60시간이 극기정지기로 흡광도가 1.0-0.99를 유지하였다. Cefatrizine이 0.5x MIC인 64 μ g/ml함유된 배배지에서는 6-12시간이 대수증식기였으며, 12-18시간이 극기정지기로 흡광도가 0.6이었으며, 24-60시간 까지 흡광도가 0.45로 서서히 감소하였다.

Cefatrizine이 1x MIC인 128 μ g/ml함유된 배지에서는 12-18시간이 대수증식기였으며, 24시간에 극기정지기로 흡광도가 0.85이었으며, 30-60시간 까지 흡광도 0.68를 유지하였다.

Cefatrizine이 2x MIC인 256 μ g/ml함유된 배지에서는 12-24시간이 대수증식기였으며, 30시간이 극기정지기로 흡광도가 0.8이었으며, 39-60시간 까지 흡광도가 0.59로 감소하였다. Cefatrizine이 4x MIC 512 μ g/ml함유된 배지에서는 36-42시간이 대수증식기였으며, 42시간이 극기정지기로 흡광도가 0.58이었으며, 48-60시간이 사멸기로 0.4로 감소하였다.

Cefatrizine이 8x MIC 1024 μ g/ml함유된 배지에서는 이균이 증식하지 못하였다. 이균은 0.5x MIC와 1x, 2x, 4x MIC의 cefatrizine에서 paradoxic effect가 나타났다.

6. 환자로 부터 분리된 MRSA균주의 tetracycline함유배지에서 증식곡선 : 환자로 부터 분리동정된 MRSA 8220주의 tetracycline에 대한 MIC는 64 μ g/ml이었으며, Muller-Hinton배지와 50% 말 혈청이 첨가된 배지에 tetracycline이 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC 농도로 함유된 배지에서 이균의 증식상은 그림 8과 9와 같다. 그림 12에서와 같이 Muller-Hinton배지에서 이 균의 증식상은 균 접종 후 0-12시간이 대수증식기였으며, 12-84시간까지 극기정지기로 흡광도가 1.4-1.5를 유지하였다. tetracycline이 0.5x MIC인 32 μ g/ml함유된 배지에서는 6-

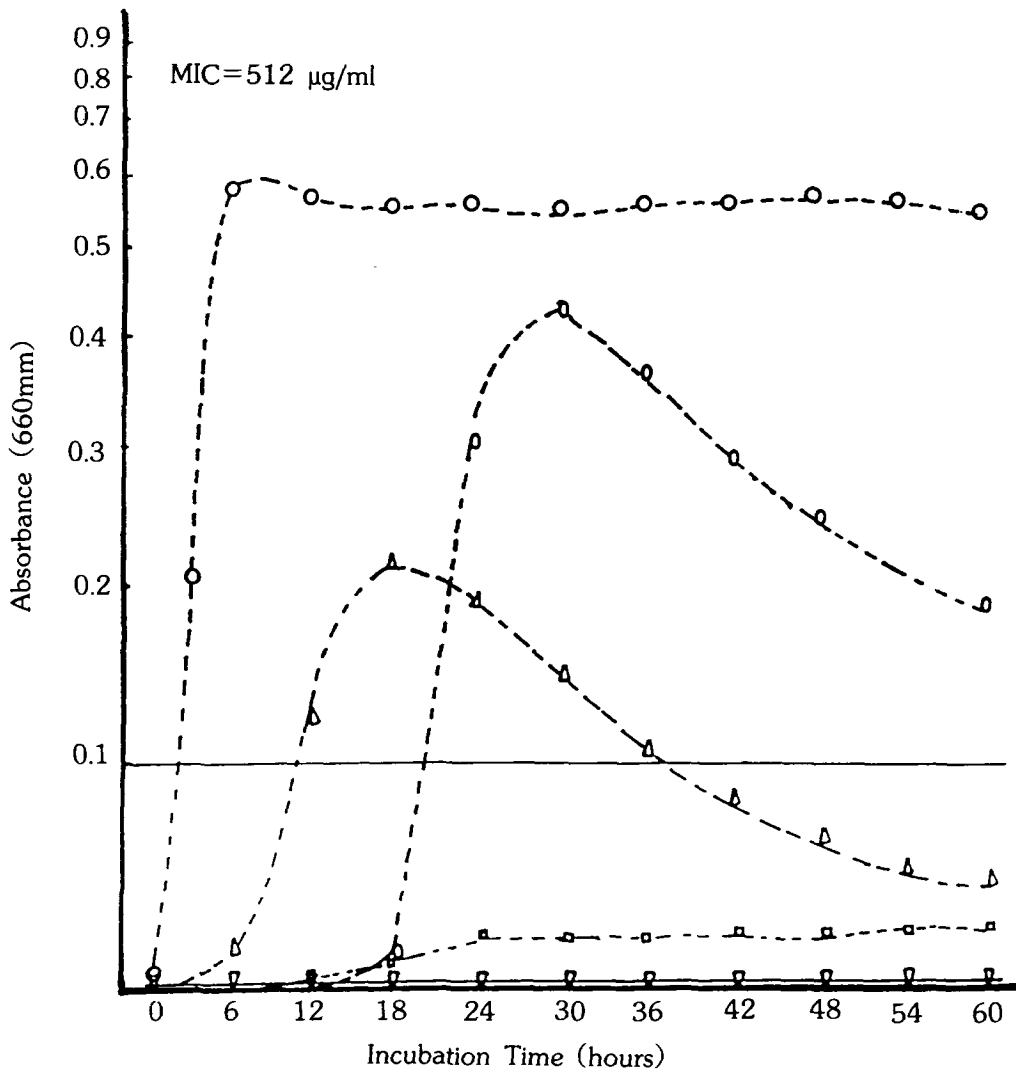


Fig. 6. Growth curve of *S. aureus* 4806 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

○—○ Muller-Hinton broth; △—△ 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 □—□ 512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin(MIC) ◇—◇ 1024 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 ▽—▽ 2048 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin

