

Original article

Assessment of the synergistic effect of seven antimicrobial combinations on extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains

Choon-Mee Kim^{1*}, Young-Jin Ko^{2*}, Ji Ae Choi³, Seong-Ho Kang², Geon Park², Sook-Jin Jang²

¹Premedical Science, ²Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, Gwangju, ³Division of Infectious Disease Investigation 2, Jeollanam-do Institute of Health and Environment, Suncheon, Korea

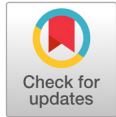
*These authors contributed equally to this work.

광범위 약제내성 *Acinetobacter baumannii* 균주에 대한 7가지 항균물질 조합의 상승 효과 평가

김춘미^{1*}, 고영진^{2*}, 최지애³, 강성호², 박건², 장숙진²

조선대학교 의과대학 ¹의예과, ²진단검사의학교실, ³전라남도 보건환경연구원 감염병조사2과

*이 저자들은 이 논문에 똑같이 기여했습니다.



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2022 December, 25(4): 125-136
<https://doi.org/10.5145/ACM.2022.25.4.3>

Corresponding author

Sook-Jin Jang

E-mail: sbjjang@chosun.ac.kr

Received: September 02, 2022

Revised: December 01, 2022

Accepted: December 08, 2022

© 2022 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: To solve the difficulty in determining the appropriate treatment regimen for patients infected with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAB), it is necessary to develop various strategies to increase the therapeutic effect of antimicrobial agents. The purpose of this study was to select the treatment combination showing the greatest antimicrobial effect among seven candidate antimicrobial substances.

Methods: Seven strains of XDRAB were used in this study. The composition of the treatment consisted of colistin as the base and one of the seven antimicrobial substances, doripenem, minocycline, tigecycline, linezolid, fusidic acid, vancomycin, or alyteserin E4K peptide. The interaction between the drugs in each combination was evaluated by measuring the synergy rates using time-kill analysis.

Results: The synergy rates of the seven combinations tested in the time-kill assay in this study were as follows, in descending order from the combination with the highest synergy rate: colistin + minocycline (57.1%), colistin + alyteserin E4K (50.0%), colistin + tigecycline (42.9%), colistin + vancomycin (28.6%), colistin + doripenem (14.3%), colistin + fusidic acid (14.3%), and colistin + linezolid (0%). None of the combinations showed antagonism. The three combinations showing bactericidal activity and the rates of their bactericidal activity were colistin + alyteserin E4K combination (33.3%), colistin + minocycline (14.3%), and colistin + vancomycin (14.3%).

Conclusion: The colistin + minocycline and colistin + alyteserin E4K treatment combinations, which showed high synergy rates, can be considered as promising candidates for future *in vivo* experiments evaluating combination therapies.

Keywords: Drug Combinations, Synergy, Colistin, Minocycline, Antimicrobial cationic peptides

Introduction

Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB)가 만연해 있고 이에 감염된 환자 치료를 위한 적절한 항균제를 찾기 어려운 문제를 해결하기 위해 항균제의 치료효과를 높이고 내성 생성을 억제하기 위한 다양한 전략 개발이 시급하다. MDRAB로 인한 감염증 환자 치료에 전통적으로 사용되어 왔던 항균제 뿐만 아니라 통상적으로 잘 사용되어오지 않았던 항균제를 포함한 비정통적인 항균제 병합요법(unorthodox Antimicrobial Combination Therapies)을 시도하는 전략도 제시되고 있다.

항균제 내성을 극복하기 위한 새로운 전략의 일환으로 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)와 같은 대체 항균제에 대해서도 연구가 수행되어 왔다. 항균 펩타이드 중에서도 Alyteserin-2a (ILGKLLSTAAGLLSNL.NH₂)는 산파두꺼비인 *Alytes obstetricans*의 피부 분비물에서 처음 분리된 양이온성 α -나선형 펩타이드이다[1]. 몇가지 Alyteserin 펩타이드중 alyteserin-1c E4K 펩타이드(이하 alyteserin E4K로 약칭)는 다제 내성 *A. baumannii* 균주에 대해 강력한 성장 억제 활성이 있다고 보고되었다[2].

