Collection @ chosun

creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000238272

Collection @ chosun

2009년 8월
석사학위논문

Bio-Timer법을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 biofilm에 감수성 있는 항생제의 검색 및 rifampin과 erythromycin의 biofilm matrix에 미치는 상승효과

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

신 효 정

Collection @ chosun

Bio-Timer법을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 biofilm에 감수성 있는 항생제의 검색 및 rifampin과 erythromycin의 biofilm matrix에 미치는 상승효과

Antibiotics effective in biofilm-developed *Staphylococcus aureus* screened using Bio-Timer method and synergistic effect of rifampin and erythromycin on biofilm matrix

2009年 8月 25日

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

신 효 정

Collection @ chosun

Bio-Timer법을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 biofilm에 감수성있는 항생제의 검색 및 rifampin과 erythromycin의 biofilm matrix에 미치는 상승효과

지도교수 김 철 성, 임 용

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함

2009年 04月

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

신 효 정

Collection @ chosun

신효정의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임동훈 (인)

위 원 조선대학교 교수 김철성 (인)

위 원 조선대학교 교수 임 용 (인)

2009年 5月

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS..... I
LIST OF TABLES.....III
LIST OF FIGURES.....IV
ABSTRACT..... V

Ⅰ. 서론.....1

Ⅱ. 재료 및 방법.....3
1. 균주.....3
2. 실험에 사용한 항생제 종류.....3
3. P-MIC와 P-MBC 측정.....4
4. B-MIC와 B-MBC 측정.....4
5. Biofilm matrix detachment 측정.....5
6. B-MIC와 B-MBC에 미치는 상승효과 측정.....6
7. Biofilm matrix에 미치는 상승효과 측정.....6

Ⅲ. 결과.....7
1. P-MIC 및 B-MIC 비교.....7
2. P-MBC 및 B-MBC 비교.....7
3. Biofilm 형성 정도에 따른 B-MIC와 B-MBC 비교.....7
4. Biofilm matrix의 detachment에 대한 항생제의 효과.....8
5. 항생제의 병합이 B-MBC에 미치는 상승효과.....9
6. 타 약제와의 병합이 rifampin의 biofilm matrix detachment에 미치는 상승효과.....9

Ⅳ. 고찰.....11

Collection @ chosun

Ⅴ. 요약 및 결론.....16

Ⅵ. 감사의 말씀.....18

Ⅶ. 참고문헌.....28

Collection @ chosun

LIST OF TABLES

Table 1. Planktonic MIC and MBC.....19

Table 2. Biofilm MIC and MBC.....20

Table 3. FIC and FBC indexes of antibiotics on biofilm for CYL1106 strain.....21

Collection @ chosun

LIST OF FIGURES

Figure 1. Correlation line.....22

Figure 2. Biofilm assay.....23

Figure 3. Biofilm detachment assay of antibiotics on matrix for CYL1106 strain.....24

Figure 4. Synergy effect of antibiotics on biofilm matrix for CYL1106 strain.....26

Collection @ chosun

ABSTRACT

Antibiotics effective in biofilm-forming *Staphylococcus aureus* screened by Bio-Timer method and synergistic effect of rifampin and erythromycin on the biofilm

Shin, Hyo-jung
Adviser: Prof. Kim, Cheol-seong, Lim, Yong
Department of Bio new drug development
Graduate School of Chosun University

To investigate not only the antibiotic efficacy against biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, but also detachment ratio of the biofilm matrix, we performed Bio-Timer assay, which represents cell viability, with color change of Bio-Timer medium from red to yellow, and biofilm detachment assay, respectively. The *rbf* isogenic mutant of 8325-4 strain of *S. aureus*, with low biofilm producing and the complemented strain, with high-biofilm producing strain, were used for detection for B-MBC of antibiotics according to biofilm productivity of *S. aureus.* Of 24 conventional antibiotics, the B-MICs of moxifloxacin, ceftriaxone, erythromycin and quinupristin/dalfopristin were as same as the planktonic MICs (P-MIC) of them, respectively. This result suggested that the 4 antibiotics may penetrate the biofilm-forming cells as much as the planktonic cells. But rifampin, known as bactericidal to planktonic cells, showed much higher B-MBC than P-MBC, suggesting rifampin no longer showed the bactericidal effect on biofilm-forming *S. aureus*. Amikacin and tobramycin were more bactericidal to biofilm-forming cells, irrespective of biofilm productivity, than any other antibiotic used in this study. Although rifampin seemed to be lost its bactericidal activity to biofilm-forming strains, the combination of rifampin either with teichoplanin or with erythromycin showed synergistic effect on high biofilm-forming CYL1106 strains, with 0.26 and 0.36 of

Collection @ chosun

FIC index, respectively. Moreover, rifampin displayed the most potent ability to detach the biofilm matrix, reaching to 80% maximum detachment ratio at the concentration below to the B-MBC. When the combination of rifampin with erythromycin was treated to detach the matrix, the concentration of rifampin was much lowered 500 times to 0.03 ng/ml. This result suggested that the combination of rifampin with erythromycin displayed synergistic effect on biofilm matrix detachment of *S. aureus*.

Collection @ chosun

Ⅰ. 서론

Biofilm이란 수화된(hydrolyzed) matrix에 균이 둘러 쌓인 세균의 집단(community)을 말하며 세균이 각자 존재, 증식하는 planktonic 상태와 대별된다 [1-3]. Biofilm은 감염질환의 약 60% 이상의 경우에 관여하는 것으로 알려져 있다 [4, 5]. 이러한 까닭은 biofilm을 형성하는 세균은 인체 내 면역체계에 의해서 쉽게 제거되지 않으며, planktonic 세균에 비해서 항생제에 높은 내성을 보이기 때문이다 [6, 7]. Biofilm을 형성하는 세균의 경우, planktonic 상태의 세균에 비해서 약 100배 에서 1000배 이상 높은 항생제 내성을 보이는데 [8, 9], 이는 (1) 항생제의 biofilm 내의 침투력이 떨어지기 때문이며, (2) Biofilm 내의 세균은 planktonic 상태의 세균에 비해 상대적으로 증식이 더딘 상태이기에 항생제에 내성을 보인다. (3) 또한 biofilm은 planktonic 상태의 세균과는 일부 대사과정이 다르기 때문에 planktonic 상태의 세균의 특정 대사과정을 차단하도록 계발된 항생제가 잘 듣지 않는다. (4) 마지막으로 항생제에 내성을 지닌 세균의 경우 오히려 biofilm 형성을 더 잘하기 때문이다 [10, 11]. 이렇듯 biofilm을 형성한 세균 감염의 경우, 인체 면역체계에 쉽게 제거되지 않고 또한 항생제 치료에 잘 듣지 않기에, biofilm을 형성하는 세균에 의한 의료기구의 오염은 병원감염의 주요 원인이다. 그러므로 biofilm을 형성하는 세균에 의한 감염의 경우, 기존의 planktonic 상태의 항생제 감수성 검사로써는 biofilm 형성 세균에 적합한 항생제를 확인하는 것은 의미가 없으며, 원인균이 biofilm을 형성한 상태에서 항생제 감수성 검사를 시행하여 해당 세균에 감수성이 있는 항생제를 채택하여 치료에 사용하는 것이 반드시 필요하다 [12, 13].

Staphylococcus aureus (이하, *S.aureus*)은 지역사회 감염 (Community-acquired infection) 뿐만 아니라 병원감염 (Nosocomial infection)의 주요 원인균이다 [14, 15]. *S.aureus*는 자신에게 불리한 환경 (hostile environment)에서 cell-community 즉 biofilm을 형성할 수 있다. *S.aureus*는 병원 감염의 한 기전으로 병원에서 사용하는 다양한 의료기구 표면에 biofilm을 형성하여 만성적이며 지속적인 감염을 일으킨다 [6, 14, 16]. Biofilm과 관련된 *S.aureus*

Collection @ chosun

감염을 진단하고 치료하기 위해서는 앞서 언급한 바와 같이 biofilm을 형성한 상태에서 항생제 감수성 검사를 시행하여 *S.aureus*에 감수성이 있는 적합한 항생제를 선택하는 것이 필요하다. 또한 biofilm 형성에 의한 *S.aureus*의 재발을 막기 위해서는 biofilm에 싸여있는 *S.aureus*를 죽이는 것 뿐만 아니라 biofilm matrix를 효과적으로 제거할 수 있는 항생제를 사용하는 것이 중요하다. 왜냐하면 biofilm을 형성한 *S.aureus*가 비록 죽었다고 하더라도, matrix가 남아있는 경우, 다시 biofilm을 형성하여 반복, 지속감염을 유지할 수 있기 때문이다 [17].

본 연구에서는 총 24종의 항생제의 효과를 측정하기 위해서는 planktonic 상태에서 검사하여 얻은 항생제의 MIC, MBC (이하, P-MIC, P-MBC)와 biofilm 상태에서의 MIC, MBC (이하, B-MIC, B-MBC)를 서로 비교하기 위해서 Clinical and Laboratory Standards Institute (이하 CLSI)을 일부 변형시킨 Bio-Timer 방법을 사용하여 B-MIC, B-MBC를 측정하였다.