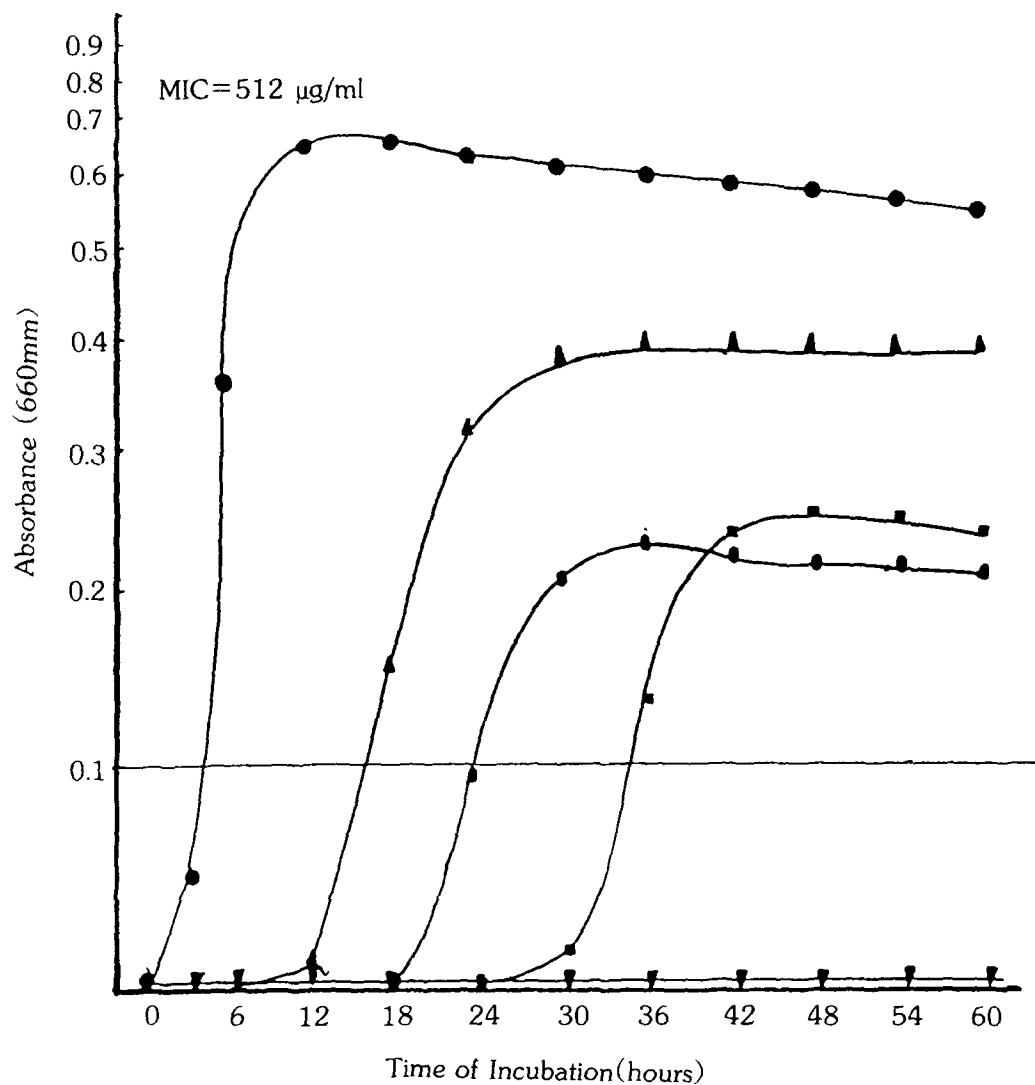


Fig. 7. Growth curve of *S. aureus* 4806 in the 50% serum added Muller-Hinton broth contained with various concentration of methicillin.

●● Muller-Hinton + 50% serum; ▲▲ 256 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 ■■ 512 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin(MIC) ■■■ 1024 $\mu\text{g/ml}$ of methicillin;
 ▼▼ 2048 $\mu\text{g/ml}$

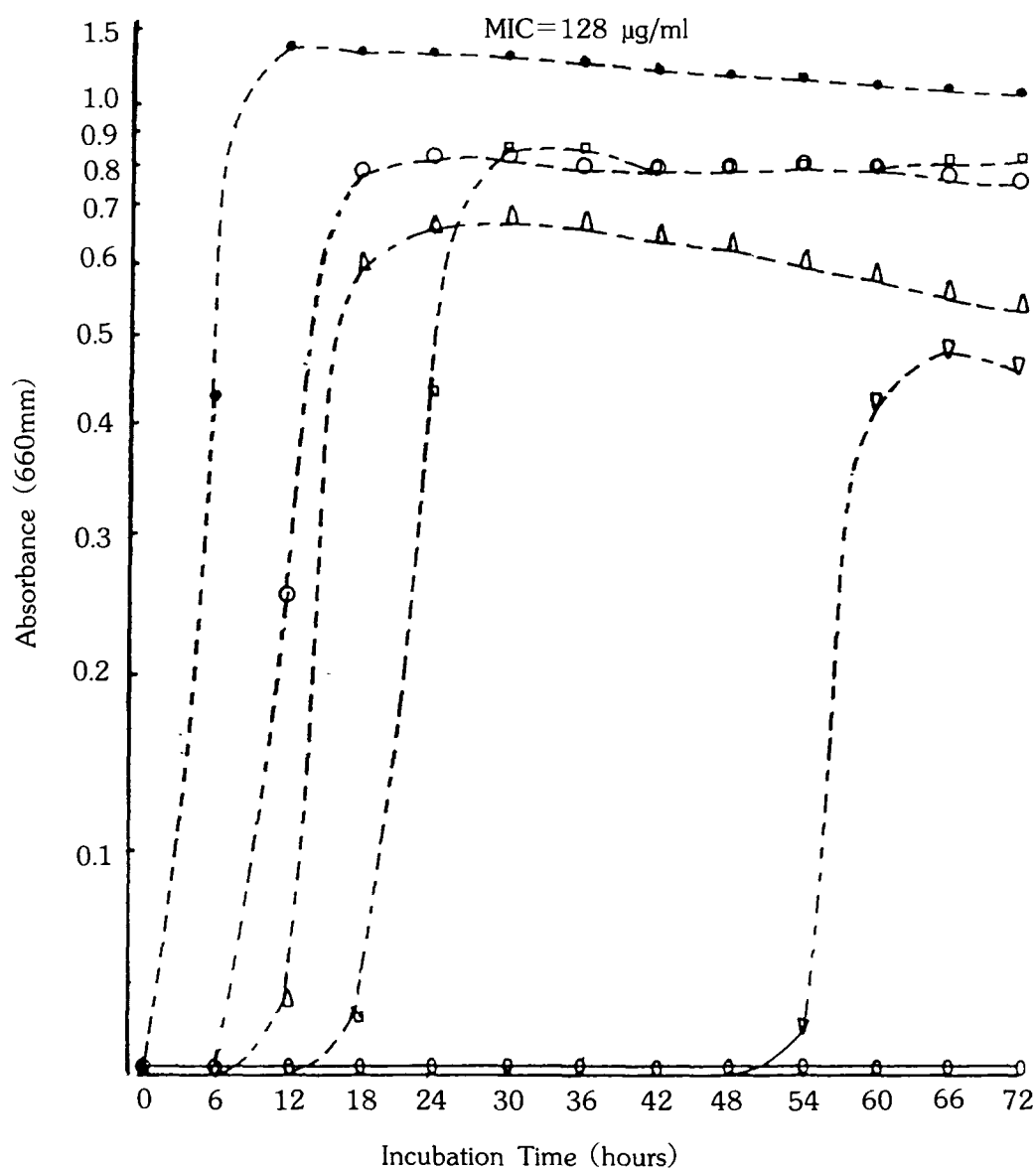


Fig. 8. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of oxacillin.