본 연구의 목적은 우수한 병합효과를 보이는 조합을 선별하기 위해 다양한 조합의 병합효과를 비교하는데 있다. 이를 위해 7가지 항균물질을 colistin과 각각 조합한 7종의 병합제에 대해 7주의 extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAB)를 대상으로 그 효과를 각각 조사하였다. 즉 *A. baumannii* 균에 대해 흔히 사용되는 약제들로 구성된 colistin + doripenem 조합과 colistin + minocycline 조합, 비교적 최근에 개발된 tigecycline을 사용한 colistin + tigecycline 조합; 그람음성세균에 쓰지 않았던 비정통적인 약제들로 구성된 colistin + linezolid 조합과 colistin + fusidic acid 조합, colistin + vancomycin 조합; 그리고 항균 펩타이드인 alyteserin E4K를 사용한 colistin + alyteserin E4K 조합에 대해서 약제간 상호작용을 연구하였다. 이러한 통상적 조합과 비정통적 조합 및 항균 펩타이드를 포함한 조합의 항균력을 비교하여 우수한 병합효과를 보이는 조합을 선별하여 향후 생체내 실험에 사용할 후보로 제시하고자 한다.

Materials and methods

대상 및 검체 수집

2008년 1월부터 2012년 12월까지 5년간 조선대학교병원에서 세균배양검사가 의뢰된 검체 중, *A. baumannii*로 동정되어 냉동보관해왔던 *A. baumannii* 중 XDRAB 균주 7주를 대상으로 분석, 조사하였다. 균주들은 두 번 계대배양 후 실험에 사용하였다. 균종 동정은 VITEK 2 System (bioMérieux, Marcy-l Etoile, France)를 이용하여 VITEK2 GN 카드(bioMérieux)로 검사하여 *A. baumannii*로 동정된 균주들을 대상으로 *bla*_{OXA-51-like} polymerase chain reaction (PCR) [3]과 Higgins PCR [4]을 시행하여 모두 양성인 경우 *A. baumannii*로 동정하였다. 항균제 감수성 검사는 VITEK2 System을 이용하여 AST-N225 카드로 검사하여 수행하였다. XDRAB 균주 여부는 Magiorakos 등[5]이 제시한 기준에 따라 아래와 같이 판단하였다. *Acinetobacter* 균종에 대한 multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) 및 pandrug-resistant (PDR) 세균을 정의한 기준표에 열거된 항균제 중 2개 이하의 항균제 범주를 제외한 모든 범주에서 각 범주당 최소 1개의 제제에 대해 감수성이 없는 *A. baumannii*

를 XDRAB라고 정의하였다[5]. 검사된 항균제에 모두 비감수성인 균주일지라도 기준표에 열거된 항균제에 대한 감수성 검사를 다 하지 못한 경우 Magiorakos의 기준에 따라 XDRAB로 분류하였다[5]. XDRAB로 분류된 균주들 중에서도 되도록 감수성인 항생제가 없거나 1개 이하인 세균을 선별하여 검사대상으로 선택하였다.

Time-kill 분석 및 alyteserin E4K에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC) 측정

Time-kill 분석을 시행한 각 균주의 농도는 항균물질과 섞었을 때 최종 농도가 1×10^6 CFU/mL 가 되도록 맞춰 Mueller-Hinton (MH) broth에 첨가했다. 사용한 항균물질과 농도는 colistin 2 μ g/mL [6], doripenem 8 μ g/mL [7], fusidic acid 1 μ g/mL [6], linezolid 8 μ g/mL [8], minocycline 4 μ g/mL [9], tigecycline 2 μ g/mL [10], vancomycin 32 μ g/mL [11]이었다. Alyteserin E4K는 각 균주별로 $1/4 \times$ MIC에 해당하는 농도를 사용했다. 연구대상 XDRAB 7주의 alyteserin E4K에 대한 MIC 범위가 20-80 μ g/mL이었기에 각 균주별로 $1/4 \times$ MIC에 해당하는 농도(5-20 μ g/mL)를 각각 넣어 실험하였다. MH Broth에 항균물질과 균주가 접종된 시험관을 37°C 진탕 배양기에서 0시간과 24시간동안 배양한 균액을 취해서 10배 계단희석하고, 희석액을 MH agar plate에 접종하여 하룻밤 배양 후 총 집락수를 산정하였다[12].

24시간 배양 후, 가장 활성이 높은 단독약제 처리조건에서 자란 균 수보다 병합제 처리조건에서 자란 균 수가 $2 \log_{10}$ CFU/mL 이상 감소한 경우 상승효과가 있다고 판정하였다. 무관(indifference) 반응은 균 수가 $2 \log_{10}$ CFU/mL미만으로 증가 또는 감소했을 경우이며, 길항(antagonistic) 반응은 $2 \log_{10}$ CFU/mL이상으로 증가한 경우로 정의하였다[13]. 최초 균접종량보다 24시간 배양 후 균 수가 $3 \log_{10}$ CFU/mL 이상 감소했을 때 살균력이 있다고 판정하였다[13].

