

2007 년 2 월

박사학위논문

항생제 내성과 IS256 유전자를

지닌 임상분리 균주

*Staphylococcus aureus*

에서의 균막 형성의 증가

조선대학교 대학원

의 학 과

박 광 철

항생제 내성과 IS256 유전자를

지닌 임상분리 균주

*Staphylococcus aureus*

에서의 균막 형성의 증가

Higher prevalence of biofilm formation in  
antibiotic-resistant and IS256-harboring  
*Staphylococcus aureus* clinical isolates

2007 년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

박 광 철

항생제 내성과 IS256 유전자를  
지닌 임상분리 균주  
*Staphylococcus aureus*  
에서의 균막 형성의 증가

지도교수 조 남 수

이 논문을 의학박사학위 신청논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교대학원

의학과

박광철

# 박광철의 박사학위논문 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 만 우 인

위 원 조선대학교 교수 정 혁 인

위 원 조선대학교 교수 조 현 진 인

위 원 조선대학교 교수 임 용 인

위 원 조선대학교 교수 조 남 수 인

2006 년 12 월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

<b>ABSTRACT</b>	4
<b>1. 서론</b>	6
<b>2. 재료 및 방법</b>	8
2.1. 실험 균주의 동정	8
2.2. 항생제 감수성 검사	8
2.3. 균막 형성 실험	9
2.4. PCR(Polymerase Chain Reaction)	9
2.5. 통계적 분석	10
<b>3. 결과</b>	11
3.1. 항생제 감수성과 다제 내성	11
3.2. 항생제 내성과 균막 형성의 상관관계	11
3.3. 단일 항생제 내성, 다제 내성, 그리고 IS256 존재의 상관관계	12
3.4. Methicillin 내성, IS256 존재율, 그리고 균막 형성율의 상관관계	12
3.5. 균막 형성과 IS256 존재의 상관관계	13
3.6. <i>icaA</i> gene 과 <i>rbf</i> gene 의 발견	13
<b>4. 고찰</b>	14
<b>참고문헌</b>	18

# 표 목 차

표 1. 30 개 항생제의 내성율 -----	24
표 2. 항생제 내성과 균막 형성의 상관관계-----	25
표 3. 다제 내성의 항생제 수와 IS256 존재율, 그리고 균막 형성율의 상관관계-----	26
표 4. 항생제 내성과 IS256 존재의 상관관계-----	27

# 그림 목 차

그림 1. 항생제에 다제 내성을 보이는 MRSA 균주와 MSSA 균주의 분포 ----28

그림 2. 다제 내성의 항생제 수 증가에 따른 IS256 존재율과 균막 형성율----29

그림 3. IS256 존재 여부에 따른 다제 내성을----- 30

그림 4. IS256 존재 여부에 따른 균막 형성율(A)과

균막 형성에 따른 IS256 존재율(B)-----31

# Abstract

## **Higher Prevalence of Biofilm Formation in Antibiotic-Resistant and IS256-harboring *Staphylococcus aureus* clinical Isolates**

**Park Gwang Choel**

**Advisor : Prof. Cho Nam Soo M.D.**

**Department of Medicine,**

**Graduate School of Chosun University**

The formation of biofilms is a major contributing factor to nosocomial infections, which are often associated with the colonization of *Staphylococcus aureus* on the surfaces of medical devices. In order to elucidate the correlation between the antibiotic resistance, which is determined by a standard antibiotic susceptibility test to planktonic cells, and the formation of biofilm with sessile growth, we performed a biofilm assay on 96-well polystyrene plate, coupled with an antibiotic susceptibility test of 30 antibiotics, using a Vitek II automatic system for 101 clinical isolates *S. aureus*. In addition, the presence of IS256 element, which is involved in antibiotic resistance as well as phase variation in *S. aureus* biofilm formation, was determined by PCR. Of the 101 isolates tested, the frequency of biofilm positivity was 29.7%, and that of IS256 presence was 67.3%. The statistical analysis indicated that the strain that were either individual resistance against 18 antibiotic or multiresistance displayed a significantly higher prevalence of biofilm formation and of IS256 presence than those susceptible. Moreover, the IS256-harboring strains exhibited a significantly higher prevalence of biofilm formation than those without IS256. Also, the MRSA strains show a higher frequency of biofilm positivity than the MSSA strains. In conclusion, we noted triangular correlations between the presence of IS256, the antibiotic