—●— Muller-Hinton broth, ○—○ 64 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin,
 —△— 128 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin, □—□ 256 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin,
 —▽— 512 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin, ◊—◊ 1024 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin

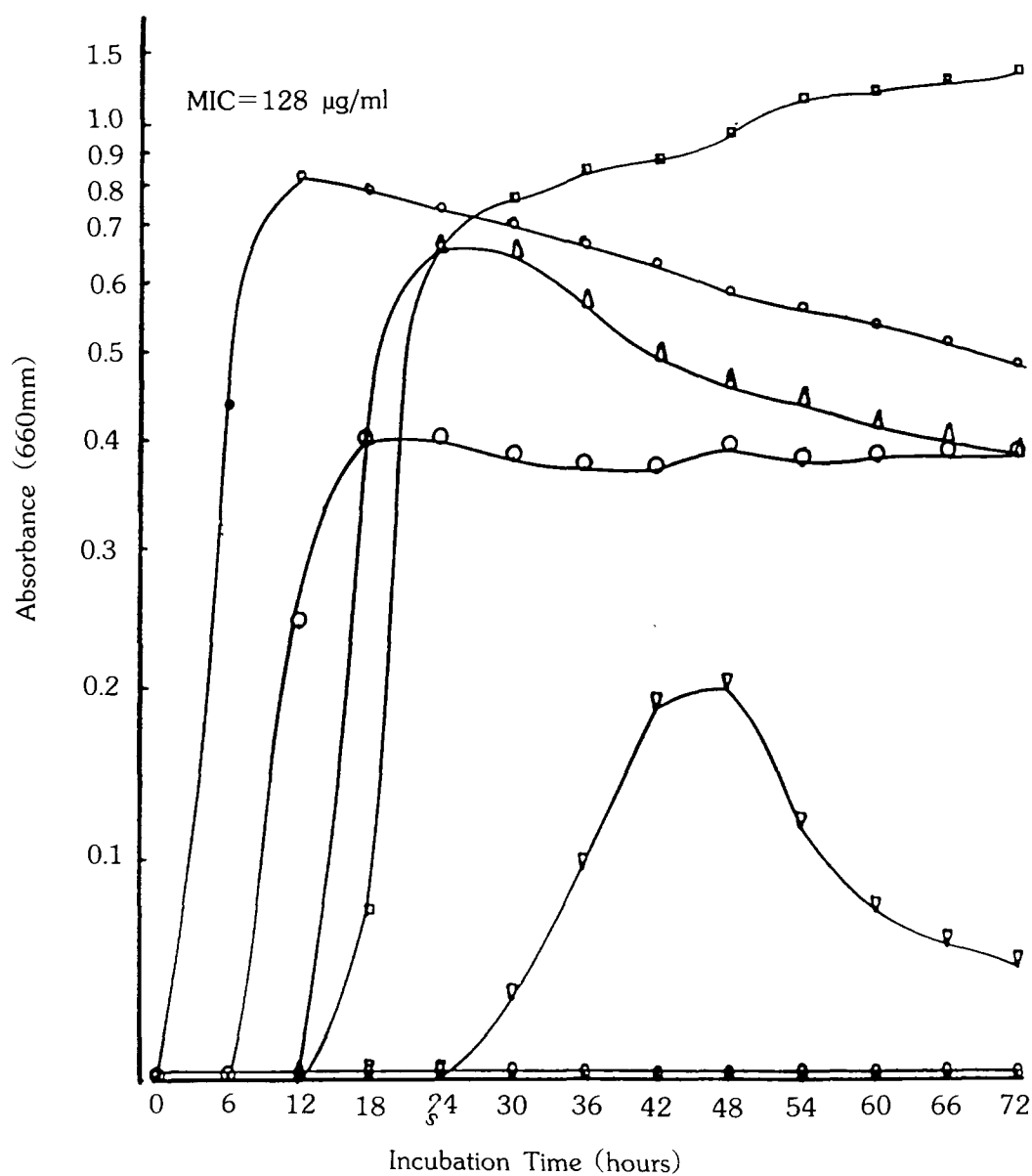


Fig. 9. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the 50% serum added Muller-Hinton broth contained with various concentration of oxacillin.

○—○ 50% serum containing MHB ○—○ 64 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin,
 △—△ 128 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin, □—□ 256 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin,
 ▽—▽ 512 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin, ⊖—⊖ 1024 $\mu\text{g/ml}$ of oxacillin

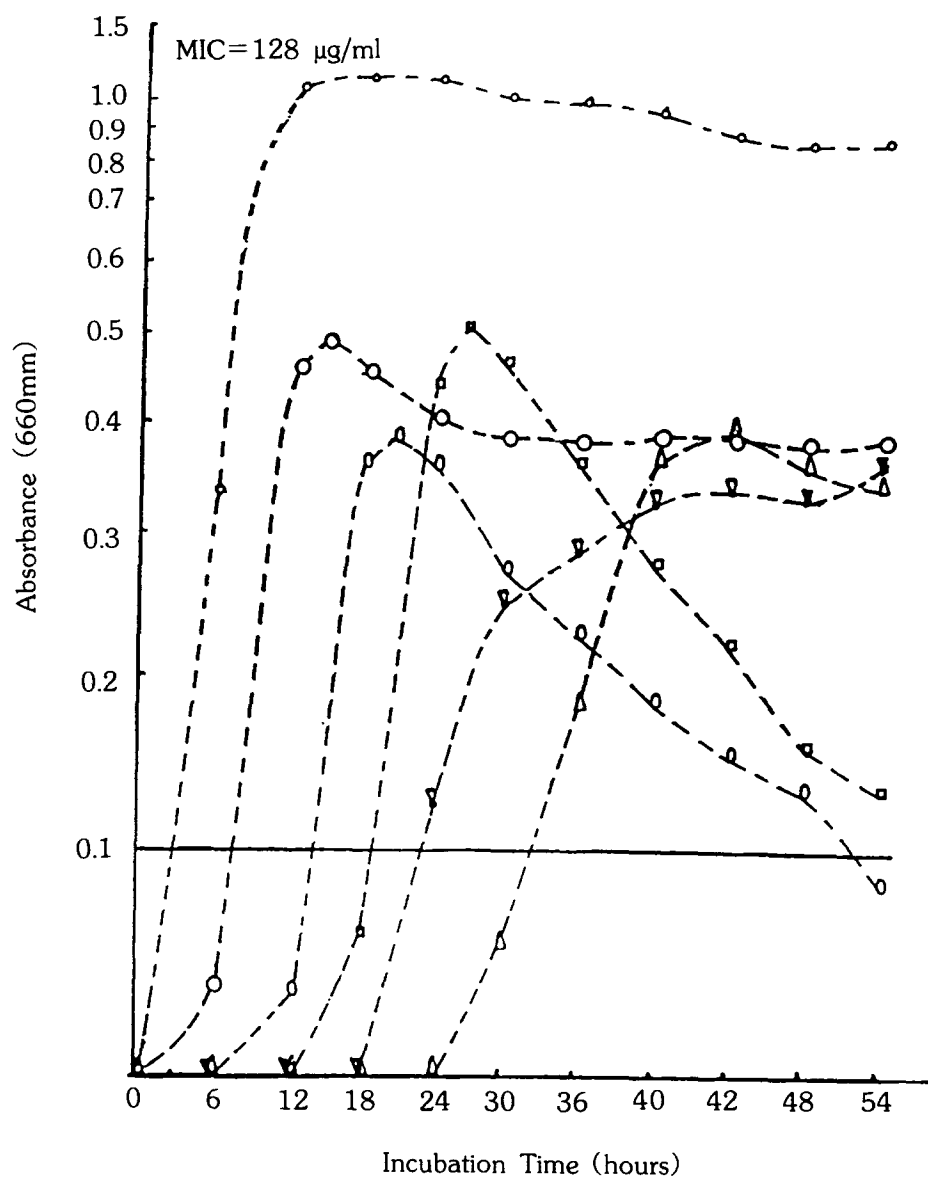


Fig. 10. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of cefatrizine.

