

Amoxicillin/Clavulanate 7:1 혼합제와 4:1 혼합제의 주요 임상분리균에 대한 시험관내 감수성 비교

이종윤¹, 이재규², 이은정², 김의종^{1,2}

서울대학교 의과대학 검사의학교실¹, 서울대학교병원 임상의학연구소²

Comparison of In Vitro Susceptibility between 7:1 and 4:1 Mixtures of Amoxicillin and Clavulanate against Major Clinically-isolated Bacteria

Jongyoun Yi¹, Jae-Kyoo Lee², Eun-Joung Lee² and Eui-Chong Kim^{1,2}

Department of Laboratory Medicine¹, Seoul National University College of Medicine; Clinical Research Institute², Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Background : Amoxicillin/clavulanate (A/C) is a combination of a broad spectrum β -lactam antibiotic amoxicillin and the potent β -lactamase inhibitor clavulanate. A/C 7:1 combination is known to be equal in its clinical efficacy and to have less gastrointestinal adverse effects compared to conventional A/C 4:1 combination. We estimated in vitro antimicrobial activities of the 7:1 combination (AMOCCLA Duo) and the conventional 4:1 combination against clinical bacterial isolates known to be the major causes of acute otitis media or sinusitis.

Methods : Total 183 strains isolated from clinical specimens of patients at Seoul National University Hospital were tested for minimal inhibitory concentration (MIC). *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* were tested by microdilution broth method and other bacterial species by agar dilution method according to the recommendations of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Results : AMOCCLA Duo was compared with the 4:1 combination in respect to MIC₅₀, MIC₉₀ and MIC range. For total 183 strains (30 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 30 methicillin-susceptible *Staphylococcus epidermidis*, 25 penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, 42 penicillin-resistant *S. pneumoniae*, 33 *H. influenzae* and 23 *Moraxella catarrhalis*), mean MICs did not show statistically significant difference between the 2 combinations but they did for *H. influenzae* and *M. catarrhalis*.

Conclusions : As for the total test strains, in vitro antimicrobial activity of AMOCCLA Duo was equal to that of the conventional 4:1 combination. For each species, *H. influenzae* and *M. catarrhalis* showed significant difference between mean MICs of the 2 combinations but other species did not. We do not suppose, however, that in case of *H. influenzae* this difference is of practical and clinical significance according to the NCCLS interpretive criteria for MIC. Although *M. catarrhalis* showed statistically very significant difference of MICs, this difference can be clinically solved due to the higher dose of amoxicillin in AMOCCLA Duo. (*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(2):109-113)

Key words : Amoxicillin, Clavulanate, Minimal inhibitory concentration, In vitro susceptibility

“이 연구는 서울대학교병원 위탁연구비(과제번호: 06-02-47)의 지원에 의한 결과임”

접수번호: CM 6-2-02

교신저자: 김의종

(110-744) 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교병원 진단검사의학과

TEL : 02) 760-3500 FAX : 02) 764-3698

E-mail : euichong@snu.ac.kr

서론

Amoxicillin/clavulanate (A/C)는 광범위 베타락탐계 항균제인 amoxicillin과 강력한 β -lactamase 억제제인 clavulanate를 혼합한 약물이다. Clavulanate는 amoxicillin이 β -lactamase에 의해 가수분해되는 것을 막아주기 때문