실험에 사용한 균주는 Biofilm을 형성하는 정도에 따른 B-MIC, B-MBC의 차이점을 확인하기 위해서, 균주 간의 biofilm 형성 능력의 차이점을 제외하고는 균주 간의 차이 (strain difference)가 없는 균주를 선택하였다. 즉 *S. aureus* 표준균주인 8325-4 균주의 *rbf* 변이주 (*rbf*-mutant strain)와 *rbf* 보완주(*rbf*-complemented strain)를 각각 biofilm을 약하게 형성하는 (low-biofilm) 균주와 biofilm을 강하게 형성하는 (high-biofilm) 균주로써 사용하였다. 또한 biofilm detachment assay를 통해서 실험에 사용한 항생제의 biofilm matrix의 제거(detachment)능력의 차이점을 확인하여 의미있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

Collection @ chosun

II. 재료 및 방법

1. 균주

본 연구에서는 표준균주인 *S.aureus* 8325-4 균주의 *rbf* 유전자를 불활성화시킨 CYL1135와 해당 *rbf* 유전자를 multicopy plasmid로 complementation시킨 CYL1106 균주를 사용하였다 [18]. Biofilm을 약하게 형성한 변이주인 CYL1135와 변이주에 비해 2배 이상 biofilm을 더 형성한 CYL1106 균주를 실험에 사용하여 biofilm 형성 정도에 따른 두 균주 간 항생제 감수성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이들 균주의 biofilm 형성 정도를 biofilm assay 방법을 통해서 미리 확인하였다 (Fig. 2).

2. 실험에 사용한 항생제 종류

항생제들은 용액 상태를 제외하고 가루나 알약인 경우 적절한 용매에 녹여 사용하였으며, 실험에 사용된 종류는 다음과 같다. Penicillines 계열 항생제로서 bacampicillin (종근당), amoxicillin-clavulanate (이하, AMC, 종근당), ampicillin-sulbactam (이하, SAM, 한미약품)을 사용하였으며 Quinolones 계열은 ciprofloxacin (이하, CIP, 일동제약), norfloxacin (이하, NOR, 종근당), ofloxacin (이하, OFX, 일동제약), levofloxacin (이하, LVX, 일동제약), moxifloxacin (이하, MXF, 종근당)을 사용하였다. Cephalosporines 계열의 항생제는 cefaclor (이하, CEC, 일동제약), cefotaxime (이하, CTX, 한독약품), ceftriaxone (이하, CRO, 한미약품)을 사용하였다. Aminoglycosides 계열의 항생제는 amikacin (이하, AMK, 일동제약), kanamycin (이하, KAN, 동아제약), sisomycin (종근당), streptomycin (이하, STR, 종근당), tobramycin (이하, TOB, 대웅제약)을 사용하였다. Glycopeptides 계열의 항생제로써 teichoplanin (이하, TEC, 아벤티스), vancomycin (이하, VAN, 제일제당)을 사용하였다. Macrolides 계의 항생제는 erythromycin (이하, ERY, Biochemika), Streptogramin 계열의 항생제는 quinupristin/dalfopristin (이하, Q-D, 한독약품), 그리고 Sulfonamides 계열의

Collection @ chosun

항생제로써 trimethoprim-sulfamethoxazole (이하, SXT, 한미약품)을 사용하였다. Rifampin (이하, RIF, 종근당), fusidic acid (시그마), fosfomycin (이하, FOF, 한국팜비오)을 사용하였다.

3. P-MIC와 P-MBC 측정

P-MIC와 P-MBC는 CLSI guidelines에 따라 Muller Hinton Broth (Becton Dickinson, 미국, 이하 MHB)를 이용한 broth dilution method로 수행하였다 [55]. 우선, CYL1135 균주를 MHB에 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음, 최종적으로 균 수가 5×10^5 CFU/ml이 되도록 MHB를 사용하여 희석하였다. 다음으로 실험군의 경우 CLSI buffer (0.01% acetic acid + 0.2% bovine serum albumin)에 최고 320 μg/ml부터 2배씩 희석한 항생제를 96 well plate (Nunc, 덴마크)에 10 μl씩 넣고, 여기에 균액 90 μl씩을 함께 넣어 최종 100 μl 되게 하였다. 양성대조군의 경우 균액만 100 μl, 음성대조군의 경우 멸균된 MHB 배지 90 μl와 멸균된 CLSI buffer 10 μl씩을 함께 넣었다. Plate를 37℃ 배양기에서 정치상태로 하룻밤 배양한 다음, 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 균이 90% 이상 자라지 않은 최소농도를 P-MIC로 확인하였다. 그리고 P-MBC를 측정하기 위해 P-MIC를 확인한 96 well plate에서 균이 자라지 않은 농도의 배지를 TSA plate에 옮긴 다음, 37℃ 배양기에서 정치 상태로 하룻밤 배양하였다. 이때 TSA 배지에서 균이 자라지 않은 최소농도를 P-MBC로 확인하였다.

4. B-MIC와 B-MBC 측정

BioTimer-phenol red(이하, BT-PR) 배지를 이용하여 우선 BT-PR 배지의 색깔이 변한 시간과 viable cell 수 사이에 유의한 관계가 있음을 correlation line을 통해 미리 확인하였다 (Fig. 1).

B-MIC를 측정하는 방법은 기존의 Bio-Timer assay (이하, BTA)을 일부 수정하여 다음과 같이 수행하였다 [8]. B-MIC를 측정하기 위한 변형된 BTA 방법을 기술하자면, CYL1135와 CYL1106 실험균주를 각각 0.25% 포도당이

Collection @ chosun

들어있는 TSB (Tryptic Soy Broth, Becton Dickinson, 미국 이하, $TSB_{-0.25\%}$)에 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 하룻밤 배양하였다. 다음날 600nm의 흡광도 2.5로 맞춘 배양액을 0.5% 포도당이 든 TSB (이하, $TSB_{-0.5\%}$) 배지에 1:5000 희석한 다음, 최종 10 ml씩 멸균된 glass beads (Marienfeld, 독일)가 들어있는 6CM dish (Nunc, 덴마크)에 넣고 37℃ 배양기에서 하룻밤 정치 배양하였다. 다음 날 배양액을 제거한 후, 멸균된 PBS로 6.5 rpm으로 5분씩 2회 진탕하면서 씻어냈다. 실험군의 경우 BT-PR 배지에 최고 1024 μg/ml 부터 2배씩 희석된 항생제가 1 ml씩 들어있는 24 well plate에 biofilm이 형성된 glass bead를 well 당 하나씩 넣었으며 양성대조군으로 항생제가 없는 BT-PR 배지에 biofilm이 형성된 glass bead를 넣었고, BT-PR 배지에 멸균된 glass bead 만 넣은 경우를 음성대조군으로 사용하였다. Plate를 37℃ 배양기에서 배양하면서 양성대조군의 배지가 6시간 전후로 노란색으로 변하는 것을 확인하여 biofilm을 형성한 실험균주의 수가 개략적으로 5×10^5 CFU/ml 임을 알 수 있었다. 다음 날 육안으로 확인하여 붉은색을 나타내는 마지막 well의 항생제 농도를 B-MIC로 확인하였다. 그리고 B-MBC를 측정하기 위해서는 균이 자라지 않은 B-MIC plate의 각 well에서 bead를 꺼내서 BT-PR 배지만 1 ml씩 들어있는 새로운 24 well plate에 옮겨서 37℃ 배양기에서 하룻밤 정치 배양한 다음, 다음 날 육안으로 확인하여 붉은색을 나타내는 마지막 well의 항생제 농도를 B-MBC로 확인하였다.

5. Biofilm matrix detachment 측정

Biofilm을 잘 형성하는 CYL1106 균주를 $TSB_{-0.25\%}$ 배지에 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 하룻밤 배양한 후, 균 수가 600nm에서 흡광도 3 이 되도록 맞추고, 이를 $TSB_{-0.5\%}$ 배지에 1:500이 되게 희석하였다. 희석된 균액을 96 well plate에 200 μl씩 넣고 37℃ 배양기에서 하룻밤 정치배양 한 다음, 균액을 버리고 PBS로 2회 씻어냈다. 최고 128 μg/ml부터 $TSB_{-0.5\%}$ 배지에 2배씩 희석한 항생제를 각 well에 200 μl씩 넣고, 37℃ 배양기에서 6시간 동안 정치 배양하였다. 배양 후, 항생제를 버리고 PBS로 2번 씻어낸 다음, plate를 실온에서 1시간 동안 건조시켰다. 그리고 각 well에 99% methanol을 100 μl씩 넣고 15분간 고정시킨 후,

Collection @ chosun

넣은 methanol을 제거한 다음, 실온에서 20분간 건조시키고 0.25% crystal violet(이하, CV)를 100 μl씩 넣어 실온에서 20분간 방치하였다. PBS로 2번 씻어낸 후 실온에서 건조시켰다. 마지막으로 33% acetic acid를 150 μl씩 넣어 CV를 용출한 다음, 590nm에서 흡광도를 측정하여 biofilm 형성 정도를 확인하였다.

6. B-MIC와 B-MBC 에 미치는 상승효과 측정

B-MIC와 B-MBC의 상승효과는 CYL1106 균주를 사용하여 B-MIC, B-MBC와 동일한 방법으로 실험하였다. 항생제는 BT-PR 배지에 4x MBC부터 2배씩 희석하여 사용하였으며 teichoplanin과 moxifloxacin, teichoplanin과 tobramycin, teichoplanin과 quinupristin-dalfopristin, teichoplanin과 rifampin 그리고 rifampin과 erythromycin을 함께 처리한 경우 총 5개의 조합을 확인하였다. 각 항생제 조합의 상승효과에 대한 결과는 FICI (fractional inhibitory concentration index)와 FBCI (fractional bactericidal concentration index)를 이용하여 해석하였다. 즉, FICI 또는 FBCI 값이 0.5 이하인 경우 synergy, 0.5 이상 1 이하인 경우 partial synergy, 1 인 경우는 addition, 1 이상 4 미만인 경우 indifference 그리고 4 이상인 경우 antagonism인 것으로 해석하였다 [19].