○—○ Muller-Hinton broth, ○—○ 64µg/ml of cefatrizine,
 ◊—◊ 128µg/ml of cefatrizine, ◐—◐ 256µg/ml of cefatrizine,
 ▽—▽ 512µg/ml of cefatrizine, △—△ 1024µg/ml of cefatrizine

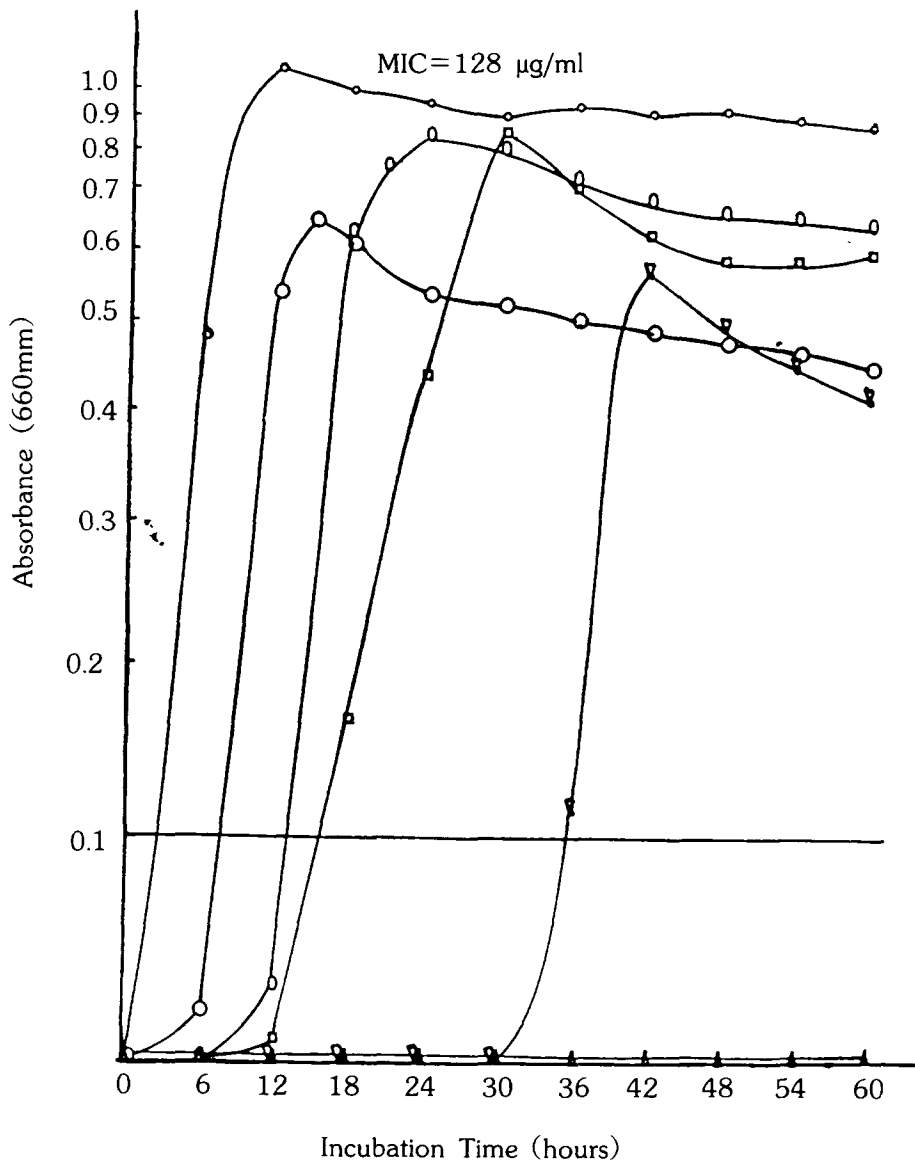


Fig. 11. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the 50% serum addes Muller-Hinton broth contained with various concentration of cefatrizine.

○ 50% serum containing MHB, □ 64 µg/ml of cefatrizine,
 ◇ 128 µg/ml of cefatrizine, △ 256 µg/ml of cefatrizine,
 ▽ 512 µg/ml of cefatrizine, ▴ 1024 µg/ml of cefatrizine

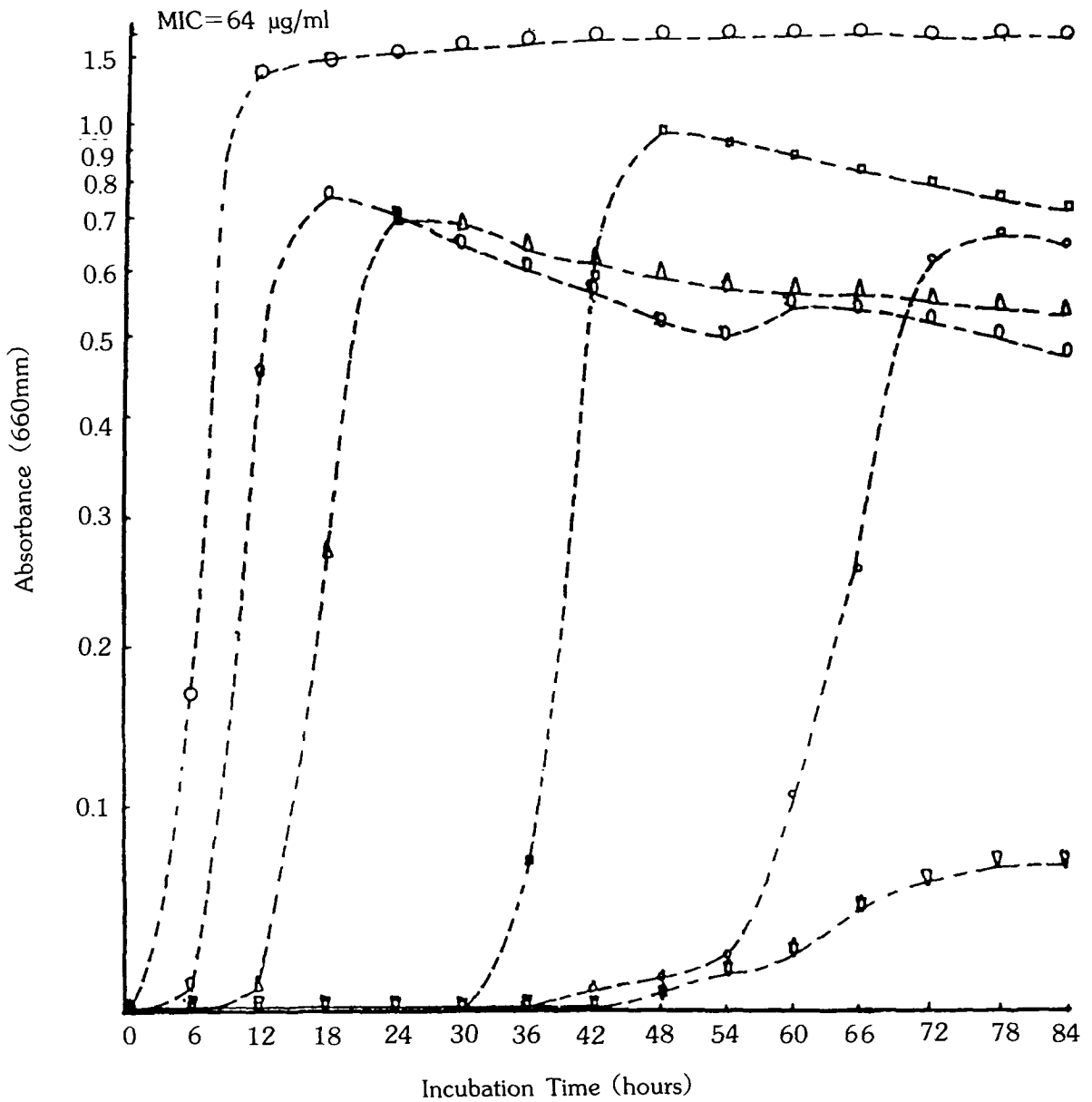


Fig. 12. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of tetracycline.