항균물질의 MIC 측정과 time-kill 분석에 사용한 항균제는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다. Alyteserin E4K peptide (이하 alyteserin E4K)는 애니젠(AnyGen, Inc., Gwangju, Korea) 회사에 98% 순도로 주문제작하였다. Alyteserin E4K에 대한 최소억제농도(MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute guideline에 따라 액체배지미량희석법(broth microdilution assay)으로 측정하였다[14].

Results

7종의 항균물질 조합에 대한 time-kill 분석 결과는 Table 1과 Supplementary Table 1(Supplementary Table 1 in the online-only Data Supplement)에 제시되어 있다. 항균물질을 단독으로 사용했을 때는 균 성장 저해가 관찰되지 않았다. 항균물질 조합을 사용했을 때 상승효과율이 높았던 조합부터 내림차순으로 기술하면 colistin + minocycline 조합의 상승효과율이 57.1%로 가장 높았고 그 다음 순으로는 colistin + alyteserin E4K 조합이 50%, colistin + tigecycline 조합이 42.9%, colistin + vancomycin 조합이 28.6%, colistin + doripenem 조합과 colistin + fusidic acid 조합이 둘다 14.3%, colistin + linezolid 조합이 0%였다.

Table 1. Results of time-kill assay against two-drug combinations of colistin and various antibiotics or a peptide for seven extensively drug-resistant *A. baumannii* clinical isolates

| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination – VCMASA) at 24 hr | Interaction | Bactericidal activity* |
|--------|---------------------|--------------|-------------------------|--|----------------------|------------------------|
| | Colistin | Doripenem | Colistin + Doripenem | | | |
| 111-27 | 9.2 | 9.2 | 9.9 | 0.7 | I [†] | NB |
| 111-28 | 9.3 | 9.2 | 9.4 | 0.2 | I | NB |
| 111-29 | 8.6 | 9.5 | 9.5 | 0.9 | I | NB |
| 111-31 | 10.1 | 9.8 | 9.2 | -0.6 | I | NB |
| 64-26 | 9.1 | 9.3 | 3.4 | -5.8 | Synergy [‡] | NB |
| 131-16 | 6.1 | 9.2 | 5.4 | -0.7 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 9.4 | 8.0 | 0.0 | I | NB |
| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination – VCMASA) at 24 hr | Interaction | Bactericidal activity |
| | Colistin | Tigecycline | Colistin + Tigecycline | | | |
| 111-27 | 9.2 | 9.1 | 9.3 | 0.2 | I | NB |
| 111-28 | 9.3 | 9.4 | 8.5 | -0.8 | I | NB |
| 111-29 | 8.6 | 9.9 | 9.0 | 0.4 | I | NB |
| 111-31 | 10.1 | 8.1 | 5.1 | -3.0 | Synergy | NB |
| 64-26 | 9.1 | 9.4 | 6.4 | -2.7 | Synergy | NB |
| 131-16 | 6.1 | 9.2 | 6.4 | 0.3 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 8.5 | 4.5 | -3.5 | Synergy | NB |
| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination – VCMASA) at 24 hr | Interaction | Bactericidal activity |
| | Colistin | Linezolid | Colistin + Linezolid | | | |
| 111-27 | 9.2 | 8.1 | 9.3 | 1.2 | I | NB |
| 111-28 | 9.3 | 9.5 | 9.4 | 0.1 | I | NB |
| 111-29 | 8.6 | 9.4 | 9.0 | 0.4 | I | NB |
| 111-31 | 10.1 | 9.4 | 9.4 | 0.0 | I | NB |
| 64-26 | 9.1 | 9.2 | 9.3 | 0.2 | I | NB |
| 131-16 | 6.1 | 9.4 | 7.4 | 1.3 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 10.0 | 8.3 | 0.3 | I | NB |
| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination – VCMASA) at 24 hr | Interaction | Bactericidal activity |
| | Colistin | Fusidic acid | Colistin + Fusidic acid | | | |
| 111-27 | 9.2 | 9.3 | 3.8 | -5.4 | Synergy | NB |
| 111-28 | 9.3 | 9.3 | 9.2 | -0.1 | I | NB |
| 111-29 | 8.6 | 10.2 | 9.4 | 0.8 | I | NB |
| 111-31 | 10.1 | 9.9 | 9.4 | -0.5 | I | NB |
| 64-26 | 9.1 | 9.3 | 9.4 | 0.3 | I | NB |
| 131-16 | 6.1 | 9.3 | 6.4 | 0.3 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 9.5 | 8.3 | 0.3 | I | NB |
| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination – VCMASA) at 24 hr | Interaction | Bactericidal activity |
| | Colistin | Minocycline | Colistin + Minocycline | | | |
| 111-27 | 9.2 | 3.3 | 1.8 | -1.5 | I | B |
| 111-28 | 9.3 | 8.5 | -1.0 | -3.2 | Synergy | NB |
| 111-29 | 8.6 | 9.4 | 5.4 | -3.2 | Synergy | NB |
| 111-31 | 10.1 | 9.4 | 5.8 | -3.6 | Synergy | NB |
| 64-26 | 9.1 | 4.2 | 3.4 | -0.9 | I | NB |
| 131-16 | 6.1 | 5.3 | 4.2 | -1.2 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 5.5 | 3.2 | -2.3 | Synergy | NB |