resistance and the formation of biofilm. This suggests that antibiotic-resistant *S. aureus* strain are more probable to develop biofilms on medical devices, which renders them more difficult to eradicate by conventional chemotherapy.

*Keywords: Staphylococcus aureus; Biofilm; antibiotic-resistance; IS256*

# 1. 서론

Biofilm(균막)은 의료기구의 표면에서 성장하는 sessile community 이며, 지속 감염(persistent infection)에 관여한다(Costerton, 1999). 균막은 일반 세균의 증식 형태인 planktonic cells 에서보다 높은 항생제 내성을 보인다. 그 이유로는 네 가지가 있는데, 첫째는 균막에 대한 항생제의 낮은 침투력이고, 둘째는 균막을 형성하는 세균의 증식이 활발하지 못하기 때문이다. 셋째는 균막이 의료기구와 같이 세균이 증식하기에는 열악한 환경하에서 형성되는 특수한 구조물이기에 일반 세균이 성장할 때와는 다른 복잡한 대사과정이 관여하기 때문이고, 넷째는 이미 항생제에 내성을 갖는 세균이 균막을 형성하는 경우에 균막을 치료하기 위해서 사용하는 항생제가 균막에 작용하여 효과를 보이기도 전에 이미 획득하고 있는 항생제 내성기전을 이용하여 해당 항생제의 활성을 무력화시키기 때문이다. 위 네 가지가 항생제에 내성을 갖는 기전으로 작용하는데 각 기전은 동시에 작용할 수 있기 때문에 균막을 형성한 세균은 항생제에 내성이 높게 나타난다(Lewis, 2001; Stewart, 2001).

*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)은 의료기기와 관련된 병원감염(nosocomial infection, hospital-acquired infection)을 빈번히 일으키는 병원성 세균이다. *S. aureus*가 다양한 의료기구의 표면에 균막을 형성할 수 있는 것이 병원감염의 주요한 기전으로 알려져 있다(Ammendolia, 1999; Costerton, 1999; Manago, 2006;). *S. aureus*와 coagulase-negative staphylococci는 인공 관절과 인공 혈관을 이식 하는 경우에 그 분리율이 비슷하지만, *S. aureus*에 의한 감염의 경우가 coagulase-negative staphylococci(특히 *Staphylococcus epidermidis*(*S. epidermidis*))의한 감염보다 이환율과 사망율이 더 높다(Steckelberg, 1994). *S. aureus*의 균막 형성과 관련된 인자들로서는 poly-*N*-acetylucosamine(Cramton, 1999), teichoic acid(Gross, 2001), alpha-toxin(Caiazza, 2003), 그리고 Rbf(Lim, 2004) 등이 보고 되었다. *S. aureus*은 흔히 사용하는 여러 일반 항생제에 다양한 내성을 보인다고 보고 되었다(Draghi, 2006; Klevin, 2006). 이러한 이유로, 만약 항생제

내성을 나타내는 균주가 균막을 형성한다면 균막 치료에 사용되는 항생제가 균주가 지니는 항생제 내성 기전에 의해서 파괴되기 때문에 항생제는 치료 효과를 기대하기 힘들다. 이러한 가설을 전제로, 본 실험에서는 임상환경에서 분리된 101 주의 *S. aureus* 을 대상으로 polystyrene 96-well culture plate 에서 확인된 균막 형성의 유무와 30 가지의 항생제에 대한 감수성을 확인 하여 균막 형성과 항생제 내성 사이의 관계를 규명하고자 하였다.