○---○ Muller-Hinton broth, ◊---◊ 32µg/ml of tetracycline,
 △---△ 64µg/ml of tetracycline, ◻---◻ 128µg/ml of tetracycline,
 ◐---◐ 256µg/ml of tetracycline, ◑---◑ 512µg/ml of tetracycline,

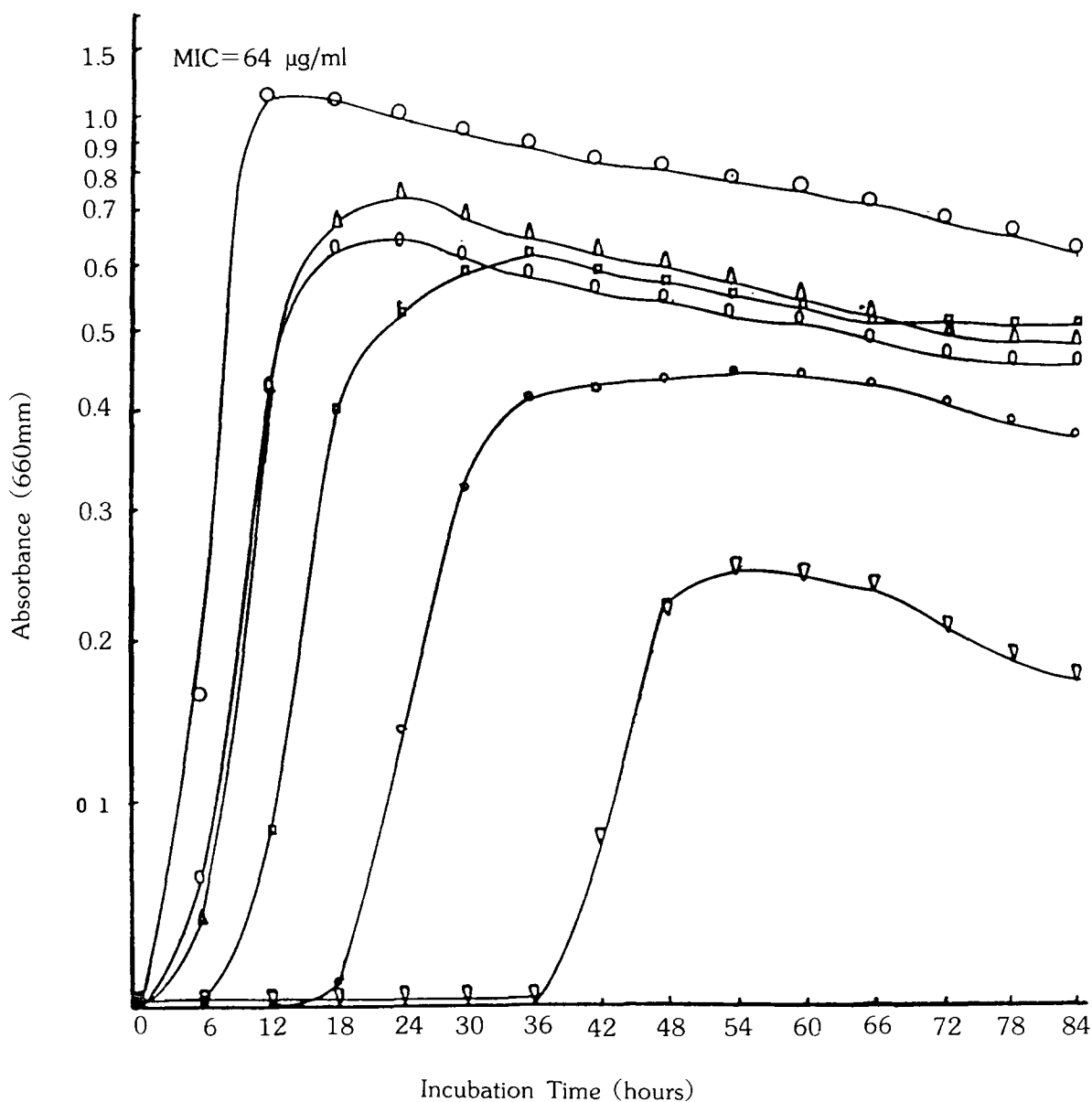


Fig. 13. Growth curve of *S. aureus* 8220 in the 50% serum added Muller-Hinton broth contained with various concentration of tetracycline.

○—○ 50% serum containing MHB, ○—○ 32 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline,
 Δ — Δ 64 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline, ◇—◇ 128 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline,
 $\bullet$ — $\bullet$ 256 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline, ▽—▽ 512 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline,

12시간이 대수증식기였으며, 18시간이 극기정지기로 흡광도가 0.7이었으며, 24-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.48로 감소하였다.

Tetracycline이 1x MIC인 64 μ g/ml 함유된 배지에서는 12-24시간이 대수증식기였으며, 24-30시간이 극기정지기로 흡광도가 0.7이었으며, 36-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.5로 감소하였다. Tetracycline이 2x MIC인 128 μ g/ml 함유된 배지에서는 36-42시간이 대수증식기였으며, 48시간이 극기정지기로 흡광도가 1.0이었으며, 54-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.7이었다. Tetracycline이 4x MIC인 256 μ g/ml 함유된 배지에서는 60-72시간이 대수증식기였으며, 78-84시간이 극기정지기로 흡광도가 0.68이었다. Tetracycline이 8x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서는 60-84시간에 서서히 증식하였으나 흡광도는 0.06이었다.

이 균은 tetracycline에서는 paradoxic effect가 나타나지 않았다. 그림 9에서와 같이 50% 말 혈청이 첨가된 극기정지기로 흡광도가 1.1이었으며, 18-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.6으로 감소하였다.

Tetracycline이 0.5x MIC인 32 μ g/ml 함유된 배지에서는 6-12시간이 대수증식기였으며, 18-24시간이 극기정지기로 흡광도가 0.63이었으며, 30-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.46로 감소하였다. Tetracycline이 1x MIC인 64 μ g/ml 함유된 배지에서는 6-12시

간이 대수증식기였으며, 24시간이 극기정지기로 흡광도가 0.7이었으며, 30-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.5이었다. Tetracycline이 2x MIC인 128 μ g/ml 함유된 배지에서는 12-18시간이 대수증식기였으며, 36시간이 극기정지기로 흡광도가 0.6이었으며, 42-84시간 까지 서서히 사멸하여 흡광도가 0.5이었다.

Tetracycline이 4x MIC인 256 μ g/ml 함유된 배지에서는 18-30시간이 대수증식기였으며, 36-66시간 까지 극기정지기로 흡광도가 0.4이었으며, 72-84시간 까지 서서히 감소하여 흡광도가 0.37이었다. Tetracycline이 8x MIC인 512 μ g/ml 함유된 배지에서는 36-48시간이 대수증식기였으며, 54-60시간 까지 극기정지기로 흡광도가 0.25이었으며, 66-84시간이 사멸기로 흡광도가 0.17로 감소하였다. 이 균은 tetracycline의 각 농도에서 paradoxic effect는 나타나지 않았다.