7. Biofilm matrix 에 미치는 상승효과 측정

Biofilm matrix에 미치는 상승효과는 위의 biofilm matrix detachment와 동일한 방법으로 실험하였다. 단, 항생제는 rifampin의 경우 0.5 μg/ml 부터 0.0000015 μg/ml 까지 2배씩 희석하였으며, 여기에 각각 고정된 다른 항생제들 즉, bacampicillin은 16 μg/ml, cefotaxime은 4 μg/ml, erythromycin은 1 μg/ml 을 섞어 biofilm이 형성된 96 well plate에 200 μl씩 넣었다.

Collection @ chosun

Ⅲ. 결과

1. P-MIC 및 B-MIC 비교

실험에 사용한 항생제는 planktonic 상태에서 P-MIC와 P-MBC가 같거나 2배의 차이를 보여 살균항생제임을 알 수 있었다. 그러나 CTX, FOF 그리고 fusidic acid는 P-MIC와 P-MBC간에 8배 차이를 보여 정균항생제로 판단되었다. P-MIC와 biofilm 상태의 B-MIC를 비교해보면, 대부분의 항생제가 P-MIC 보다 B-MIC가 증가되었으며 fusidic acid와 RIF의 경우 CYL1106 균주에서 최고 600배 이상 증가된 B-MIC를 보였다. 그러나 Quinolones 계열의 항생제의 MXF, Cephalosporins 계열의 CRO, Marcolides 계열인 ERY 그리고 Streptogramin 계열의 Q-D의 항생제는 실험균주의 biofilm 형성과는 관계없이 planktonic과 동일한 B-MIC를 보여서 biofilm에 침투성이 높은 항생제임을 알 수 있었다. (Table 1, 2).

2. P-MBC 및 B-MBC 비교

실험에 사용한 총 24종의 항생제의 B-MBC는 P-MBC에 비해 최소 8배에서 10,000배 이상 높았으며 low-biofilm 형성 CYL1135 균주 보다 high-biofilm 형성 균주 CYL1106에서 B-MBC는 더 증가되었다. 특히 Quinolones 계열의 항생제 중에서는 MXF, Aminoglycosides 계열의 항생제 중 AMK과 TOB 그리고 Streptogramin 계열의 Q-D의 경우 P-MBC보다 CYL1106 균주의 B-MBC가 8배의 가장 낮은 증가율을 보여서 타 항생제에 비해 상대적으로 biofilm 상태에 효과적인 살균항생제로 판단되었다 (Table 1, 2).

3. Biofilm 형성 정도에 따른 B-MIC와 B-MBC 비교

Low-biofilm 형성 CYL1135 균주의 B-MIC와 B-MBC를 비교해보면, Quinolones 제재와 Aminoglycosides 제재가 타 항생제에 비해 biofilm에 우수한 살균작용을 보였다. 세포벽에 작용하는 항생제인 Penicillin계와 Cephalosporin

Collection @ chosun

계의 항생제는 B-MIC에 비해 B-MBC가 16배에서 64이상 높아 biofilm 살균 작용이 떨어지는 것을 알 수 있었다 (Table 2).

Low-biofilm 형성 CYL1135 균주와 high-biofilm 형성 CYL1106 균주 간의 B-MIC는 같거나 2배 이상의 차이를 보여 별반 차이가 없었다. 그러나 fusidic acid와 RIF의 경우 CYL1106의 B-MIC가 CYL1135 균주의 B-MIC에 비해 각각 64배와 533배의 높아서 high-biofilm 형성 CYL1106 균주에서 항생제의 정균효과가 크게 떨어지는 것을 알 수 있었다. 두 균주 간의 B-MBC의 차이를 비교해보면 CYL1106 균주의 B-MBC가 대부분 2배 이상 증가되는 것을 확인하였으나, RIF의 경우 두 균주 간에 B-MIC에서 높은 차이를 보인 것처럼 B-MBC의 차이가 1000배 이상 차이를 보였다. 이러한 결과는 RIF의 경우 biofilm 형성 정도에 따라 biofilm의 살균효과가 크게 감소하는 약제임을 알 수 있었다 (Table 2).

High-biofilm 형성 CYL1106 균주에서 실험에 사용한 항생제의 B-MBC는 B-MIC에 비해 4에서 64배 증가되었다. 이러한 결과는 biofilm의 형성이 강한 경우, 실험에 사용한 항생제 biofilm에 대한 살균능력이 감소함을 알 수 있었다. 그러나 Aminoglycoside 제제 중 AMK과 TOB 그리고 fusidic acid의 경우, B-MIC와 B-MBC가 같거나 2배 차이를 보여 상대적으로 high-biofilm 형성 CYL1106 균주에서 좋은 살균효과를 보였다. 특히 AMK과 TOB의 항생제는 CYL1135 균주와 CYL1106 균주간에 B-MIC와 B-MBC 모두가 차이가 없어서 실험에 사용한 항생제 중에서 biofilm 형성 정도에 관계없이 biofilm에 가장 효과적인 살균효과를 보이는 것으로 판단되었다 (Table 2).

4. Biofilm matrix의 detachment에 대한 항생제의 효과

실험에 사용한 각 계열 별 항생제 중에서 P-MBC와 B-MBC 간의 차이가 가장 낮은 항생제를 한가지씩 선택하여 이들 항생제가 실험균주 CYL1106의 biofilm matrix에 대한 detachment 효과를 확인하였다. 선택된 항생제는 Penicillin 계열의 bacampicillin, Quinolones 계열의 MXF, Cephalosporins 계열의 CTX, Aminoglycosides 계열의 TOB, Glycopeptides 계열의 TEC, Marcolides 계열의

dCollection @ chosun

ERY, Streptogramin 계열의 Q-D 이였으며, P-MBC와 B-MBC의 차이가 제일 큰 항생제인 RIF을 음성대조군으로 사용하였다. 항생제를 넣지 않은 양성대조군이 형성한 biofilm matrix를 100%로 보았을 때, biofilm matrix의 최대감소율을 측정한 결과, bacampicillin, CTX의 항생제가 60% 최대감소율을 보였으며, MXF, TOB, TEC, ERY 그리고 Q-D의 경우 40% 최대감소율을 보였다. 그러나 예상과 달리 음성대조군으로 사용한 RIF의 경우 80%의 최대감소율을 보여서 실험에 사용한 항생제 중에 가장 biofilm matrix에 효과적인 항생제로 확인되었다. 최대감소율을 보인 항생제의 농도를 살펴보면 biofilm matrix 최대 감소율이 50% 미만인 항생제의 경우 ERY을 제외하고 모두 각 항생제의 B-MBC 보다 높은 농도에서 최대감소율을 보였다. 그러나 최대감소율이 60% 이상인 bacampicillin, CTX, RIF은 각 항생제의 B-MBC와 같거나 오히려 낮은 농도에서 최대감소율을 보였다 (Fig. 3).

5. 항생제의 병합이 B-MBC 에 미치는 상승효과

실험에 사용한 항생제 중에서 서로 항균작용 기전이 다른 항생제의 조합들 즉 TEC과 MXF, TEC과 TOB, TEC과 Q-D, TEC과 RIF 그리고 RIF과 ERY 5가지 조합이 B-MBC에 미치는 상승효과를 확인하였다 (Table. 3). 그 결과 TEC과 RIF, RIF과 ERY의 경우 FIC index에서 각각 0.26, 0.38을 보여 상승효과가 있었으며, 그에 반해 FBC에서는 효과가 없는 것을 확인하였다. 또한 TEC와 Q-D의 경우 FIC와 FBC 모두 길항작용을 보이는 것을 확인하였다. 그 외에 TEC와 MXF, TEC와 TOB 또한 FIC와 FBC 모두 효과가 없었다.

6. 타 약제와의 병합이 rifampin의 biofilm matrix detachment에 미치는 상승효과

Biofilm matrix의 60% 이상의 최대감소율을 보인 항생제 중에서 bacampicillin, CTX 그리고 자신의 B-MBC 보다 더 낮은 농도에서 biofilm matrix에 최대감소율을 보인 ERY을 선택하여 이들 각 항생제의 최대감소율을 보인 농도를 고정하고, 다양한 농도의 RIF을 병합하여 이들 병합이 보이는 상승작용을 확인하였다. 대조군으로 단일약제인 RIF의 biofilm matrix 최대감소율을 동시에

Collection @ chosun

확인하였으며, 이때 실험에 사용한 농도는 이미 RIF의 경우 최저 농도인 0.06 μg/ml에서 최대감소율을 보였기 때문에 그 이하의 다양한 낮은 농도에서 최대감소율을 확인하였다. 실험 결과 대조군인 RIF의 경우, 자신의 B-MIC, MBC 농도보다 훨씬 낮은 0.015 μg/ml에서 biofilm matrix의 80%의 최대감소율을 보였다. 그러나 RIF와 ERY의 병합 시에는 RIF을 단일 약제로 사용한 경우에 비해서 512배 더 낮은 농도인 0.00003 μg/ml에서 동일한 80%의 matrix detachment 최대감소율을 확인하여서 두 약제간의 병합 시 matrix detachment에 미치는 상승효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 그러나 bacampicillin, CTX와 RIF의 병합 시에는 단일 약제의 matrix detachment에 미치는 최대감소율보다 효과는 오히려 길항작용을 보였다.