에 A/C의 항균 작용 범위는 β -lactamase를 생산하여 베타 락탐계 항균제에 내성인 균주까지 넓어질 수 있다[1]. 또한 A/C는 장관내 흡수가 잘 되고 약동학적 특성 및 안전성이 뛰어나 주로 소아에서 급성중이염 및 부비동염 등의 감염 질환에 일차 치료 약제로 오랜 동안 널리 쓰여 왔다[2]. 기존에 통상적으로 처방되던 A/C 제제는 amoxicillin과 clavulanate의 비율을 4:1로 혼합한 것을 하루 3회 복용하도록 되어 있으나, 설사, 구토, 복통 등 소화기계 부작용이 비교적 흔하며 이의 빈도는 투여된 clavulanate의 용량에 대략 비례하는 것으로 알려져 있다[2]. 이에 비해 amoxicillin과 clavulanate를 7:1로 혼합하여 하루 2회 복용하도록 된 A/C 제제는 임상적 효능이 기존의 제제와 동일하면서 소화기계 부작용은 적은 것으로 알려졌다[1-4]. 아모크라 듀오는 최근 주식회사 건일제약에서 새로 제조한 A/C 제제(7:1 제제)로서, 기존의 혼합제(4:1 제제)보다 clavulanate가 소량 함유되어 있다. 본 연구는 시험관내에서 아모크라 듀오의 항균력을 기존의 혼합제와 비교하고자 하였으며, 이를 위해 최근에 분리되는 임상분리주 중 주로 중이염 또는 부비동염의 주요 원인균으로 알려진 균종에 대하여 두 혼합제의 최소억제농도 분포를 각각 구했다.

재료 및 방법

시험 균종

시험 균종은 서울대학교병원 진단검사의학과로 세균 배양이 의뢰된 임상 검체에서 분리한 균주로서 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 30주, methicillin-susceptible *Staphylococcus epidermidis* (MSSE) 30주, penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PSSP) 25주, penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) 42주, *Haemophilus influenzae* 33주, *Moraxella catarrhalis* 23주 등 중이염 또는 부비동염의 주요 원인균으로 알려진 통성 혐기성 세균 총 183주를 대상으로 하였다.

최소억제농도 측정

미국 임상검사표준화협회(National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS)에서 권장하는 방법[5]에 따라 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*를 제외한 균종은 한천희석법으로 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였으며, *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*는 microdilution broth 법으로 MIC를 측정하였다. 아모크라 듀오와 기존 A/C 4:1 혼합제의 10배 농축액을 제조하기 위해 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)에 A/C 7:1과 4:1 혼합제 원말을 각각 섞어 amoxicillin 농도가 1,280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 하였다. 이 농축액을 적절히 계단 희석하여 배지와 섞은 후의 최종 항균제 농도가 다음과

같이 되도록 하였다. 즉, 한천희석법의 경우 MIC의 검사 범위는 0.03 - 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, microdilution broth 법의 경우는 0.015 - 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. Mueller-Hinton Agar (MHA) 108 mL에 각 농도 단계의 항균제 용액을 12 mL 가하고, 각 단계마다 150-mm dish를 두 장씩 만들었다. 남은 MHA로 세균 증식을 확인하기 위하여 증식 대조 배지로서 항균제가 없는 MHA를 만들었다. 제조된 한천배지는 pH가 7.2 - 7.4의 범위 안에 들어가는지 확인하였다.

접종에 쓰일 균액 제조는 다음과 같이 하였다. 혈액한천배지에서 하룻밤 배양하여 증식한 균집락을 생리식염수에 풀어 0.5 McFarland 표준 탁도에 맞추었다. 이 균액 1 mL을 생리식염수 9 mL에 가하여 10배로 희석(10^7 CFU/mL)하였다. 96-well microplate에 한 well 당 100 μL 씩 한 균주 당 2개의 well에 가하였다. 한천배지에 일정한 균수를 접종하기 위하여 inoculum replicator를 사용하였으며 최종 접종 균수는 한 점 당 10^4 CFU가 되도록 하였다. 접종 순서는 항균제가 없는 증식 대조 배지(control MHA)에 처음 접종하고 최저 농도의 배지부터 먼저 접종하도록 하였다. 끝으로 다시 대조 배지에 접종하였다.

한천배지에 접종한 균을 35°C 에서 16 - 20 시간 배양하였다. 한 개의 균집락이 증식하였거나 아주 얇은 막(faint haze)을 형성한 경우 억제된 것으로 판정하였다. 두 개 이상의 균집락이 확실한 end point를 뛰어 넘어 계속 자랐거나 또는 저농도에서는 균증식이 없는데 고농도에서 균증식이 있는 경우 순수 분리 여부를 확인하고 재검하였다.