Table 1. Results of time-kill assay against two-drug combinations of colistin and various antibiotics or a peptide for seven extensively drug-resistant *A. baumannii* clinical isolates (continued)

| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination - VCMASA) at 24 hr | Interaction Colistin + Vancomycin | Bactericidal activity Colistin + Vancomycin |
|--------|---------------------|------------|-----------------------|--|--------------------------------------|--|
| | Colistin | Vancomycin | Colistin + Vancomycin | | | |
| 111-27 | 9.2 | 9.2 | 1.5 | -7.7 | Synergy | B |
| 111-28 | 9.3 | 9.2 | 9.4 | 0.1 | I | NB |
| 111-29 | 8.6 | 8.2 | 9.1 | 0.9 | I | NB |
| 111-31 | 10.1 | 9.5 | 8.6 | -0.9 | I | NB |
| 64-26 | 9.1 | 9.0 | 6.1 | -2.9 | Synergy | NB |
| 131-16 | 6.1 | 9.2 | 6.4 | 0.3 | I | NB |
| 130-87 | 8.0 | 9.2 | 6.6 | -1.4 | I | NB |

| Strain | Log10 (VC) at 24 hr | | | Log10 (VC combination - VCMASA) at 24 hr | Interaction Colistin + Alyteserin E4K | Bactericidal activity Colistin + Alyteserin E4K |
|--------|---------------------|----------------|---------------------------|--|--|--|
| | Colistin | Alyteserin E4K | Colistin + Alyteserin E4K | | | |
| 111-27 | 9.1 | 9.1 | 4.2 | -4.9 | Synergy | NB |
| 111-28 | 9.3 | 9.3 | 9.2 | -0.1 | I | NB |
| 111-29 | 9.4 | 9.4 | 9.3 | -0.1 | I | NB |
| 111-31 | 9.3 | 9.3 | 0.0 | -9.3 | Synergy | B |
| 64-26 | 9.4 | 9.4 | 9.3 | -0.1 | I | NB |
| 131-16 | 9.2 | 9.2 | 0.0 | -9.2 | Synergy | B |
| 130-87 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

* $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL reduction compared with the initial inoculum; $^\dagger < 2 \log_{10}$ change in CFU/mL at 24 hr with the combination compared with the most active single agent; $^\ddagger \geq 2 \log_{10}$ CFU/mL reduction with the combination compared with the most active single agent of 24hr.

Abbreviation: VC, viable colony count; I, Indifference; NB, non-bactericidal; B, bactericidal; ND, not done; MASA, most active single agent.

항균물질간 병합효과를 검사했던 7가지 조합 중 항균물질간 길항 반응을 보인 조합은 없었다. Alyteserin E4K peptide와 7종의 항균제(colistin, doripenem, tigecycline, linezolid, fusidic acid, minocycline, vancomycin) 모두에서 단독제제로 살균능(bactericidal activity)을 보인 균주는 없었다. 병합제제의 살균비율을 조합별로 보면 colistin + alyteserin E4K 조합이 33.3% (2/6)로 가장 높았고 colistin + minocycline 조합과 colistin + vancomycin 조합이 둘다 각각 14.3% (1/7)로 그 다음 순위였고 다른 조합에서는 살균능을 관찰할 수 없었다.

Discussion

본 연구에서 검사한 약제조합 7종의 병합 효과를 XDRAB나 MDRAB 균을 대상으로 time-kill 분석을 시행했던 이전 연구 결과와 비교하여 살펴보았다.

Colistin + minocycline 조합의 상승효과율은 57.1%로 본 연구에서 가장 높은 상승효과율을 보였으나 92.3%의 상승효과율을 보였던 Tan 등[15]의 보고에 비하면 상승효과율이 낮은 편이었다[16].

본 연구에서 두번째로 높은 상승효과율을 보였던 colistin + tigecycline 조합의 상승효과율은 42.9%로서 4.1~100%의 상승효과율을 보였던 타논문의 상승효과율 범위 내에 있었다[16-19].