7. 각 항생제 농도에서 L-form 집락 형성 : 환자로 부터 분리된 MRSA의 각 항생물질 각 농도에서 L-form 집락의 형성 유무를 관찰한 성적은 표 2에서와 같다. 각 항생물질이 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC 농도로 함유된 Muller-Hinton 한천배지에 MRSA 8220의 배양액을 각각 접종하여 24시간 배양할 다음 L-form 집락의 형성은 0.5x MIC 농도의 methicillin, oxacillin, cefatrizine 함유배지에서는 그림 14에서와 같이 L-

Table 2. L-form colony formation of *S. aureus* 8220 in the Muller-Hinton broth contained with various concentration of antibiotics.

	concentration of antibiotics					
	Control	0.5x MIC	1x MIC	2x MIC	4x MIC	8x MIC
Methicillin	—	+	—	—	—	—
Oxacillin	—	+	—	—	—	—
Cefatrizine	—	+	—	—	—	—
Tetracycline	—	—	—	—	—	—

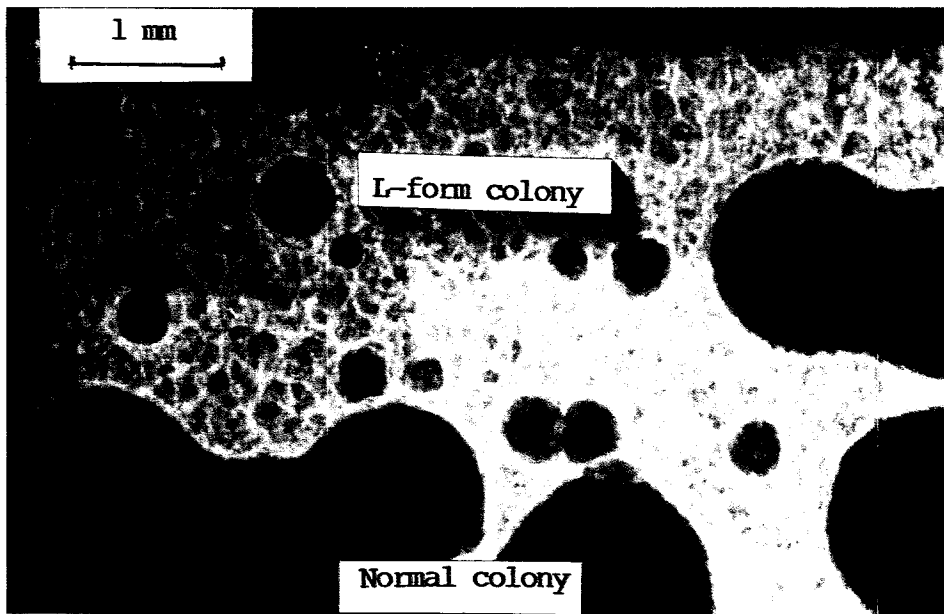


Fig. 14 The colony morphology of L-form and normal *S. aureus* 8220 on the MH agar contained with 0.5x MIC of cefatrizine.

Normal colony : Large black color

L-form colony : Small yellowish color

form 집락이 형성되었으나 1x, 2x, 4x, 8x MIC 농도에서는 형성되지 않았다. 그림 14에서와 같이 MRSA의 L-form 집락은 정상 세균의 집락에 비하여 외소하고 투명하였다. 따라서 증식곡선에서 나타나는 paradoxic effect는 그 농도에서 L-form 변이체 형성이 중요한 원인 중의 하나로 사료된다.

고 찰

포도구균은 화농성질환의 가장 대표적인 원인균으로 항생물질이 개발된 초기에는 penicillin 등에 감수성이었으나, 항생제의 사용이 증가되면서 내성변이균주의 출현빈도가 증가되고, 특히 methicillin 등 penicillinase에 저항성인 항생물질에도 저항성인 MRSA의 출현으로 이들 균에 의한 원내감염이나, 만성소모성 질환이나 면역기능이 저하되는 암 환자나, 면역억제제를 사용하는 장기이식 환자 등에서 이들 MRSA의 감염증이 문제시

되고 있다.^{1,3,10,30,34,36)}

따라서 이들 MRSA에 의한 감염증의 치료를 위해서는 이들균의 각종 항생제에 대한 MIC와 MBC 및 이들 균의 항생제에 대한 특성을 이해하는 것이 중요한 과제라 하겠다. 이에 환자에서 분리된 MIC중 methicillin에 대한 MIC가 각각 다른 균주를 methicillin이 0.5x, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC 농도로 함유된 Muller-Hinton와 50% 말 혈청 첨가 Muller-Hinton배지에서 증식상을 표준균주와 비교하여 paradoxic effect의 유무와 L-form형성의 관계를 조사하였다.

표준균주는 Muller-Hinton배지에서 0.5x MIC와 1x MIC의 methicillin 농도에서 균의 증식이 현저히 억제되어 흡광도가 0.1이하였으며, 2x MIC농도에서는 균의 증식이 불가능하였으나, 50% 말 혈청이 첨가된 배지에서는 0.5x MIC에서 18-30시간에 균이 일시적으로 증가하였으나 그후 30-54시간 까지

균의 증식이 억제되다가 6시간 이후 서서히 증가하는 현상으로 보아 methicillin에 감수성인 균주도 혈청이 존재하는 상태에서는 0.5x MIC 정도의 농도에서 30-54시간 이상 노출되면 내성 변이주가 출현할 수 있는 것으로 추정되나 이문제는 앞으로 더 추시해볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

환자에서 분리된 MRSA중 methicillin에 대한 MIC가 256 μ g/ml인 8220주를 각각 methicillin이 0.5x MIC, 1x MIC, 2x MIC, 4x MIC, 8x MIC농도로 함유시킨 Muller-Hinton배지에 접종하였을 경우 3 균주 모두가 각각의 0.5x MIC 농도에서의 증식이 1x MIC 농도에서 보다 억제되는 paradoxical effect를 나타내었다. 50% 혈청 첨가배지에서 8220주는 0.5x MIC에서 균의 증식이 1x MIC에서 보다 억제되는 paradoxical effect를 나타내었다.

이는 Hartman등²⁵⁾이 보고한 MRSA균주의 heterorestant특성과 관련된 균주에 대한 감수성 검사를 실시하였던 바 억제농도가 낮은 연변부에는 균의 증식억제효과가 현저하였으나 억제농도가 높은 disk주위에서는 오히려 균이 증식되는 paradoxical effect현상을 관찰하고, 이는 이균주가 항생물질에 접촉한 이후에 유도되어 생성되는 효소로 알려진 penicillin binding protein-2'(PBP-2)의 생성에 의해 저항성을 나타내는 것이라고 주장하였으며, 이 PBP-2'는 항생제와의 접촉 후 6시간후에 형성된다고 주장하였다.

본 실험의 결과에서도 paradoxical effect는 각 균주에서 6-12시간 이후에 나타나는 것과 일치되는 결과로도 볼수 있겠으나 시간이 경과되면서 항생제의 역가가 소멸되므로 균이 증식가능한 상태에 이르는데 소요되는 시간이 6시간 정도가 아닌가 하는 문제도 고려되어야 할 중요한 점이라고 생각된다. 이는 각 균주가 항상제 농도가 증가됨에 따라 증식시간이 지연되는 현상과도 일치하는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서는 액체배지에서 균의 증식 정도를 흡광도의 차이로 비교하였으므로 Yamori등⁴⁹⁾과 Ode-

nholt등³²⁾의 결과와 동일한 기전에 의한 상동성을 위미하는 것은 아닌것으로 사료된다. 따라서 이 문제도 앞으로 추구해야 할 과제라고 사료된다. 한편, Odenholt등은³²⁾ MRSA중 cloxacillin과 benzylpenicillin에 paradoxical effect를 나타내는 균주가 있으며, 이 현상은 균주에 따라 차이가 있고, 2x MIC에서 나타나는 균주와 10x MIC, 100x MIC에서 나타나는 균주도 있으며, MBC/MIC 비와도 일치하지 않는 다고 보고하였다. 이는 본 실험 결과와는 상이하였으나 그 차이는 실험방법에 따른 것으로 사료된다.