Collection @ chosun

Ⅳ. 고찰

비강 내에 주로 존재하는 *S.aureus*는 병원감염의 제일 흔한 원인균이다. *S.aureus*는 또한 항생제에 내성 또한 흔하여 병원에서 분리된 *S.aureus*의 대부분이 penicillin에 내성을 보인다. 1980년대에 출현한 methicillin 제재에 내성을 보이는 균주 (methicillin-resistant *S. aureus*, 이하 MRSA)의 분리율은 80%를 상회하는 것으로 알려져 있다 [18]. 또한 여러 항생제에 동시에 내성을 보이는 소위 다제내성균이 임상에서 흔히 분리되고 있다. MRSA와 이들 다제내성 *S.aureus*의 치료에 최종적으로 쓰이는 Glycopeptide계의 VAN에 까지 내성을 보이는 *S.aureus* (vancomycin-resistant *S. aureus*, 이하 VRSA)가 출현하였으며 VRSA의 분리율 또한 점차 증가되고 있다 [7].

특히 *S. aureus*는 병원에서 사용되는 의료기구의 표면에 Biofilm을 형성하여 만성감염, 지속감염 그리고 반복감염을 일으킨다 [20]. 그 이유는 *S.aureus*이 형성하는 biofilm은 그 자체가 매우 높은 항생제 내성을 보이며, 숙주의 면역체계에 의해서 쉽게 제거되지 않기 때문이다 [21]. 특히 의료기구의 표면에 형성한 *S.aureus*의 biofilm 감염증은 기구표면의 biofilm을 완전 제거하기가 거의 불가능하여 대부분의 경우 사용하고 있는 의료기구를 제거할 수 밖에 없는 현실이다.

Biofilm 형성에 의한 감염증의 완전한 치료를 위해서는 biofilm을 형성한 *S.aureus*을 정균 혹은 살균하며 동시에 *S.aureus*의 biofilm matrix을 제거하여야만 한다 [17]. 본 연구에서는 biofilm을 형성한 *S.aureus*에 효과적인 항생제를 검색하기 위해서 low-biofilm 형성균주 CYL1135, high-biofilm 형성균주인 CYL1106균주에 대한 24종의 항생제의 B-MIC, B-MBC를 측정하여 먼저 P-MIC, P-MBC와 비교, 분석하였으며, 두 번째로 두 균주간의 B-MIC와 B-MBC의 차이점을 비교하여 biofilm 형성 정도에 따른 항생제 역가의 차이점을 확인하였다. 마지막으로 biofilm matrix detachment assay를 사용하여 biofilm matrix의 제거에 효과적인 항생제를 확인하였다.

항생제의 침투력을 보기 위해서 P-MIC와 B-MIC를 분석한 결과, MXF, CRO,

Collection @ chosun

ERY 그리고 Q-D 항생제의 B-MIC는 P-MIC와 동일하였고, 또한 biofilm 형성 정도가 다른 두 실험균주 간에도 차이가 없었다. 이러한 결과는 이들 항생제는 planktonic 상태의 세균과 동일할 정도로 biofilm에 역시 침투성이 뛰어난 것으로 판단되었다. 반면에 RIF의 B-MIC는 P-MIC에 비해 600배 이상 증가하여서 biofilm에 침투성이 가장 좋지 않았다. MXF의 경우 조직과 침투성이 좋으며 [22], 안구조직에 또한 다른 세대의 fluoroquinolone 제재 보다 침투성이 더 좋은 것으로 보고된 기존의 연구 [23]와 일치된 결과였다. 반면, RIF의 경우, 타 항생제들에 비해 실험균주 biofilm 형성 시에 600배 이상 높은 B-MIC를 보여서 조직 침투성이 높다고 알려진 기존의 보고 [24]와는 다르게 biofilm에는 침투성이 현저 떨어지는 것을 알 수 있었다 (Table 2). 그러나 *Staphylococcus epidermidis* 가 형성하는 biofilm에 RIF이 침투성이 높다는 보고와는 다른 결과이었다 [25].

Biofilm 형성 정도에 따른 B-MIC 그리고 B-MBC를 비교, 분석한 결과, biofilm의 형성 정도와 관계없이 biofilm에 가장 효과적인 살균항생제는 Aminoglycosides 계열의 AMK과 TOB이였다 (Table 2). 이러한 결과는 *S.aureus*의 in vitro와 in vivo상에서 TOB을 처리한 경우, 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 bacteria viability 간에 차이가 없었다는 보고 [26]와 상반된 결과이었다. 그러나 그람 음성 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*의 경우 biofilm 상태에서 TOB에 대한 높은 침투력을 나타냈다는 보고도 있었다 [27]. 또한 TOB은 구조적으로 양이온으로써 작용을 하는 친수성 당인 여러 개의 amino groups을 가지고 있는데 이는 세균의 30s ribosome의 음이온인 16s rRNA와 접근하기 쉽게 되어 있다 [28]. 또한 biofilm 감염 치료에 중요시 되는 문제점 중 하나가 내성을 획득할 수 있다는 점이다. 일부 논문에서는 만성 biofilm 감염을 치료하는 동안 Staphylococci에 감염된 mouse로부터 catheter를 회수해 TOB의 내성 획득률을 측정한 결과 TOB이 포함된 plate에서 biofilm bacteria가 배양 되지 않았다고 보고 [26]되어 TOB이 내성률이 낮다는 것을 알 수 있었다. 이를 토대로 TOB이 높은 침투력과 세균과의 결합률 그리고 낮은 내성율에서 타 항생제들에 비해 biofilm을 치료하는데 매우 효과적인 항생제임을 미루어 짐작할 수 있었다.

그 밖에 MXF과 Q-D이 P-MIC와 B-MIC, P-MBC와 B-MBC 비교를 통해

Collection @ chosun

상대적으로 효과적인 항생제임을 확인 할 수 있었다 (Table 1, 2). 특히 다양한 세균에 대해 광범위한 활성 범위를 가지고 있는 [29] Quinolones 계열의 4세대 MXF의 경우, biofilm matrix에서 최대 40% 정도의 제거율을 보인 반면 biofilm bacteria에서는 높은 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다 (Table 2, Fig. 3). 또한 같은 Staphylococci에 속하는 임상분리주인 *S. lugdunensis*의 biofilm에 대해서도 MXF이 높은 살균활성을 보였다 [30]는 일치된 보고도 있었다. MXF이 biofilm matrix 보다 biofilm bacteria에 더 효과적인 이유는 아마도 타 항생제들에 비해 증가된 침투력과 효능성 그리고 낮은 저항성률의 이점 [31-33] 등을 꼽을 수 있을 것으로 판단된다. 또한 MXF은 상대적으로 세대가 낮은 항생제들에 비해 efflux pump의 영향을 적게 받기 때문에 쉽게 밖으로 배출되는 2,3세대 항생제 보다 세포 내 축적 정도가 높다고 할 수 있다 [34-36]. 이와 같은 이유로 MXF이 biofilm bacteria에 미치는 영향이 더욱 크게 작용할 것으로 판단된다. 또 다른 효과적인 항생제인 Streptogramin 계열의 Q-D은 quinupristin과 dalfopristin이 반합성된 형태로써 세균의 50s ribosome에 결합하여 단백질 합성을 억제하는 살균성 항생제로 잘 알려져 있다[37]. 대개 Methicillin resistant staphylococci (MRS), penicillin/erythromycin resistant Streptococci 그리고 *E. faecalis*에 대한 활성은 낮지만 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* (VSE)등 주로 vancomycin 내성균의 치료에 사용되고 있으며 [38-40] planktonic 상태에서는 그람양성 뿐만 아니라 그람 음성 세균에 대해서도 살균효과를 나타낸다는 보고가 있다 [41]. 또한 고농도이긴 하지만 1024 μg/ml 농도에서 catheter에 부착된 *S.aureus*를 감소시킨다 는 보고도 있었다 [42].

지금까지 Bio-Timer법을 이용하여 biofilm bacteria의 viability를 간접적으로 확인하면서 항생제들에 대한 항균활성 정도를 B-MIC와 B-MBC로 확인하였다. 그러나 biofilm bacteria의 항균활성을 증가시키는 항생제 조합을 찾기 위해서 이 중 작용기전이 다른 항생제들을 한가지씩 선별하여 biofilm bacteria의 상승효과를 확인하였다. 그 결과 특이하게도 RIF과 병합한 경우 FIC에서 상승효과를 보였음을 확인할 수 있었다 (Table 3). 앞서 언급한 바와 같이 RIF의 뛰어난 침투능력으로

Collection @ chosun

인해 planktonic과 biofilm bacteria에서 효과가 높다는 보고와 달리 본 연구에서는 biofilm bacteria에 대한 RIF의 살균력은 별다른 효과를 나타내지 않아 기존의 보고와 상반된 결과를 얻었다. 그러나 의외로 RIF과 함께 사용된 항생제들 즉, RIF과 TEC, RIF과 ERY의 경우 FIC에서 상승효과를 보여 아마도 RIF과 biofilm bacteria에 효과적인 다른 항생제들과의 조합들도 상승효과를 나타낼 것으로 판단된다.

또한 biofilm bacteria 이외에 고려되어야 하는 matrix는 biofilm 치료 후 다시 biofilm을 재형성할 수 있다는 측면에서 중요한 의미를 갖는다. 이러한 이유로 최종 선별된 8종의 항생제들을 가지고 biofilm detachment assay를 실시한 결과 bacampicillin, CTX, ERY 그리고 RIF에서 matrix를 제거하는데 효과적이였음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 이 중 rifampin은 사용된 최소 농도인 0.06 μg/ml 에서 최대 80% 이상의 matrix 감소율을 보여 가장 효과적인 항생제임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이는 만성 기관지염과 관련된 병원성 균주 특히, *S.aureus*의 경우 RIF의 0.06 μg/ml 농도에서 이미 형성된 biofilm을 70% 이상 억제한다는 보고[29]와 일치하였으며, catheter에 부착되어 있는 *S.aureus*와 *S.epidermidis*의 biofilm matrix를 제거하는데 다른 효과적인 항생제인 VAN과 TEC 보다 RIF이 가장 효과적이었다는 보고[43]와도 일치하였다. 그 밖에 planktonic과 biofilm 상태에서 RIF과 타 항생제의 병합 시 상승효과를 나타냈다는 보고[10, 26, 44-49]도 있었다.