Principe 등[17]은 체커보드법으로 상승효과를 보이는 균주들을 먼저 선별한 후 time-kill 기법으로 확인 검사를 한 후, 두 분석법에서 모두 상승효과를 보이는 조합만 시너지 상호 작용을 보인다고 판독하는 방법으로 MDRAB에 대한 colistin + tigecycline 조합의 상호작용을 검사했다. 체커보드 선별법으로 24주 중 2주(8.3%)가 상승작용을 보였고 그 2주 중 1주가 time-kill 확인검사에 상승

작용을 보여서 상승효과율은 4.2% (1/24)이었다. 이 균주에서 사용한 tigecycline / colistin 약제 농도는 각각 2 / 0.25 mg/L 이었는데 이는 본 연구에서 사용한 tigecycline / colistin 약제 농도인 2 / 2 mg/L 에 비해 낮은 농도였다. 또한 그들은 두 검사법에 모두 상승효과가 나올 때 상승효과로 인정하였고 time-kill 기법으로 24주 전부를 다 검사한 것이 아니므로 이런 요인들도 그 연구의 낮은 상승효과율에 영향을 주었을 가능성이 있다고 보인다. Peck 등[18]은 imipenem 내성 *A. baumannii* 혈액 분리주 6주를 *in vitro* time-kill 실험으로 조사하였을 때 colistin + tigecycline 조합에 대해 $1 \times \text{MIC}$ 농도로 약제를 넣어 검사 시 6주 모두(100%) 상승작용을 보였으나 $0.5 \times \text{MIC}$ 농도로 넣어 검사 시 6주 중 4주 (66.7%)가 상승작용을 보였다.

Vidaillac 등[20]은 *A. baumannii* 4주를 대상으로 colistin + vancomycin 조합의 정적(static) time-kill 분석을 했을 때 $0.5 \times \text{MIC}$ 약제농도에서 4주 모두(100%) 상승효과율을 보였고 $0.25 \times \text{MIC}$ 약제농도에서 3주(75%)가 상승효과율을 보였다고 했으나, 본 연구에서는 colistin + vancomycin 조합의 상승효과율이 28.6%라 상당히 낮았다. Vidaillac 등[20]의 실험결과가 사용한 약제농도($0.25 \times \text{MIC}$ 또는 $0.5 \times \text{MIC}$)에 따라 상승효과율이 달라지는 것을 보여주기 때문에 서로 다른 항균제 농도를 사용한 Vidaillac 등과 본 연구의 상승효과율 차이 중 일부는 약제농도에 따른 자연적인 차이에 기인했을 가능성이 있다고 생각된다.

본 연구에서 colistin + doripenem 조합의 상승효과율은 14.3%로 20.8%~100%의 상승효과율을 보였던 타논문의 상승효과율 범위보다 낮았다[16,21,22]. Pankuch 등[21]이 *A. baumannii* 25주로 time-kill 분석을 했을 때 colistin + doripenem 조합은 MIC 보다 낮은 농도에서 모든(100%) 분리주에 대해 상승작용을 보였다. Principe 등[22]이 MDRAB를 대상으로 colistin + doripenem 조합의 상호작용을 검사했을 때 체커보드 분석에서는 24주 중 8주가 상승 효과를 보였고 그 8주 중 5주가 time-kill 확인검사서 상승 효과를 나타냈다. 그들은 두 검사법에 모두 상승효과가 나올 때 상승효과가 있다고 판독했기에 상승효과율은 20.8% (5/24)였고 체커보드 분석에 양성인 균주만 time-kill 확인검사를 했기 때문에 상승효과율이 타 연구에 비해 비교적 낮았을 것으로 생각된다. 그들의 연구에서 동일한 역학 유형을 공유하는 *A. baumannii* 분리주들간에 같은 약제 조합에 대한 상호작용이 서로 달랐는데 이는 균주들마다 보유한 내성 결정 인자들의 이질성에 기인했을 가능성이 있다고 해석되었다 [22]. 이런 현상은 동일한 유전자 지문 및 내성 패턴을 보이는 동일 클론의 균주들도 약제 병합효과를 각각 검사할 필요성이 있음을 제시해준다[22]. 한 연구에서 검사된 동일한 클론의 균주들간에도 같은 약제조합에 대한 병합효과가 다르다면, 서로 다른 연구들에서 상승효과율이 서로 다른 것은 자연스러운 현상으로 보이며, 그 차이는 기여 요인을 간단히 설명하기 어려운 여러 관련인자들이 복합적으로 작용하여 나타나는 현상으로 생각된다.

Phee 등[6]은 11주의 *A. baumannii* (MDRAB 3주, XDRAB 4주, PDRAB 3주, type strain 1주)에 대해 colistin + fusidic acid 병합제의 효과에 대해 디스크 확산법 및 체커보드 방법(11/11, 100%)과 time kill 분석법(6/6, 100%)으로 평가했을 때 모두 상승 효과가 입증되었다고 보고했으나 본 연구에서 colistin + fusidic acid 조합의 상승효과율은 14.3%로 상당히 낮았다.