또한 Ikeda등은²⁷⁾ proteus vulgaris가 cefmenoxime에서 paradoxical effect가 있다고 보고 하고 있으며, Yamori등은⁴⁹⁾ Mycobacterium avium에서 rifampicin과 streptomycin에 대한 paradoxical effect가 있다고 보고하고 있으므로 각종 세균에서 각항생제에 대한 paradoxical effect를 종합적으로 연구되어야 할 과제라 하겠다.

Methicillin에 대한 MIC가 분리균 중에서 중간정도인 S. aureus 8220주를 이용하여 이 균주가 methicillin이외의 oxacillin, cefatrizine, tetracycline에서 paradoxical effect의 유무를 검토하였던바, oxacillin에서는 Muller-Hinton배지에서 1x MIC와 2x MIC사이에서 paradoxical effect가 나타났으나, 50% 말 혈청 Muller-Hinton배지에서는 0.5x MIC와 1x MIC사이에서 paradoxical effect가 나타난 것으로 보아 균종에 따른 차이로 사료된다. Cefatrizine에서도 Muller-Hinton배지에서는 1x MIC와 2x MIC사이에서 paradoxical effect가 나타났으나, 50% Muller-Hinton배지에서는 0.5x MIC와 1x MIC사이에서 paradoxical effect가 나타났다. 그러나 tetracycline에서는 Muller-Hinton배지와 50% 말 혈청배지에서 모두 paradoxical effect는 나타나지 않았다.

이로서 MRSA는 penicillin계 항생물질에는 0.5x-1x MIC농도에서 paradoxical effect가 나타남을 알수 있었다. 이는 Odenhol-

과 紺野⁵⁴⁾의 보고에서와 같이 균종에 따라 차이가 있으며, McDougal등³⁰⁾과 Hartman등²⁵⁾과 Thornsberry등⁴³⁾의 보고에서와 같이 MRSA의 heteroresistant 균주의 특성에도 관계가 있을 것으로 사료된다.

한편 paradoxical effect와 L-form형성과의 관계를 규명하기 위한 실험결과에서 8220주의 L-form형성은 각 penicillin계 항생물질의 0.5x MIC농도에서 형성되었으며, 그 이상의 농도에서는 형성되지 않았으며, tetracycline에서는 어느 농도에서도 형성되지 않았다. 이로써 본 실험에서 나타나는 paradoxical effect는 세균의 세포벽합성을 억제하는 항생제에 의해 세균의 세포벽이 합성되지 않는 L-form형성되므로서 흡광도가 낮아지므로서 나타나는 현상으로 사료된다. 또한 L-form의 형성은 항생물질 접촉 후 6-24시간에 형성되어 60시간 이상 생존하므로 이와 같은 MRSA의 치료시는 이와같은 균의 특성을 이해하고 충분한 량의 항생물질을 적절한 시간 간격으로 투여하여야 할 것으로 사료된다.

결론

환자로 부터 분리된 MRSA의 methicillin, oxacillin, cefaterizine, tetracycline에 대한 MIC와 MBC를 조사하고, 각종 MIC농도에서 MRSA의 증식양상과 L-form형성 유무를 관찰하므로서 MRSA의 penicillin계 항생물질에 대한 paradoxiceffect의 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MRSA 20주 중 methicillin에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우는 15%, MBC가 MIC의 2배인 경우가 60%, MBC가 MIC의 3배인 경우가 15%, MBC가 MIC의 4배 이상인 경우가 5%이었다.
2. MRSA 20주 중 oxacillin에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우는 10%, MBC가 MIC의 2배인 경우가 50%, MBC가 MIC의 3배인 경우가 20%, MBC가 MIC의 4배 이상인 경우가 20%이었다.
3. MRSA 10주중 cefatrizine에 대한 MIC와

MBC가 같은 경우는 10%, MBC가 MIC의 2배인 경우가 60%, MBC가 MIC의 3배인 경우가 20%, MBC가 MIC의 4배 이상인 경우가 20%이었다.

4. MRSA 20주중 tetracycline에 대한 MIC와 MBC가 같은 경우는 10%, MBC가 MIC의 2배인 경우가 55%, MBC가 MIC의 3배인 경우가 25%, MBC가 MIC의 4배 이상인 경우가 5%이었다.
5. MRSA주는 모두 Muller-Hinton배지에서 methicillin이 0.5x MIC농도에서의 증식이 1x MIC농도 이상에서 보다 현저히 억제되는 paradoxical effect가 관찰되었다.
6. MRSA주 중 일부는 50% 혈청첨가 배지에서도 0.5x MIC농도에서 paradoxical effect가 관찰되었다.
7. MRSA주는 Muller-Hinton배지에서 oxacillin과 cefatrizine의 1x MIC농도에서 paradoxical effect가 관찰되었으며, 50% 혈청첨가 배지에서는 0.5x MIC농도에서 paradoxical effect가 관찰되었다.
8. MRSA주는 Muller-Hinton배지와 혈청첨가배지에서 tetracycline에 대해서는 paradoxical effect가 관찰되지 않았다.
9. MRSA주는 0.5x 농도의 methicillin, oxacillin, cefatrizine함유배지에서 L-form이 형성되었으나, tetracycline함유배지에서는 형성되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 MRSA는 0.5x-1x MIC농도의 methicillin, oxacillin, cefatrizine 함유배지에서 paradoxical effect가 나타나며, 이 현상은 이들 항생제 함유 배지내에서 L-form균이 형성되므로서 나타나는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. 강 현, 이강영, 강영숙, 정윤섭, 이형환 : methicillin내성 포도구균의 ampicillin/sulbactam 및 penicillin G/sulbactam에 대한 감수성, 대한미생물학회지 25 : 127-134, 1990.