*S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 경우 각각 5% lysed horse blood를 첨가한 Mueller-Hinton broth와 Haemophilus test medium (HTM)을 사용하여 microplate를 제조하였다. 혈액한천배지에서 16-18 시간 배양한 균집락을 생리식염수에 풀어 0.5 McFarland 표준 탁도에 맞추고 cation-adjusted Mueller-Hinton broth 및 HTM 10 mL에 각각 해당하는 균액 100 μL 를 가한 후 이 균액 50 μL 를 microplate의 well에 접종하였다(최종 접종 균수: 5×10^4 CFU/well). 배양은 두 균종 모두 ambient air에서 실시하였다.

결 과

아모크라 듀오(AMOCLA Duo)의 MIC_{50} , MIC_{90} 와 MIC의 범위를 기존의 4:1 A/C 제제의 결과와 비교하여 Table 1과 Figure 1에 표시하였다.

아모크라 듀오와 4:1 A/C 제제에 대해 측정된 최소억제농도의 평균이 두 제형 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이는지를 각 균종별로 그리고 시험 대상이었던 모든 균주를 대상으로 paired t-test (양측 검정)를 통해 알아 보았다. P 값은 각 균종별로 계산하였을 때 MSSA, MSSE, PSSP, PRSP, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*에 대해 각각 0.0552, 0.516, 0.0831, 0.215, 0.0355, 0.000365로서 5% 유의수준에서는 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*에서 두 제형의 평균 최소억제농도 사이에 유의한 차이가 있는 것으로 나