그리고 biofilm matrix를 최대한 제거할 수 있는 항생제 조합을 찾기 위해 matrix에 효과적인 4종의 항생제들을 가지고 상승효과를 측정하였다. 농도가 고정된 나머지 3종의 항생제 즉, bacampicillin (16 μg/ml), CTX (4 μg/ml) 그리고 ERY (1 μg/ml)을 RIF과 동시에 처리하여 RIF의 농도별 상승효과를 측정한 결과, RIF만 단독으로 처리된 대조군에 비해 ERY과 함께 처리된 경우 RIF의 0.015 μg/ml 농도 이하에서 상승효과를 나타냈음을 확인하였다 (Fig. 4). 이미 Macrolide 계통 항생제들은 fungi나 bacteria에 의해 형성된 biofilm 형성을 억제하거나 제거하는 것으로 알려져 있으며, 주로 그람양성과 이형성 병원균에 대해 항균 효과를 나타내는 항생제인 ERY [50]도 catheter에 형성된 *S.aureus*의 biofilm을

Collection @ chosun

제거하는데 사용되기도 하였다 [51]. 또한 최근 *S.aureus*의 biofilm 상태에서 Macrolides 계열 중 하나인 clarithromycin (이하, CLR)을 cefazolin 또는 VAN과 함께 처리하였을 때 biofilm matrix를 제거하는데 효과적이였다는 것[52]과 내성균주를 실험균주로 사용한 실험에서도 CLR의 농도를 높일수록 다른 항생제의 침투성을 높인다는 보고가 있었다 [53]. 이에 반해 RIF과 기타 다른 2종의 항생제 병합은 상승효과가 없었으며 오히려 고농도에서 길항작용을 보임을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 같은 결과는 세포벽에 작용하는 Cephalosporins 계열의 항생제들이 biofilm을 제거하는데 효과적이여서 RIF, Macrolides 그리고 Aminoglycosides계열과 같은 항생제들의 접근을 용이하게 한다[54]는 일부 보고와 상충된 양상을 나타냈다.

결론적으로 다시 말하자면 biofilm matrix에 효과적인 RIF과 ERY을 biofilm bacteria에 효과적인 항생제, 예를 들면 AMK이나 TOB 등과 함께 병합하여 사용한다면 biofilm을 제거하는데 효과적일 것으로 판단된다. 그러나 RIF의 경우 잦은 사용으로 인해 내성을 획득하기 쉬운 항생제로 잘 알려져 있기 때문에 내성률이 낮은 또 다른 물질들과의 병합은 biofilm 관련 질환을 치료하는데 도움을 줄 것으로 판단된다.

dCollection @ chosun

Ⅴ. 요약 및 결론

배 경: 현재 사용되고 있는 항생제에 대한 내성율은 점차 증가하고 있는 추세이며 이러한 내성율을 증가시키는 기전 중의 하나로 biofilm이 잘 알려져 있다. 그리고 병원감염의 가장 흔한 원인균인 *S. aureus* 또한 여러 의학장비의 표면에 부착하여 biofilm을 형성함으로써 질병을 유발하기 때문에 치료에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 그러므로 biofilm에 의한 *S. aureus* 감염 증 치료 시에 biofilm에 효과적인 항생제를 선택하기에 필요한 자료가 절실히 필요한 실정이다.

방 법: Biofilm을 약하게 형성하는 CYL1135 균주와 상대적으로 2배 이상 강하게 형성하는 CYL1106 균주를 실험에 사용하였다. 이들 실험균주에 대해서 24개 항생제의 항균효과, 즉 B-MIC와 B-MBC 그리고 biofilm에 우수한 항균효과를 보인 항생제 병합이 biofilm에 미치는 항균효과를 Bio-Timer 방법을 사용하여 확인하였다. 또한 단일 항생제와 선택된 항생제의 병합이 biofilm matrix를 제거하는 능력을 biofilm matrix detachment assay를 통하여 확인하였다.

결 과: P-MIC와 B-MIC를 비교 시, MXF, CRO, ERY 그리고 Q-D의 항생제의 P-MIC가 biofilm 형성 정도와 관계없이 동일한 B-MIC를 보여 침투성이 우수한 항생제이었다. Biofilm 효과적인 항균효과를 보이는 항생제를 확인하기 위해서 B-MIC와 B-MBC를 분석한 결과, AMK, TOB의 항생제들은 biofilm 형성 정도에 관계없이 실험에 사용한 항생제 중에서 biofilm에 제일 우수한 살균효과를 보였다. 그러나 RIF은 biofilm 형성한 실험균주에서 살균효과가 600배에서 1000배 이상 가장 현저히 감소하였다. 항생제의 병합 시에 TEC과 RIF 그리고 RIF과 ERY 병합 시 FIC index가 각각 0.26, 0.38을 보여 상승효과를 나타냈다. 실험에 사용한 항생제의 biofilm matrix 제거능력을 확인한 경우, biofilm matrix를 60% 이상 제거한 항생제는 bacampicillin, CTX, RIF 이었으며, 그 중 RIF은 자신의 B-MBC 농도보다 낮은 0.015 μg/ml 농도에서 80% 이상의 biofilm matrix 제거율을 보였으나 RIF과 ERY의 병합 시에는 RIF 단일 약제 사용 시에 보다 약 500 배

Collection @ chosun

낮은 0.03 ng/ml 농도에서도 80%의 동일한 biofilm matrix 제거율을 보여 최고의 상승효과를 보였다.

결 론: MXF, CRO, ERY 그리고 Q-D은 타 약제에 비해서 biofilm에 침투성이 좋은 항생제로 생각되며, Aminoglycosides 계열의 항생제 중에서도 AMK과 TOB 항생제가 다른 항생제에 비해 biofilm 형성 정도에 상관없이 biofilm에 우수한 살균효과를 보이는 항생제로 판단된다. RIF의 경우, biofilm에 침투력이 가장 떨어지며, biofilm 형성 시에 살균효과 또한 현저히 감소되는 항생제이었다. 그러나 흥미롭게도 RIF의 경우 자신의 B-MIC 보다도 낮은 농도에서 80%의 biofilm matrix를 제거할 수 있는 가장 효과적인 항생제였으며, RIF과 ERY과의 병합 시에는 RIF의 단일약제 시 보다 훨씬 500배 낮은 농도에서 동일한 biofilm matrix 제거 효과를 보였다. 본 실험 결과를 바탕으로, 먼저 AMK 혹은 TOB을 사용하여 biofilm 내의 *S. aureus* 를 죽이며 동시에 RIF과 ERY의 병합적으로 사용하여 *S. aureus*가 형성하는 biofilm matrix를 효과적으로 제거하는 것이 *S. aureus*가 형성하는 biofilm 감염증 치료에 최선의 대안이 될 수 있다고 사료된다.

dCollection @ chosun

Ⅵ. 감사의 말씀

지나가는 거리마다 활기찬 생명의 기운이 느껴지는 여름이 시작되었습니다. 재작년 이맘때 쯤 다시 시작된 학교 생활에 대한 부푼 기대를 안고 이곳 미생물 실험실에 들어온 지도 엊그제 같은데 벌써 2년이란 시간이 훌쩍 지나 졸업할 시기가 되었습니다. 돌이켜 보면 그 동안 이곳 실험실에서 있었던 힘든 시간들, 좋은 사람들을 만나 때론 위로 받고 때론 응원을 받으면서 쌓았던 좋은 추억들, 이 모든 시간들이 저에겐 평생 잊혀지지 않은 기억이 될 것입니다.

제가 대학원 석사과정을 무사히 마칠 수 있었던 데에는 많은 분들의 관심과 응원이 있었습니다. 특히 처음 이곳에 들어와 적응하지 못할 때 가족처럼 따뜻하게 챙겨주셨던 임용 교수님과 임동훈 교수님 그리고 실험 배울 땐 많이 혼을 내셨지만 그래도 마지막엔 웃으면서 위로 해 주셨던 권안성 선생님께 감사를 드립니다. 또한 갈 때마다 반갑게 맞아준 형선 언니와 심적으로 나에게 위로가 되어주고 격려해 주었던 저의 절친 유미 그리고 실험에 대해 항상 함께 고민해 주고 얘기 나눴던 후배 나리한테도 정말 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 뿐만 아니라 힘들 때 가까이에서 항상 힘이 되어 주고 배우고 싶던 실험들도 싫은 내색 없이 잘 가르쳐 주셨던 윤차경 박사님 그리고 대학원을 들어와 인연을 맺었던 모든 분들에게 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

그러나 무엇보다 저의 정신적인 지주이자 가장 소중한 보물인 사랑하는 나의 가족들에게 고마우면서도 한편으로는 죄송한 마음을 보냅니다. 처음 대학원에 들어간다고 했을 때 반대를 하셨지만 결국 저를 믿어주시고 응원해 주셨던 저의 부모님, 멀리 떨어져 있지만 항상 조언을 아끼지 않았던 언니 그리고 사랑스러운 내 여동생 효진이와 때론 귀엽고 때론 믿음직스러운 남동생 호영이까지 저의 가족 모두에게 사랑한다고 말하고 싶습니다. 과거와 현재 그리고 미래의 나의 삶이 가족들에게 얼마만큼 믿음을 주었고 또한 신뢰를 얻을 수 있을지 알 수 없지만, 매 순간 마다 후회 없는 선택과 최선을 다한 삶을 살 수 있도록 항상 노력하는 모습을 보여드리겠습니다. 그리고 다시 한번 가족들에게 사랑한다는 말을 전하고 싶고 이곳에서 인연을 맺었던 모든 분들에게 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다.