Ma 등[23]은 MDRAB 및 XDRAB 주사로 폐렴을 유발시킨 쥐 모델에서 colistin-linezolid 조합은 생체내에서 colistin 단독 처치에 비해 살균 및 상승 효과가 있었기 때문에 MDRAB 및 XDRAB에 의해 유발된 중증 폐 감염에 대한 치료 대안으로서 colistin-linezolid 병용 요법의 상승 효과가 밝혀졌다고 했다. 반면 본 연구에서는 colistin-linezolid 조합은 생체의 실험에서 상승효과율이 0%이었다.

본 연구에 사용된 검체 수가 7주에 불과하였기 때문에 상승효과율이나 그 순위가 일반적인 *A. baumannii* 균의 성적을 대표한다고 보기는 어렵지만 본 연구에서 실험한 여러 항균제 조합들의 상승효과율이 타 논문의 상승효과율보다 낮은 경향을 보인 이유는 확실치 않다. 이런 차이를 내는데 영향을 미칠 수 있다고 생각되는 요인으로는 균주의 특성이나 내성기전의 차이, 지역적 차이, 환경적 영향 및 실험방법이나 조건, 결과 해석 기준, 사용한 항균제 농도의 차이 등 여러 요인에 의해 차이가 났을 가능성이 있다고 생각되었다. 본 연구에서 실험한 균주 수가 작고 각 균주에 대해 몇 가지 검사만 했기 때문에 균주들의 상승효과율에 영향을 주는 요인이나 서로 상호작용하는 여러 요인들간의 연관관계를 찾기 어려운 점은 본 연구의 한계점이라고 생각된다.

연구간 상승효과율의 차이에 기여할 수 있다고 보이는 여러 요인들 중 약제 조합 및 균주의 특성에 따라 살균비율 및 상승효과율이 달랐던 결과를 Oliva 등[24]의 연구에서 관찰할 수 있었다. time-kill 검사에서 colistin + meropenem 및 colistin + tigecycline 조합은 colistin 감수성주와 colistin 저도내성주에 대해서만 살균능 및 상승 작용을 나타냈던 반면 colistin + vancomycin 및 colistin + rifampin 조합은 colistin 고도내성주까지 포함된 3주 모두에 대해 살균능 및 상승 작용을 나타냈다 [24]. 그러나 time-kill 검사를 시행한 균주 수가 3주에 불과하여 이 균주들의 결과가 일반적인 경향을 대표할지 여부는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 반면 MDRAB 22주에 대해 다양한 항-아시네토박터 화학요법제와 doripenem을 병합하여 체커보드법으로 약제간 상호작용을 실험했을 때 13주(54.2%)가 상승작용을 보였는데 놀랍게도 상승작용은 doripenem 비감수성 균주에서만 감지되었다는 보고도 있다[22]. 균주 수에 따라 결과의 대표성은 달라질 수 있겠지만 약제 조합 및 균주의 특성을 포함한 여러 요인들에 따라 살균비율 및 상승효과율의 결과가 달라질 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 다양한 요인들의 영향이 복합적으로 작용하여 논문별로 결과 차이가 나왔을 가능성이 있다고 보인다.

본 연구대상 균주 중 111-27 균주가 살균능을 보였는데도 time-kill 분석에서 두 약제간 상호작용이 무관반응(indifference)을 보인 이유는 minocycline 단독으로도 항생효과가 뛰어나서 그 집락 수가 병합제로 처리했을 때에 비해 100배 이상 차이가 나지 않았기 때문이다. 이러한 현상은 다른 메타분석연구에서도 관찰된 예가 있다. Zusman 등[25]은 메타분석에 포함시킨 연구대상 논문 중 imipenem과 colistin을 조사한 3건의 연구는 colistin 단독 요법에서 매우 높은(100%) 살균능을 보여 줌으로서 상승효과의 입증이 불가능하였다고 언급하였다. 그래서 이들 연구를 제외하고 분석한 결과 imipenem - colistin 시너지율이 67%로 향상되었음을 보여주었다. 이런 결과는 균주의 특성에 따라 약제 조합에 대한 반응이 달라진다는 것을 보여주는 또다른 예로 생각된다. 즉 병합제에 대한 반응 성적(예: 상승효과율)의 차이는 각 개별 균주의 특성이 반영되어서 나타나는 현상으로 보인다. 그런 차이는 소수의 균주로 연구했을 때는 통계처리도 어렵고 상승효과율의 %를 계산할 때 빈도가 한 균주만 달라도 상승효과율이 큰 폭으로 변하기 때문에 검체 수가 작을수록 차이가 더 크게 느껴질 수 있으나 소수의 검체로 실험하여 얻은 상승효과율은 일반적인 상승효과율을 대표할 수 없기 때문에 큰 의미를 두기 어렵다고 생각된다.