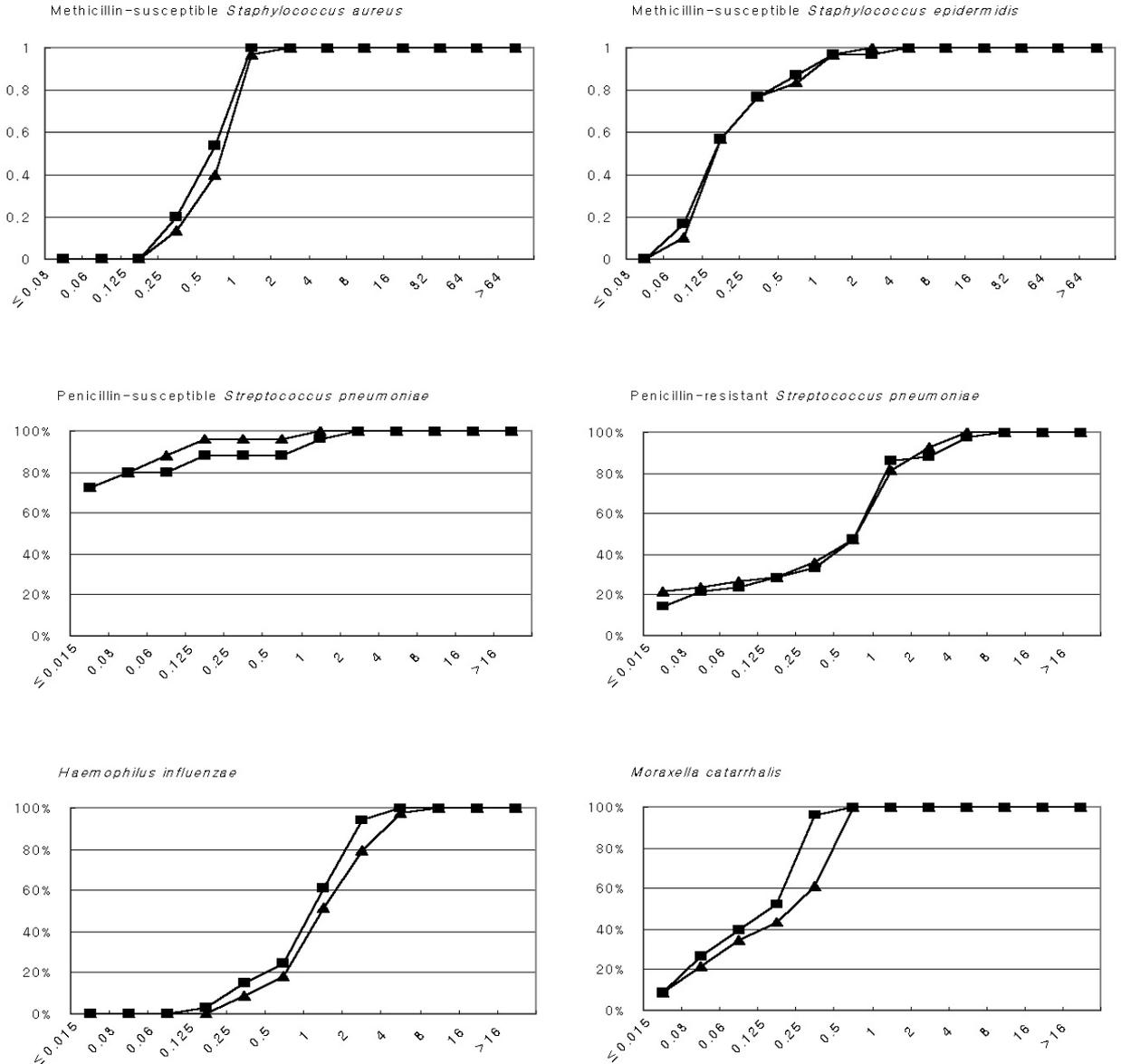


Fig. 1. MIC cumulative percentage curves of AMOCLA Duo and 4:1 amoxicillin/clavulanate. triangle, AMOCLA Duo; rectangle, 4:1 amoxicillin/clavulanate.

타났으며, 1% 유의 수준에서는 *M. catarrhalis*만 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 시험 대상이었던 모든 균주(총 183주)에 대해서는 P 값이 0.173으로 두 제형에 대한 평균 최소억제농도 간에 유의한 차이가 없었다.

고찰

Amoxicillin은 반합성 penicillin 유도체로 ampicillin과 그 구조가 유사하다. 다른 페니실린 계열의 항균제와 마찬가지로 amoxicillin도 penicillin-binding protein에 강하게 결합함으로써 세균의 세포벽 합성을 방해한다. Amoxicil-

lin의 항균 작용 범위는 피부 및 연부 조직, 요로, 상부 및 하부 호흡기의 감염을 일으키는 주요한 세균들을 포함한다. 그러나 β -lactamase를 생성하는 세균의 빈도가 증가함에 따라 amoxicillin 단일 제제로는 상기 감염증들에 대해 충분한 효과를 볼 수 없는 경우가 많아졌다. 특히 영유아에서 감염증의 주요 원인균들은 β -lactamase를 생성하는 *H. influenzae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis* 균주들이다[2]. 이러한 임상적으로 제한적인 상황을 극복하기 위해 amoxicillin과 clavulanate를 병합 사용하는 것은 매우 합리적인 접근 방법이다[1, 2].

환자들을 대상으로 A/C 7:1 혼합 제제와 기존의 4:1 혼

Table 1. In vitro activity of AMOCLA Duo in comparison with 4:1 amoxicillin/clavulanate

Microorganism	No. tested	Antimicrobial agents	MIC (mg/ml)		
			MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	30	AMOCLA Duo	1	1	0.25 - 2
		4:1 A/C	0.5	1	0.25 - 1
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	AMOCLA Duo	0.125	1	0.06 - 2
		4:1 A/C	0.125	1	0.06 - 4
Penicillin-susceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	AMOCLA Duo	≤0.015	0.125	≤0.015 - 1
		4:1 A/C	≤0.015	1	≤0.015 - 2
Penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42	AMOCLA Duo	1	2	≤0.015 - 4
		4:1 A/C	1	4	≤0.015 - 8
<i>Haemophilus influenzae</i>	33	AMOCLA Duo	1	4	0.25 - 8
		4:1 A/C	1	2	0.125 - 4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	23	AMOCLA Duo	0.25	0.5	≤0.015 - 0.5
		4:1 A/C	0.125	0.25	≤0.015 - 0.5

"Abbreviations: A/C, amoxicillin/clavulanate; MIC, minimal inhibitory concentration."