IS256은 staphylococcal genome 에서 독립적 혹은 Tn4001 의 일부로서 존재한다(Dyke, 1992). IS256은 staphylococci 에서 항생제 내성 뿐 아니라 균막 형성과 관련이 있다고 보고 되었는데 이러한 보고들을 살펴보면, *S. epidermidis* 에서는 IS256 의해서 염색체의 재배열이 유도 되고 이는 균막 형성에 영향을 미친다(Zeib-  
uhr, 2000). 또한 *S. aureus* 균주에서는 IS256 이 *tcaA* gene 으로 삽입되어서 glycopeptide 내성이 증가 되었음이 보고 되었다(Maki, 2004). *Staphylococcus sciuri* 균주의 경우, IS256 이 *mec A* homologue 유전자 앞 쪽에 삽입 되어서 해당 유전자의 transcription 이 증가되었다(Couto, 2003). 양쪽 말단 부가 IS256 으로 구성 되어 있는 Tn4001 은 *S. aureus* 와 *S. epidermidis* 에서 균막 형성 뿐만 아니라 aminoglycoside 계 항생제에 대한 내성과 관련이 있다고 보고 되었다(Byrne, 1989; Kozitskaya, 2004). IS256 이 Ica gene cluster 에 삽입되거나, 다시 빠져 나옴으로 인해 균막 형성이 좌우되는 것이 *S. aureus* 와 *S. epidermidis* 균주에서 관찰 되었다(Kiem, 2004; Ziebuhr, 1999).

상기에서 기술한 기존의 보고를 바탕으로 본 연구에서는 임상환경에서 분리된 101 주의 *S. aureus* 균주를 대상으로 3 가지 주요 요소인 균막 형성의 유무, 항생제 내성을, IS256 존재 사이의 관계에 대한 통계학적인 의미를 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 균주의 동정

본 실험에 사용한 균주는 광주 소재의 3 개의 종합병원에서 분리하여 제공한 101 주의 *S. aureus* 를 실험에 사용하였다. *Staphylococcus carnosus* KCTC 3580 균주는 균막형성 실험과 항생제 감수성 검사에서 음성 대조균으로 사용하였다. 또한 실험에 사용한 101 주의 *S. aureus* 균주의 경우, API-Staph system 으로 1 차 동정하였으며, *S. aureus*-specific gene 인 *nuc* 의 존재를 PCR 을 통해서 확인하여 *S. aureus* 임을 최종 동정하였다( Brakstad, 1992).

### 2.2. 항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 AST-P536 susceptibility-testing card 가 들어 있는 Vitec II 을 사용해서 minimal inhibitory concentration 으로 결정하였다. 검사 된 30 개 항생제는; benzylpenicillin(PEN), ampicillin(AMP), oxacillin(OXA), amoxicillin/ clavulanic acid(AMC), ampicillin /sulbactam(SAM), imipenem(IPM), ciprofloxacin(CIP), levofloxacin(LVX), moxifloxacin(MXF), norfloxacin(NOR), tobramycin(TOB), tetracycline(TET), fosfomycin(FOF), linezolid(LZD), nitrofurantoin(NIT), clindamycin (CLI), erythromycin(ERY), azithromycin(AZM), clarithromycin(CLR), gentamycin (GEN), rifampin(RIF), teichoplanin(TEC), vancomycin(VAN), fusidic acid (FSA), cefaclor(CEC), cefotaxim(CTX), ceftriaxone(CRO), cefuroxime(CXM), trimethoprim /sulfamethoxazole(SXT), quinupristin/dalfopristin(Q-D)이다. 각 항생제 대한 감수성 결과는 National Committee for Clinical Laboratory Standard criteria 를 기준으로 판정하였다.