MDR 병원체에 대한 항균 펩타이드의 항균 효과를 연구하여 발표한 논문들을 살펴보면 동물에서 얻은 다양한 항균 펩타이드의 특성을 규명하거나 다양한 약제내성 임상 분리주에 대한 항균 펩타이드의 MIC 값 측정이나 단독약제의 time-killing kinetics를 관찰하여 시험관 내 활성을 평가한 연구들은 있으나[2,26] 이런 펩타이드를 항균제와 병합하여 그 상호작용을 연구한 논문은 찾

기 어려웠다. 6개의 양이온성 α -나선 개구리 피부 유래 펩타이드의 항균활성을 MIC값 측정으로 평가한 결과, 그중 alyteserin-1c [E4K]와 B2RP [D4K] 펩타이드는 둘 다 MIC range가 4~16 $\mu\text{g/mL}$ 로서 colistin 내성 균주에 대해 가장 효과가 좋은 펩타이드였다는 것을 밝힌 Conlon 등[2]의 연구 역시 약제간 병합효과를 실험한 연구는 아니었다.

저자들이 조사한 바로는 colistin과 alyteserin-1c peptide 조합에 대해 time-kill 분석을 하여 상승효과율을 보고한 문헌이 관찰되지 않아서 본 연구가 alyteserin E4K와 colistin 조합이 XDRAB 임상 분리주에 상승효과가 있는가를 평가한 최초의 논문으로 생각된다. colistin + alyteserin E4K 조합은 XDRAB 임상분리주에서 50.0% (3/6)의 상승효과율을 나타냈으며 7조합 중 2번째로 높은 상승효과율을 보였다. 현재 본 조합에 대한 다른 연구논문 결과를 찾을 수 없는 실정이라 객관적인 평가는 아직 하기 어렵고 향후 후속 연구들이 이어져야 약물효능에 대해 평가할 수 있으리라고 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 XDRAB 균에 효과가 있는 항균물질 병합제를 선별하기 위해 검사한 7종의 항균물질조합 중 colistin + minocycline 조합과 colistin + alyteserin E4K 조합의 상승효과율이 높았기 때문에 항균제 병합효과에 대한 향후 생체내 연구의 후보조합으로 colistin + minocycline 조합과 colistin + alyteserin E4K 조합을 고려해볼 수 있으리라고 생각된다. 본 연구는 효과적인 병합제를 선별하기 위해 다양한 조합을 소수의 검체로 함께 검사한 선별용 예비실험이었기 때문에 향후 더 많은 균주를 대상으로 다양한 조합과 방법으로 후속연구가 이어질 필요가 있다고 생각된다.

요약

배경: Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAB)에 감염된 환자를 위한 적절한 치료제를 찾기 어려운 문제를 해결하기 위해 항균제의 치료효과를 높이기 위한 다양한 전략 개발이 필요하다. 본 연구의 목적은 7가지 항균물질 조합의 효과를 비교하여 그 중 우수한 병합효과를 보이는 조합을 선별하는데 있다.

방법: 대상균주는 XDRAB 균주 7주였다. 7가지 약제조합의 구성은 colistin을 기본으로 넣고 7가지 항균물질(doripenem, minocycline, tigecycline, linezolid, fusidic acid, vancomycin, 및 alyteserin peptide e4k) 중 하나씩 각각 넣어 조성하였다. Time-kill 분석을 이용하여 상승효과율을 측정함으로써 각 조합에 들어간 약물간 상호작용을 평가하였다.

결과: 본 연구에서 time-kill 분석법으로 실험한 7가지 약제조합의 상승효과율이 가장 높았던 조합부터 내림차순으로 열거해보면 colistin + minocycline 조합(57.1%), colistin + alyteserin E4K 조합(50.0%), colistin + tigecycline 조합(42.9%), colistin + vancomycin 조합(28.6%), colistin + doripenem 조합(14.3%)과 colistin + fusidic acid 조합(14.3%), colistin + linezolid 조합(0%)의 순이었다. 길항작용을 보인 조합은 없었다. 살균능을 보인 3 조합과 그 살균비율은 colistin + alyteserin E4K 조합(33.3%), colistin + minocycline 조합(14.3%)과 colistin + vancomycin 조합(14.3%)이었다.