합 제제의 임상적 효능, 부작용의 빈도 및 환자들의 약물에 대한 순응도 등을 비교한 연구는 많이 있었으나[1, 3, 4, 6], 시험관내에서 여러 가지 임상 분리 균주들에 대하여 최소억제농도를 측정함으로써 감수성 양상을 보고한 바는 별로 없었다. 본 연구에서는 이 두 가지 비율의 A/C 혼합제 각각(아모크라 듀오와 기존 혼합제)에 대하여 최근 임상 검체에서 분리된 균주 중 중이염 또는 부비동염의 주요 원인균으로 알려진 통성 혐기성 세균 총 183주의 최소억제농도를 측정하여 시험관내에서 두 혼합제의 항균력을 비교 평가하였다. 앞서 결과 부분에서 기술한 바와 같이 전체 시험 대상 균주에 대하여 두 혼합제의 평균 최소억제농도 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

그러나 균종별로 두 혼합제의 평균 최소억제농도를 비교하였을 때 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*는 5% 유의 수준에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으며, 특히 *M. catarrhalis*의 경우 *P* 값이 매우 작아(0.000365) 통계적으로는 매우 유의한 차이를 보였다. 이 두 균종의 MIC 누적 백분을 곡선(Fig. 1)을 보면 아모크라 듀오의 MIC가 기존 혼합제보다 약간 높은 경향을 보이고 있다. 이와 같이 β -lactamase를 생성하는 균주의 빈도가 높은 두 균종(*H. influenzae*와 *M. catarrhalis*)에서 A/C 7:1 혼합 제제인 아모크라 듀오가 기존의 4:1 제제에 비해 MIC가 약간 높은 경향을 보이는 것은 아모크라 듀오가 기존 혼합제보다 일정량의 amoxicillin에 대한 clavulanate의 함량이 적기 때문일 가능성이 있다. Table 1에 표시된 두 균종의 MIC₅₀과 MIC₉₀을 보면, *H. influenzae*의 경우 두 혼합제의 MIC₅₀은 같았고 MIC₉₀은 아모크라 듀오가 기존 혼합제보다 한 단계(2배씩 연속적으로 단계 희석) 높게 나타났다. *M. catarrhalis*의 경우는 아모크라 듀오의 MIC₅₀과 MIC₉₀이 기존 혼합제보다 모두 한 단계 높았다. 그러나 NCCLS의 MIC

해석 기준[7]에서 *H. influenzae*는 amoxicillin 농도가 4 μ g/mL 이하이면 감수성이며 이에 따르면 본 연구의 결과에서 시험 대상이었던 *H. influenzae* 33 균주 중 아모크라 듀오에 대해서는 32균주가 감수성, 기존 혼합제에 대해서는 33균주 모두 감수성이었으므로, 전술한 두 혼합제 간의 MIC 차이는 통계적으로는 유의한 차이일지라도 실제적으로 크게 의미 있는 차이는 아닌 것으로 생각된다.

다른 균종에 대하여도 이와 같이 NCCLS의 MIC 해석 기준을 적용하여 보면, MSSA와 MSSE는 모든 시험 균주(각 30주)가 아모크라 듀오 및 기존 혼합제에 대해 감수성을 보였다. PSSP는 총 25균주 중 아모크라 듀오에 대해서는 감수성이 24주, 중간내성(intermediate)이 1주였고 기존 혼합제에 대해서는 감수성, 중간내성, 내성이 각각 22주, 2주, 1주로 나타났다. PRSP는 총 42균주 중 아모크라 듀오에 대해서는 감수성, 중간내성, 내성이 각각 20주, 14주, 8주였고 기존 혼합제에 대해서는 감수성, 중간내성, 내성이 각각 20주, 16주, 6주였다.