Collection @ chosun

Table 1. Planktonic MIC and MBC

antimicrobial agents	MIC[a] (μg/ml)	MBC[b] (μg/ml)
Bacampicillin	0.25	0.25
AMC	0.5	1
SAM	1	1
CIP	0.125	0.25
LVX	0.125	0.125
MXF	0.06	0.06
NOR	0.5	0.5
OFX	0.25	0.25
CEC	1	2
CTX	0.5	4
CRO	2	2
AMK	2	2
KAN	1	1
Sisomycin	0.25	0.25
STR	8	8
TOB	0.5	0.5
TEC	0.125	0.25
VAN	0.5	0.5
ERY	0.25	0.5
FOF	2	16
Fusidic acid	0.015	0.125
Q-D	0.125	0.125
RIF	0.003	0.006
SXT	0.5	0.5

- a : minimum inhibitory concentration
- b : minimum bactericidal concentration

Collection @ chosun

Table 2. Biofilm MIC and MBC

antimicrobial agents	CYL1135 (Low-biofilm)		CYL1106 (High-biofilm)	
	MIC[a] (μg/ml)	MBC[b] (μg/ml)	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
Bacampicillin	0.5	8	0.5	16
AMC	1	16	1	64
SAM	2	64	2	64
CIP	0.5	4	0.5	4
LVX	0.25	2	0.25	4
MXF	0.06	0.125	0.06	0.5
NOR	1	1	1	16
OFX	0.25	0.5	1	8
CEC	4	128	8	512
CTX	1	32	2	64
CRO	2	128	2	128
AMK	8	16	16	16
KAN	16	16	16	64
Sisomycin	2	4	2	128
STR	16	32	16	128
TOB	2	4	2	4
TEC	0.25	2	1	4
VAN	1	4	2	16
ERY	0.25	4	0.25	8
FOF	64	128	128	1024
Fusidic acid	0.125	1	8	8
Q-D	0.125	0.5	0.125	1
RIF	<0.03	0.06	2	64
SXT	1	8	4	32

- a : minimum inhibitory concentration
- b : minimum bactericidal concentration

Collection @ chosun

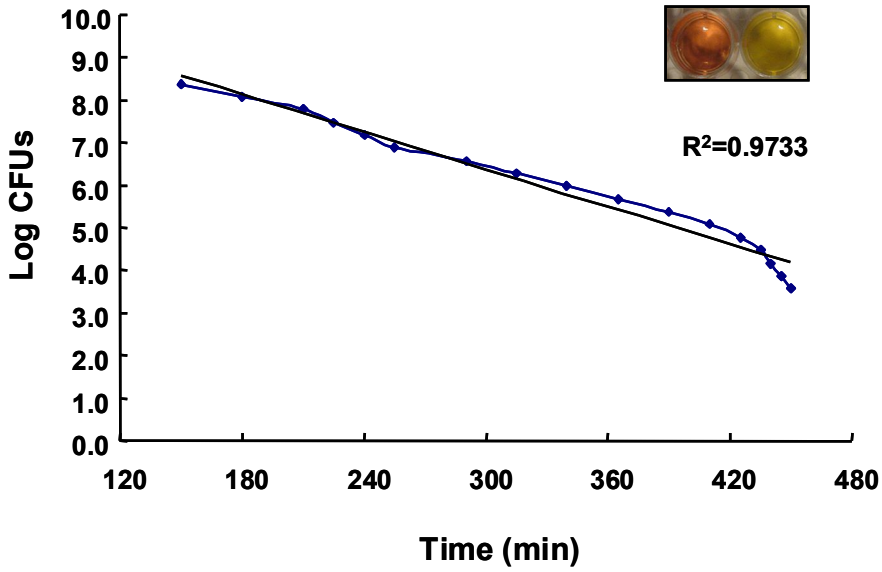
Table 3. FIC and FBC indexes of antibiotics on biofilm for CYL1106 strain

antimicrobial agents	FIC[a] index	FBC[b] index
TEC (μg/ml) + MXF (μg/ml)	2 (indefference)	18 (antagonism)
TEC (μg/ml) + TOB (μg/ml)	1.13 (indefference)	2.5 (indifference)
TEC (μg/ml) + Q-D (μg/ml)	10 (antagonism)	4 (antagonism)
TEC (μg/ml) + RIF (μg/ml)	0.26 (synergy)	3 (indifference)
RIF (μg/ml) + ERY (μg/ml)	0.38 (synergy)	1.5 (indefference)

- a : fractional inhibitory concentration
- b : fractional bactericidal concentration
- FIC or FBC of drug A (FICA or FBCA) = MIC of drug A in combination/MIC of drug A alone, FIC or FBC of drug B (FICB or FBCB) = MIC of drug B in combination/MIC of drug B alone [56]. FIC or FBC index (FICI or FBCI), calculated as the sum of each FIC or FBC, was interpreted as follows: FICI or FBCI ≤0.5 = synergy, >0.5 and <1 = partial synergy, 1 = addition, >1 and <4 = indifference, ≥4 = antagonism [57].

Collection @ chosun

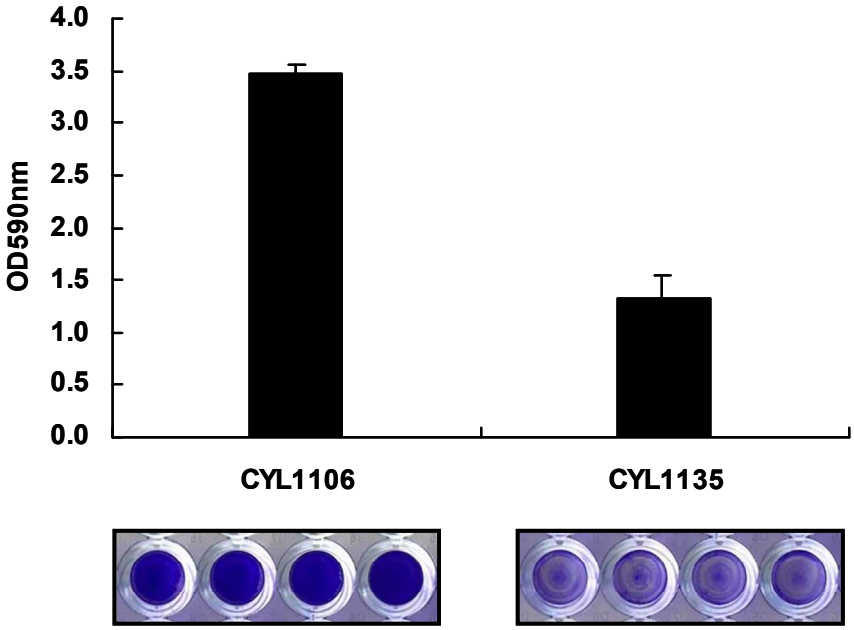
Fig. 1. Correlation line



Cell Number (CFU/ml)	Time (red->yellow)
2.43×10^8	150min
1.21×10^8	180min
⋮	⋮
4.74×10^5	365min
⋮	⋮
7.41×10^3	445min
3.7×10^3	450min