2. 강 현, 이강영, 강영숙, 정운섭, 이형환 : *Asaphylococcus*의 methicillin내성. 대한미생물학회지 : 24 : 427-434, 1989.
3. 권영철, 서민호, 이유철, 설성용, 조동택, 전도기 : 포도구균의 phage형 및 항생제 내성. 대한화학요법 학회지. 1 : 85-82, 1983.
4. 박숙자. 정운섭, 이삼열 : 임상가검물에서 분리된 균주의 항상제 감수성 대한병리학회지. 11 : 119-1125, 1977.
5. 박승함 : 한국에서 분리된 병원성 세균의 항균제에 대한 감수성. 대한미생물학회지. 5 : 1-8, 1970.
6. 이수동, 석정우, 김세옥, 안돈희, 손근찬 : 황색포도상구균의 항균제에 대한 감수성 태도. 소아과. 21 : 26-32, 1978.
7. 정운섭, 이미경, 이삼열 : methicillin내성 *Staphylococcus aureus*의 분리빈도와 fusidic acid에 대한 감수성. 감염. 17 : 141-147, 1985
8. 홍석일, 권태희, 박창선, 석종성, 김상인 : 서울대학교 병원에서 분리된 각종 병원균의 항생제 감수성 경향에 대한 검색. 대한임상병리학회지 : 4 : 149-162, 1984.
9. Anwar H, Stra JL, Costerton JW : Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalixin and tobramycin in a chemostat system. Antimicrob. Agents Chemoth. 36 : 890-893, 1992.
10. Barrett FF, McGehee RF, Finland M : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at Boston city hospital. New Eng. J Med. 279 : 441-448, 1968.
11. Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB ; Cecil textbok of medicine. 16th ed. Philadelphia. WB Saunder Co. 1982.
12. Benner EJ, Kayser FH : Growing clinical significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet October 5 : 741-744, 1968.
13. Blanco MT, Perez-Giraldo C, Blanco J, Moran FJ, Hurtado C, Gomez-Garcia AC : In vitro studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC10231 by the turbidimetric method. Antimicro. Agents Chemoth. 36 : 898-901, 1992.
14. Boyce JM, Medeiros AA, Papa EF, O' Gara CJ : Induction of β -lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob. Chemoth. 25 : 73-81, 1990.
15. Braude AI : Medical microbiology and infectious diseases. Philadelphia ; W. B. Saunder Cd. 1981.
16. Carlson JR, Conley FE, Cahall DL : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility testing with the Abbott MS-2 system. Antimicrob. Agents Chemoth. 21 : 676-677, 1982.
17. Chambers HF, Hackbarth CJ : Effect of NaCl and nafcillin on penicillin binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemoth. 31 : 1982-1988, 1987.
18. Cleary TJ, Maurer D : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility testing by an automated system, Autobac I. Antimicrob. Agents Chemoth. 13 : 837-841, 1978.
19. Craven DE, Reed C, Kollisch N, DeMarea A, Lichtenberg D, Shen K, McCabe WR : A large outbreak of infections caused by a strain of *Staphylo-*

- coccus aureus resistant to oxacillin and aminoglycosides. *Amer. J. Med.* 71 : 53-58, 1981.
20. French GL, Ling J, Ling T, Hui TW : Susceptibility of Hong Kong isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to antimicrobial agents. *J Antimicrob. Chemoth.* 21 : 599-588, 1988.
21. French GL, Ling J, Hui Y-W, Oo HKT : Determination of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by agar dilution and disc diffusion methods. *J. Antimicrob. Chemoth.* 20 : 599-608, 1987.
22. Frongillo RF, Donati L, Federico G, Martno P, Moroni M, Ortona L, Palumbo M, Pasticci M, Pizzigallo E, Privitera G, Serra P, Signorini M, Venditti M, Pauluzzi S : Clinical comparative study on the activity of cefamandole in the treatment of serious *Staphylococcal* infections caused by methicillin susceptible and methicillin resistant strain. : *Antimicrob. Agents Chemoth.* 29 : 789-796, 1986.
23. Guenther SH, Wenzel RP : In Vitro activities of teichomycin, fusidic acid flucloxacillin, fosfomycin, and vacomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 26 : 268-269, 1984.
24. Hansen SL, Freedy PK : Variation in the abilities of automated, commercial, and reference methods to detect methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 20 : 494-499, 1984.
25. Hartman BJ, Tomasz A : Expression of methicillin resistance in heterogenous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 29 : 85-92, 1986.
26. Hill RLR, Duckworth GJ, Casewell MW : Elimination of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mupirocin during a hospital outbreak. *J. Antimicrob. Chemoth.* 22 : 377-384, 1988.
27. Ikeda Y, Nishino T, Tanino T : Paradoxical antibacterial activity of cefmenoxime against *Proteus vulgaris*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 31 : 865-869, 1987.
28. Jevons MP : Celbenin resistant staphylococci. *Brit. Med. J.* 1 : 124-125, 1961.
29. Mateos-Mora M, Knapp CC, Washington II JA : Characterization of resistance phenotype and cephalosprin activity in oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 32 : 17-174, 1988.
30. McDougal LK, Thornsberry C : New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin resistant(heteroresistant) *Staphylococci*. *J Clin. Microbiol.* 19 : 482-488, 1984.
31. National committee for clinical laboratory standards. Proposed standard methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically. National committee for clinical laboratory standards. Villanova, Pa 1980.
32. Odenholt I, Holm SE, Cars O : Paradoxical effect of cloxacillin and benzylpenicillin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemoth.* 35 : 345-350, 1989.

33. OToole RD, Drew WL, Dahlgren BJ, Beaty HN : An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 13 : 257-263, 1970.
34. Owens WE : Evaluation of various antibiotics for induction of L form from *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *J Clin. Microbiol.* 26 : 2187-2190, 1988.
35. Owens WE, Nickerson SC : Morphologic study of *Staphylococcus aureus* L form, reverting and intermediate colonies *In Situ*. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 1382-1386, 1989.
36. Parker MT, Hewitt JH : Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, i : 800-804, 1970.
37. Sabath LD : Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Inter. Med.* 97 : 339-344, 1982.
38. Sabath LD : Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Inter. Med.* 97 : 339-344, 1982.
39. Sarvolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM : Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections : A new source for nosocomial outbreaks. *Ann. Inter. Med.* 97 : 325-329, 1982.
40. Schaeffler S : Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *J. Clin. Microbiol.*, 27 : 335-336, 1989.
41. Shanholtzer CJ, Peterson LR, Mohn ML, Moody Ja, Gerding DN : MBCs for *Staphylococcus aureus* as determined by microdilution and microdilution techniques. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 26 : 214-219, 1984.
42. Stratton CW, Liu C, Weeks LS : Activity of Ly146032 compared with that of methicillin, cefazolin, cefamandole, cefuroxime, ciprofloxacin and vancomycin against *Staphylococci* as determined by kill-kinetic studies. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 31 : 1210-1215, 1987.
43. Thornsberry C, McDougal LK : Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin resistant (heteroresistant) *Staphylococci*. *J Clin. Microbiol.* 18 : 1084-1091, 1983.
44. Traller EP, Arenzana JMG, Eguiluz GC, Cancer RC : Prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *Rev. Infect. Dis.*, 10 : 627-628, 1988.
45. Utsui Y, Yokota T : Role of an altered penicillin binding protein in methicillin and cephem resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 28 : 397-403, 1985.
46. Woods GL, Knapp CC, Washington JA : Relationship between cefamandole and cefuroxime activity against oxacillin resistant *Staphylococcus epidermidis* and oxacillin resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 31 : 1332-1337, 1978.
47. Woods GL, Knapp CC, Washington JA : Relationship between cefamandole and cefuroxime activity against oxacillin resistant *Staphylococcus epidermidis* and oxacillin resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 31 : 1332-1337, 1987.
48. Yabu K : Formation of vesiculated large bodies of *Staphylococcus aureus*

- L-form in a liquid medium. Microbiol. Immunol. 35 : 395-404, 1991.
49. Yamori S, Tsukamura M : Paradoxical effect of tween 80 between the susceptibility to rifampicin and streptomycin and susceptibility to ethambutol and sulfadimethoxine in the Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex. Microbiol. Immunol. 35 : 921-926, 1991.
 50. Yourassowsky E, Linden M-P, Crokaert F : Inoculum effect on growth delay time of oxacillin resistant strains of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis exposed to cefamandole, cefazolin, and cefuroxime. Antimicrob. Agents Chemoth. 34 : 505-509, 1990.
 51. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS : Characterization of four β -lactamase produced by Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemoth. 36 : 440-445, 1992.
-