이와 같은 MIC 측정 결과로부터 MSSA, MSSE, PSSP, PRSP 및 *H. influenzae*에서 아모크라 듀오가 기존 4:1 혼합제와 비교하여 실제적으로 항균력이 별 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. *M. catarrhalis*에서는 두 혼합제의 평균 MIC에 통계적으로 유의한 차이가 있었고 아모크라 듀오의 MIC가 기존 혼합제보다 더 큰 경향을 보였다. 하지만 *M. catarrhalis*의 경우 NCCLS에서 지정한 MIC 해석 기준이 없어 감수성 및 내성 양상을 명확하게 판정하기 어려우므로 두 혼합제 간의 MIC 차이가 어떠한 실제적, 임상적 의미를 가지는지에 대해서는 후속 연구가 필요할 것으로 생각되며, 또한 아모크라 듀오의 경우 기존의 4:1 혼합제에 비하여 amoxicillin의 용량을 증가하였으므로 MIC 누적분포의 차이를 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

배 경 : Amoxicillin/clavulanate (A/C)는 광범위 베타람탐계 항균제인 amoxicillin과 강력한 β -lactamase 억제제인 clavulanate를 혼합한 약물이다. 기존에 통상적으로 처방되던 A/C 4:1 혼합제와 비교했을 때 A/C 7:1 혼합제는 임상적 효능이 동일하면서 소화기계 부작용이 적어 환자의 약물 순응도가 더 좋은 것으로 알려졌다. 저자들은 임상분리주 중 중이염 또는 부비동염의 주요 원인균인 균종에 대하여 7:1 혼합제인 아모크라 듀오(AMOCCLA Duo)의 시험관내 항균력을 기존 4:1 혼합제와 비교 평가하고자 하였다.

방 법 : 시험 균종은 서울대학교병원 진단검사의학과로 세균배양이 의뢰된 임상 검체에서 분리된 균주로서 중이염 또는 부비동염의 주요 원인균으로 알려진 통성 혐기성 세균 총 183주를 대상으로 하였다. 미국 임상검사 표준화협회(NCCLS)에서 권장하는 방법에 따라 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*를 제외한 모든 균종은 한천희석법으로 MIC를 측정하였으며, *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*는 microdilution broth 법으로 MIC를 측정하였다.

결 과 : 아모크라 듀오와 기존 4:1 제제의 MIC₅₀, MIC₉₀ 및 MIC 범위를 총 183 균주(MSSA 30주, MSSE 30주, PSSP 25주, PRSP 42주, *H. influenzae* 33주, *M. catarrhalis* 23주)에 대하여 비교하였을 때, 전체 시험 균주에 대해서는 두 혼합제의 평균 MIC 간에 유의한 차이가 없었으나 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*에서는 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.

결 론 : 시험 균주 전체로 보아 아모크라 듀오의 시험관내 항균력은 기존 4:1 혼합제와 동등하였다. 균종별로는 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*에서 두 제제 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였고 다른 균종에서는 뚜렷한 차이가 없었다. 그러나 *H. influenzae*의 경우 두 혼합제 간의 MIC 차이는 통계적으로는 유의한 차이일지라도 실제적으로 크게 의미 있는 차이는 아닌 것으로 생각된다. *M.*

*catarrhalis*는 두 혼합제 간에 통계적으로는 유의한 차이를 보였지만, 아모크라 듀오의 경우 기존의 4:1 혼합제에 비하여 amoxicillin의 용량을 증가하였으므로 MIC 누적 분포의 차이를 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Behre U, Burow H-M, Quinn P, Cree F, Harrison HE. *Efficacy of twice-daily dosing of amoxycillin/clavulanate in acute otitis media in children.* *Infection* 1997;25:163-6
2. Reed MD. *Clinical pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanate.* *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:945-54
3. Damrikarnlert L, Jauregui AC, Kzadri M. *Efficacy and safety of amoxycillin/clavulanate twice daily versus three times daily in the treatment of acute otitis media in children.* *J Chemother* 2000;12:79-87
4. Jacobsson S, Fogh A, Larsson P, Lomborg S. *Evaluation of amoxicillin clavulanate twice daily versus thrice daily in the treatment of otitis media in children.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:319-24
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000*
6. Feldman W, Sutcliffe T, Dulberg C. *Twice-daily antibiotics in the treatment of acute otitis media: trimethoprim-sulfamethoxazole versus amoxicillin-clavulanate.* *Can Med Assoc J* 1990;142:115-8
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement, M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002*