결론: 7가지 약제조합 중 높은 상승효과율을 보인 colistin + minocycline 조합과 colistin + alyteserin E4K 조합은 XDRAB 균주에 대한 항균제의 병합 효과를 평가하기 위한 향후 생체내 실험에서 유망한 후보들로 간주될 수 있다고 생각된다.

Supplementary materials

The Data Supplement is available with this article at <https://doi.org/10.5145/ACM.2022.25.4.3>.

Ethics statement

It is not a human population study; therefore, approval by the institutional review board or the obtainment of informed consent is not required.

Conflicts of interest

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Funding

이 연구는 2021년도 조선대학교병원 의료질 향상 학술 연구비(Grant No. 2021-18)의 지원을 받아 수행되었음.

References

1. Conlon JM, Mechkarska M, Arafat K, Attoub S, Sonnevend A. Analogues of the frog skin peptide alyteserin-2a with enhanced antimicrobial activities against Gram-negative bacteria. *J Pept Sci* 2012;18:270-5.
2. Conlon JM, Sonnevend A, Pál T, Vila-Farrés X. Efficacy of six frog skin-derived antimicrobial peptides against colistin-resistant strains of the *Acinetobacter baumannii* group. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:317-20.
3. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*_{OXA} genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:274-8.
4. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:1199-201.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
6. Phee LM, Betts JW, Bharathan B, Wareham DW. Colistin and fusidic acid, a novel potent synergistic combination for treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4544-50.
7. Oleksiuk LM, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, O'Hara JA, Doi Y, et al. *In vitro* responses of *Acinetobacter baumannii* to two- and three-drug combinations following exposure to colistin and doripenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1195-9.

8. Mao J, Li T, Zhang N, Wang S, Li Y, Peng Y, et al. Dose optimization of combined linezolid and fosfomycin against *Enterococcus* by using an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Microbiol Spectr* 2021;9:e00871-21.
9. Colton B, McConeghy KW, Schreckenberger PC, Danziger LH. I.V. minocycline revisited for infections caused by multidrug-resistant organisms. *Am J Health Syst Pharm* 2016;73:279-85.
10. Zhanel GG, Baudry PJ, Taylor F, Cox L, Hoban DJ, Karlowsky JA. Determination of the pharmacodynamic activity of clinically achievable tigecycline serum concentrations against clinical isolates of *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases and reduced susceptibility to carbapenems using an *in vitro* model. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:824-8.
11. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5316-22.
12. Kim UJ, Kim CM, Jang SJ, Lee SB, Cho SS, Jeong SH, et al. Evaluation of synergistic effect of combined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* treatment with linalool and colistin on to expand candidate for therapeutic option. *Ann Clin Microbiol* 2020;23:11-20.
13. Park GC, Choi JA, Jang SJ, Jeong SH, Kim CM, Choi IS, et al. *In vitro* interactions of antibiotic combinations of colistin, tigecycline, and doripenem against extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med* 2016;36:124-30.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI document M100. Wayne; PA: 2018.
15. Tan TY, Yong Ng LS, Tan E, Huang G. *In vitro* effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:421-3.
16. March GA and Bratos MA. A meta-analysis of *in vitro* antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Methods* 2015;119:31-6.
17. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. *In vitro* activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009;8:18.
18. Peck KR, Kim MJ, Choi JY, Kim HS, Kang CI, Cho YK, et al. *In vitro* time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *J Med Microbiol* 2012;61:353-60.
19. Li J, Yang X, Chen L, Duan X, Jiang Z. *In vitro* activity of various antibiotics in combination with tigecycline against *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Microb Drug Resist* 2017;23:982-93.
20. Vidailiac C, Benichou L, Duval RE. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4856-61.
21. Pankuch GA, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of doripenem with and without levofloxacin, amikacin, and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Jun;67:191-7.
22. Principe L, Capone A, Mazzarelli A, D'Arezzo S, Bordi E, Caro AD, et al. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: possible options for the treatment of complicated infection. *Microb Drug Resist* 2013;19:407-14.

23. Ma XL, Guo YZ, Wu YM, Gong WT, Sun J, Huang Z. *In vivo* bactericidal effect of colistin-linezolid combination in a murine model of MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Sci Rep* 2020;10:17518.
24. Oliva A, Garzoli S, De Angelis M, Marzuillo C, Vullo V, Mastroianni CM, et al. *In vitro* evaluation of different antimicrobial combinations with and without colistin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Molecules* 2019;24:886.
25. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Lena Friberg, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5104-11.
26. Liu CB, Shan B, Bai HM, Tang J, Yan LZ, Ma YB. Hydrophilic/hydrophobic characters of antimicrobial peptides derived from animals and their effects on multidrug resistant clinical isolates. *Dongwuxue Yanjiu* 2015;36:41-7.