Collection @ chosun

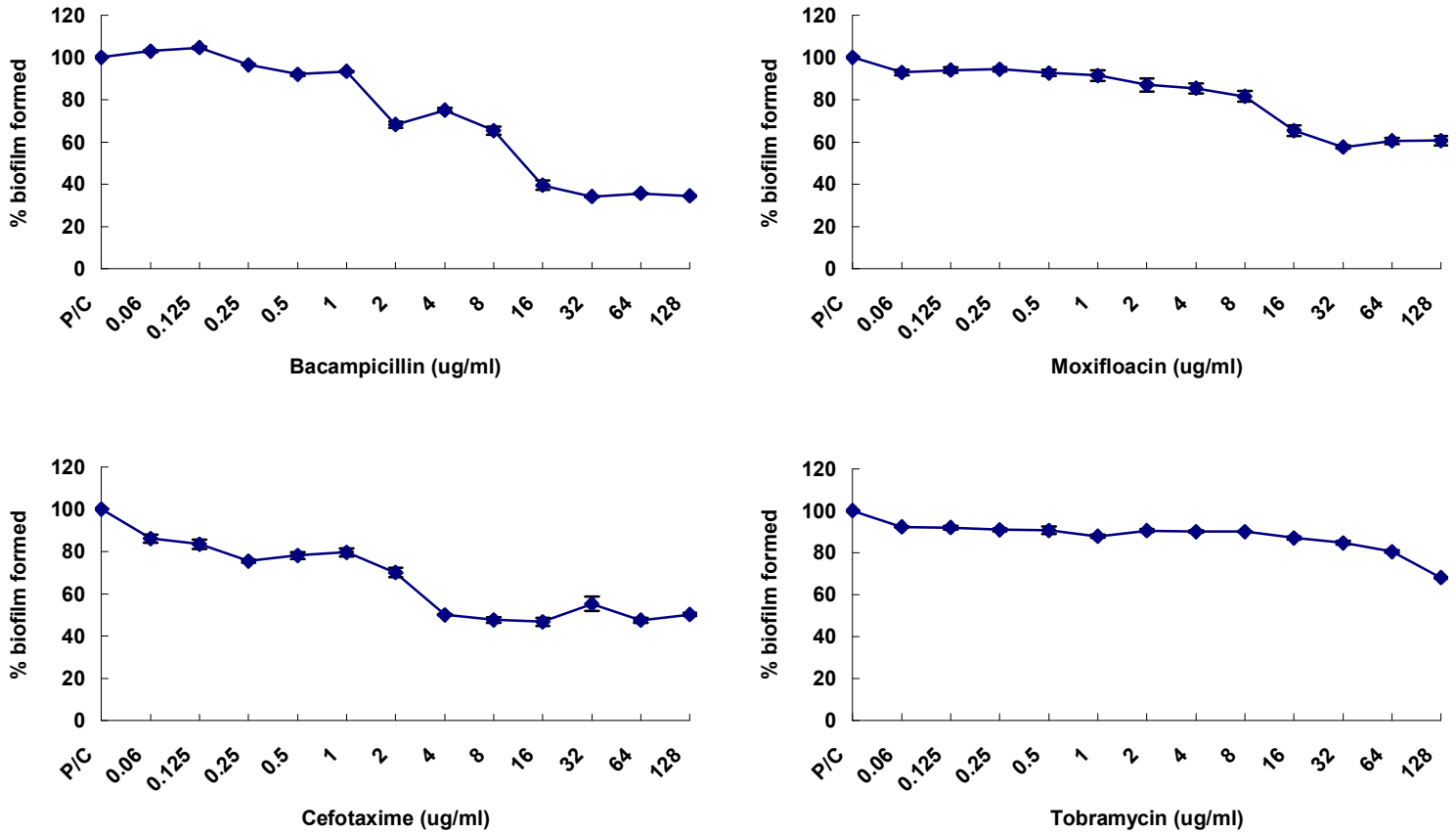
Fig. 2. Biofilm assay



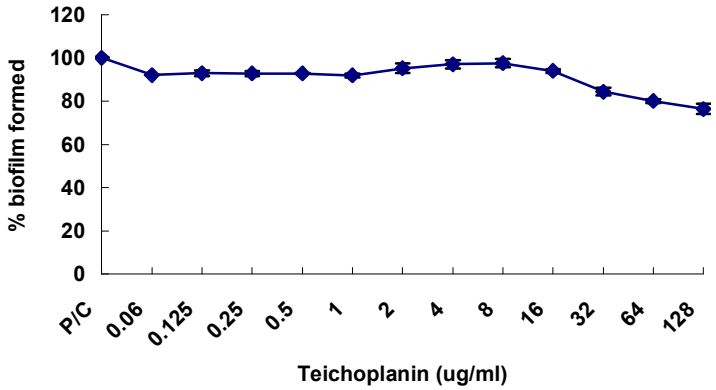
- Biofilm assay was stained by crystal violet.

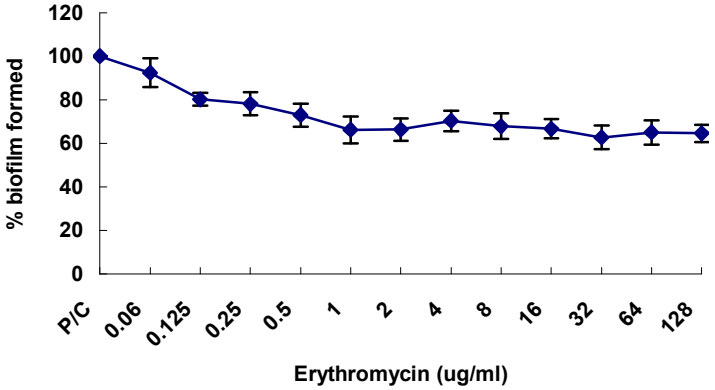
Collection @ chosun

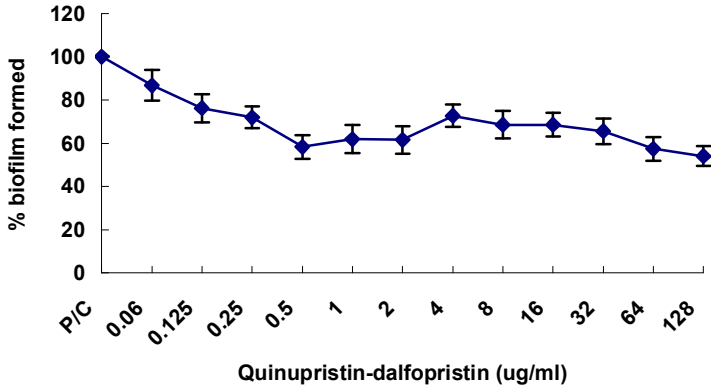
Fig. 3. Biofilm detachment assay of antibiotics on matrix for CYL1106 strain

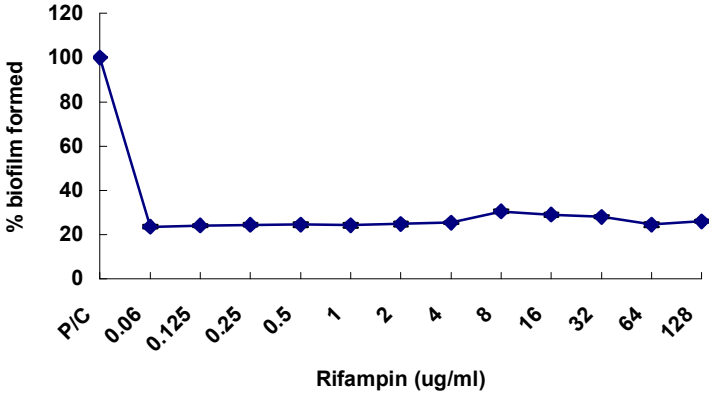


Collection @ chosun



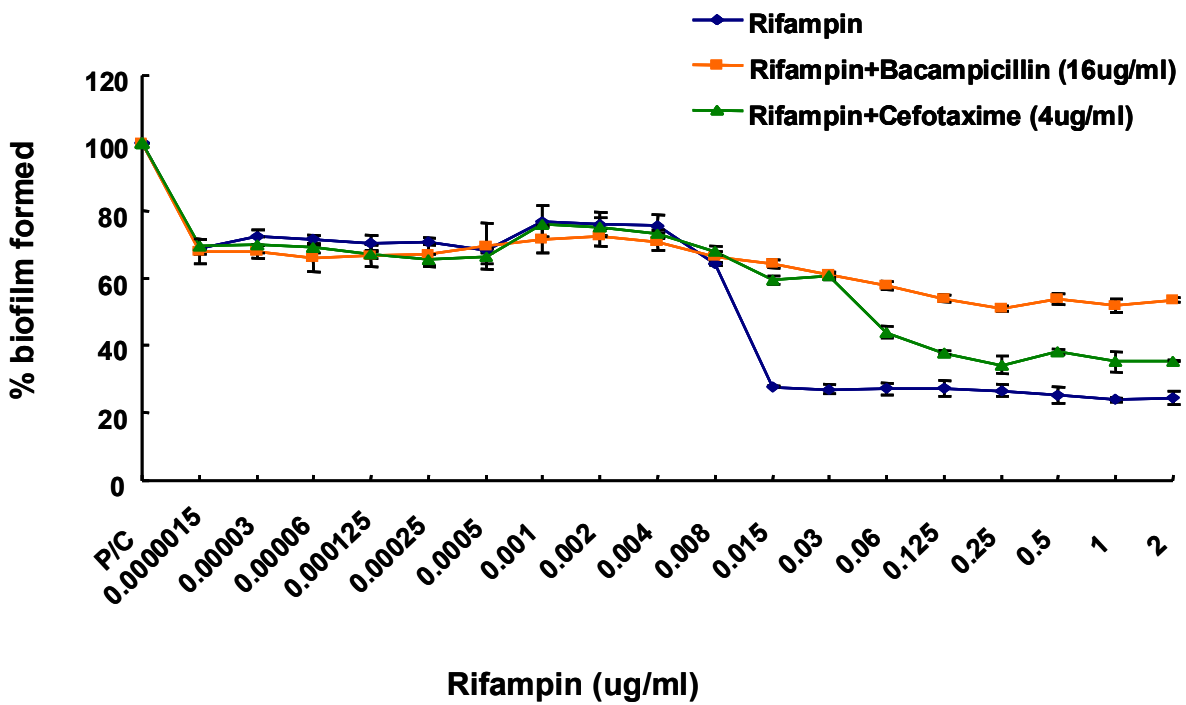




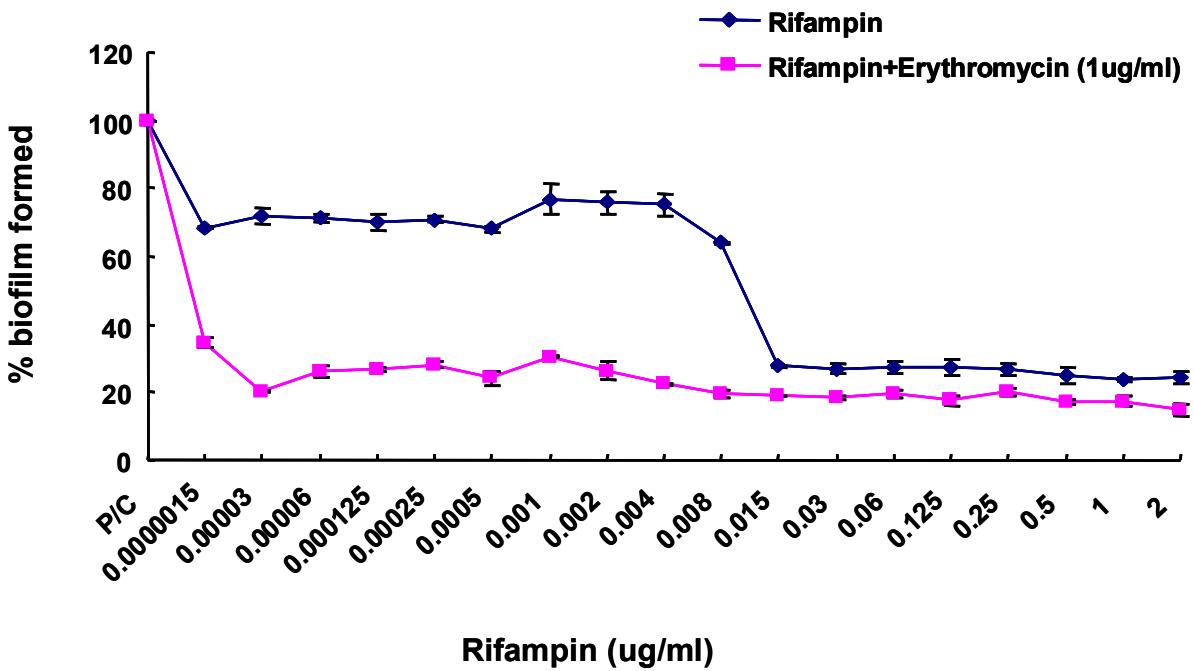


Collection @ chosun

Fig. 4. Synergy effect of antibiotics on biofilm matrix for CYL1106 strain



Collection @ chosun



Collection @ chosun

Ⅶ. 참고문헌

1 Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of pseudomonas aeruginosa cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2006; **72**: 2064-2069.