### 2.3. 균막 형성 실험

Polystyrene 으로 만든 96 well 세포배양 접시에서 균막 형성을 확인하였으며, 그 방법은 Heilmann 등에 의해 보고된 방법을 사용하였다 (Heilmann, 1996). 균막 형성 실험을 서술하면, 하룻밤 배양한 균주를 0.25% glucose 첨가한 Tryptic soy broth(TSB)에 200 배로 희석 시켰으며, 실험 균주의 증식은 660nm 에서 OD 값 4.0 으로 맞췄다. 희석된 세균 배양액 200  $\mu$ l 을 96 well flat-bottom polystyrene microculture plates 의 각 well 에 넣었다. 37 도에서 48 시간 동안 배양한 후에, 각 well 을 200ul PBS 로써 2 회 세척하여, 공기 중에 말린 후, 1 분 동안 0.1% safranin 염색하였다. Micro-ELISA reader 를 이용하여 490nm 에서 그 흡광도를 측정하였다. 이러한 실험을 총 3 회 반복 실험하여 평균이 최소 0.15 이상의 흡광도를 보이는 경우에 균막을 형성한 것으로 간주하였다.

### 2.4. PCR(Polymerase Chain Reaction)

Genomic DNA 는 Promega 사에서 구입한 kit 를 사용하여 분리하였다. IS256 gene 의 존재를 PCR 로 확인하기 위해서 Gu 등이 보고한 primer 를 사용하였다(Gu, 2005). *icaA* gene 을 확인하기 위한 primer 는 5'-GATTATGTAATGTGCTTGA-3'와 5'-ACTACTGCTGCGCGTTAATAAT-3' 을 사용하였다. *rbf* gene, 580 -bp internal fragment 를 확인하기 위해서는 5'-TGACGCTGATATTAGAAAATTACAGGAT-3' 와 5'-ACCGTTTGAAACAATTTAGGTGTTT-3' 을 사용하여 증폭 하였다. House keeping gene 으로 350-bp *gyrase* gene 을 확인하기 위해서는 5'-GTCCTTTTACGGTACAATG-3'와 5'-TGTGCGCATCAGAAATAACG-3' primer 를 사용하여 증폭하였다. PCR reaction mixture 로써, 750mM Tris- HCL (PH 8.8), 15mM MgCL<sub>2</sub>, 200mM (NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20, *Taq* polymerase 2.5 U 를 사용하였다.

## 2.5. 통계적 분석

모든 통계적 분석은 SPSS version 12.0 을 사용하였으며, 항생제 내성율과 균막 형성율, 그리고 IS256 의 존재율 사이의 상관관계를 Chi-square test 혹은 Fisher's exact test 를 이용하여 분석하였다. p-value 값이 0.05 이하인 경우, 통계적으로 의미가 있다고 판정하였다. 항생제 감수성 검사에서 중등도의 내성을 보이는 경우는 통계 분석 시에 내성으로 간주하였다.

## 3. 결과

### 3.1. 항생제 감수성과 다제 내성

항생제 감수성 검사에서 항생제 작용기전이 같은 동일계열의 항생제에 대한 실험 균주의 내성율은 동일하였다. 즉 aminoglycoside (GEN, TOB)은 72.3%, quinolone(NOR, CIP, LVX, MXF)은 55.4%, 그리고 marcolides (ERY, CLR, AZM)은 65.3%를 나타냈다. CLI, RIF, FOF 와 FSA 에 대한 내성율은 상대적으로 낮은 내성율을 보여서, 각각 38.6%, 23.8%, 31.7% 그리고 16.8%로 나타났다. 실험 균주에서 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)빈도는 65.3%였고, MRSA 균주는 methicillin-susceptible *S. aureus*(MSSA)보다 다제 내성율이 매우 높았다. 즉, MRSA 균주 모두는 12 개 이상의 항생제에 다제내성을 보인 반면, MSSA 균주는 9 개 이하의 항생제에서 다제 내성을 보였다(그림 1). 비록 MRSA 균주가 아주 높은 다제 내성율을 보였지만, TEC, Q-D, LZD 에 내성을 보이는 균주는 없었고, VAN, SXT, NIT 항생제에 대해서는 분리 균주의 99%에서 감수성을 보였다. 그러나 한 균주가 vancomycin 에 대해서 중등도의 내성을 보였다(표 1).