2 Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; **27**: 619-624.

3 Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; **358**: 135-138.

4 Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005; **28**: 1062-1068.

5 Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing pseudomonas aeruginosa. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; **27**: 196-200.

6 Villain-Guillot P, Gualtieri M, Bastide L, Leonetti JP. In vitro activities of different inhibitors of bacterial transcription against staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**: 3117-3121.

7 John JF, Harvin AM. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther Clin Risk Manag*. 2007; **3**: 1143-1152.

8 Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. Biotimer assay, a new method for counting staphylococcus spp. In biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods*. 2008.

9 Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J*. 2000; **46**: S47-52.

10 Rose WE, Poppens PT. Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother*. 2009; **63**: 485-488.

11 Shapiro JA. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*. 1998; **52**: 81-104.

12 Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Distinctin improves the efficacies of glycopeptides and betalactams against staphylococcal biofilm in an experimental model of central venous catheter infection. *J Biomed Mater Res A*. 2007; **81**: 233-239.

13 Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005: 41-47.

14 Ando E, Monden K, Mitsuhata R, Kariyama R, Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Med Okayama*. 2004; **58**: 207-214.

15 Cirz RT, Jones MB, Gingles NA, et al. Complete and sos-mediated response of staphylococcus aureus to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*. 2007;

Collection @ chosun

189: 531-539.
16 Baltch AL, Ritz WJ, Bopp LH, Michelsen P, Smith RP. Activities of daptomycin and comparative antimicrobials, singly and in combination, against extracellular and intracellular staphylococcus aureus and its stable small-colony variant in human monocyte-derived macrophages and in broth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1829-1833.
17 Tote K, Berghe DV, Deschacht M, de Wit K, Maes L, Cos P. Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2009.
18 Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and nacl-induced biofilm formation by rbf in staphylococcus aureus. *J Bacteriol*. 2004; 186: 722-729.
19 Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52: 1.
20 Kwon AS, Park GC, Ryu SY, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of staphylococcus aureus. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32: 68-72.
21 Khardori N, Wong E, Nguyen H, et al. Effect of subinhibitory concentrations of clindamycin and trospectomycin on the adherence of staphylococcus epidermidis in an in vitro model of vascular catheter colonization. *J Infect Dis*. 1991; 164: 108-113.
22 Pascual A, Garcia I, Ballesta S, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 12-15.
23 Yagci R, Oflu Y, Dincel A, et al. Penetration of second-, third-, and fourth-generation topical fluoroquinolone into aqueous and vitreous humour in a rabbit endophthalmitis model. *Eye*. 2007; 21: 990-994.
24 Pesanti EL. Protection of staphylococci ingested by macrophages from the bactericidal action of rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; 18: 208-209.
25 Zheng Z, Stewart PS. Penetration of rifampin through staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 900-903.
26 Kadurugamuwa JL, Sin LV, Yu J, et al. Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3130-3137.
27 Nichols WW, Evans MJ, Slack MP, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid pseudomonas aeruginosa. *J Gen Microbiol*. 1989; 135: 1291-1303.
28 Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1446-1453.
29 Roveta S, Schito AM, Marchese A, Schito GC. Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30:

Collection @ chosun

415-421.

30 Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of staphylococcus lugdunensis clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**: 888-895.

31 Kim DH, Stark WJ, O'Brien TP, Dick JD. Aqueous penetration and biological activity of moxifloxacin 0.5% ophthalmic solution and gatifloxacin 0.3% solution in cataract surgery patients. *Ophthalmology*. 2005; **112**: 1992-1996.

32 Solomon R, Donnenfeld ED, Perry HD, et al. Penetration of topically applied gatifloxacin 0.3%, moxifloxacin 0.5%, and ciprofloxacin 0.3% into the aqueous humor. *Ophthalmology*. 2005; **112**: 466-469.

33 Wagner RS, Abelson MB, Shapiro A, Torkildsen G. Evaluation of moxifloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, and levofloxacin concentrations in human conjunctival tissue. *Arch Ophthalmol*. 2005; **123**: 1282-1283.

34 Michot JM, Seral C, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in j774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**: 2429-2437.

35 Michot JM, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Active efflux of ciprofloxacin from j774 macrophages through an mrp-like transporter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**: 2673-2682.

36 Perletti G, Wagenlehner FM, Naber KG, Magri V. Enhanced distribution of fourth-generation fluoroquinolones in prostatic tissue. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; **33**: 206-210.

37 Cocito C, Di Giambattista M, Nyssen E, Vannuffel P. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1997; **39 Suppl A**: 7-13.

38 Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zervos MJ. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: Mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2004; **38**: 92-98.

39 Speciale A, La Ferla K, Caccamo F, Nicoletti G. Antimicrobial activity of quinupristin/dalfopristin, a new injectable streptogramin with a wide gram-positive spectrum. *Int J Antimicrob Agents*. 1999; **13**: 21-28.

40 Eliopoulos GM. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: Evidence and opinion. *Clin Infect Dis*. 2003; **36**: 473-481.

41 Bouanchaud DH. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J Antimicrob Chemother*. 1997; **39 Suppl A**: 15-21.

42 Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Comparative efficacies of quinupristin-dalfopristin, linezolid, vancomycin, and ciprofloxacin in treatment, using the antibiotic-lock technique, of experimental catheter-related infection due to staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**: 4042-4045.

43 Lee JY, Ko KS, Peck KR, Oh WS, Song JH. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (alt) for the treatment of catheter-related

Collection @ chosun

infections caused by staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2006; **57**: 1110-1115.

44 Bliziotis IA, Ntziora F, Lawrence KR, Falagas ME. Rifampin as adjuvant treatment of gram-positive bacterial infections: A systematic review of comparative clinical trials. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; **26**: 849-856.

45 Barberan J, Aguilar L, Gimenez MJ, Carroquino G, Granizo JJ, Prieto J. Levofloxacin plus rifampicin conservative treatment of 25 early staphylococcal infections of osteosynthetic devices for rigid internal fixation. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **32**: 154-157.

46 Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of staphylococcus spp. Infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J Antimicrob Chemother*. 1997; **39**: 235-240.

47 Arditi M, Yogev R. In vitro interaction between rifampin and clindamycin against pathogenic coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; **33**: 245-247.

48 Brandt CM, Rouse MS, Tallan BM, Laue NW, Wilson WR, Steckelberg JM. Effective treatment of cephalosporin-rifampin combinations against cryptic methicillin-resistant beta-lactamase-producing coagulase-negative staphylococcal experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; **39**: 1815-1819.

49 Lowy FD, Chang DS, Lash PR. Synergy of combinations of vancomycin, gentamicin, and rifampin against methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983; **23**: 932-934.

50 Giamarellos-Bourboulis EJ. Macrolides beyond the conventional antimicrobials: A class of potent immunomodulators. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **31**: 12-20.

51 Wu CY, Lee PI. Antibiotic-lock therapy and erythromycin for treatment of catheter-related candida parapsilosis and staphylococcus aureus infections. *J Antimicrob Chemother*. 2007; **60**: 706-707.

52 Fujimura S, Sato T, Mikami T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against staphylococcus aureus biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **32**: 481-484.

53 Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Yokota T. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by staphylococcus epidermidis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; **38**: 138-141.

54 Amorena B, Gracia E, Monzon M, et al. Antibiotic susceptibility assay for staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 1999; **44**: 43-55.

55 CLSI, 2006. Performance Standards for Antimicrobial Testing; 16th Informational Supplement (M100-S16). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Collection @ chosun

56 Eliopoulos, G. M. & Moellering, R. C. Antimicrobial combinations. In Antibiotics in Laboratory Medicine (Lorian, V., Ed.), 1996. pp. 330–96.

57 Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA. Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. 52, 1.

Collection @ chosun

저작물 이용 허락서

학과	바이오 신약 개발학과	학 번	20077568	과 정	석사
성 명	한글: 신 효 정 한문: 申 孝 禎 영문: Shin Hyo-Jung				
주 소	광주 광역시 남구 백운동 제일파크맨션 102동 609호				
연락처	E-MAIL : iris2432@hanmail.net				
논문제목	한글 : Bio-Timer법을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 biofilm에 감수성 있는 항생제의 검색 및 rifampin과 erythromycin의 biofilm matrix에 미치는 상승효과 영어 : Antibiotics effective in biofilm-developed *Staphylococcus aureus* screened using Bio-Timer method and synergistic effect of rifampin and erythromycin on biofilm matrix				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(o) 반대( )

2009 년 8 월

저작자: 신효정 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

Collection @ chosun