### 3.2. 항생제 내성과 균막 형성의 상관관계

101 주의 실험 균주 중에서 30 주가 균막을 형성하여, 균막 형성율은 29.7%였다. 항생제 내성과 균막 형성율과의 상관관계를 분석한 경우에 균막 형성은 18 개 단일 항생제의 내성과 통계적인 의미가 있었다. RIF 에 내성을 보이는 경우에 균막 형성을 하였으며, 통계적 의미를 확인할 수 있었다 ( $p < 0.001$ )(표 2). 그러나 TET, MXF, FOF, FSA 에 내성은 균막 형성과는 관련이 없었다. 또한 동일한 균주 에서 여러 항생제에 다제 내성을 보이는 경우, 그 다제 내성 항균제의 수가 많을 수록 균막 형성을 잘 하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2). 다제 내성을 보이는 경우에 다제 내성 항생제 수가 2 개 이상, 8 개 이상, 21 개 이상, 23 개 이상인 경우를 각각

그 이하를 보이는 다제 내성의 경우와 균막 형성율을 비교하였을 때, 2 개 이상의 다제 내성의 경우를 제외하고는 다제 내성의 항생제 수가 증가할 수록 균막 형성율이 증가되었으며 통계적 의미를 확인할 수 있었다(표 3).

### 3.3. 단일 항생제 내성과 다제 내성 그리고 IS256 element 존재의 상관관계

PCR 을 통해서 IS256 유전자를 갖고 있는 균주는 68 균주(67.3%)였다. 실험에 사용한 30 개 항생제중 내성을 보이는 20 개 항생제가 IS256 존재와 통계 학적인 의미가 있었다(표 4). 즉, IS256 이 존재한 실험 균주의 경우에 IS256 이 존재하지 않는 균주 보다 항생제 내성율이 높았다. TET 와 MXF 를 제외하고는 IS256 존재와 관련된 항생제 내성율과 균막 형성과 관련된 항생제 내성이 18 개로 일치하였고 rr IS256 존재와 항생제 내성과의 상관관계가 균막 형성율과 항생제와의 상관관계 보다 더 높은 통계적 의미가 있었다(표 2, 4). FOF 와 FSA 에 내성은 IS256 존재와 관련이 없었다. 균막 형성율과 다제 내성의 관계에서와 같이, 다제 내성의 항생제 수가 증가 할수록 IS256 존재율이 높은 것을 알 수 있었다(그림 2). 실험 균주가 IS256 이 존재하는 경우에 IS256 이 없는 경우에 비해서 다제 내성율이 높았다(그림 3). 또한 다제 내성 항생제 수와 IS256 존재 간에는 통계적인 의미가 있었다.

### 3.4. Methicillin 내성과 IS256 element 존재율 그리고 균막 형성율의 상관관계

30 개 균막 형성 균주 중 25 균주가 MRSA 균주, 5 균주가 MSSA 균주로 나타났다(표 2)( $p < 0.001$ ). 그리고 IS256 을 가지고 있는 68 균주 중 54 균주가 MRSA, 14 균주 가 MSSA 균주로 나타났다. 이것은 MRSA 균주가 MSSA 균주보다 균막 형성율이 높고, IS256 유전자를 가질 가능성이 높다는 것을 의미한다.



### 3.5 균막 형성 양성과 IS256 element

균막 형성율은 IS256 이 없는 균주 보다 IS256 을 가지고 있는 균주가 높았고, IS256 을 소유한 *S. aureus* 균주가 균막 형성을 잘 하였다(그림 4)( $p < 0.01$ ).

### 3.6. *icaA* gene 과 *rbf* gene 의 발견

PCR 을 통해서 균막 형성과 연관되어 있는 *icaA* gene 과 *rbf* gene 존재 유무를 확인한 결과, 실험 균주 모두에서 두 가지 유전자가 존재하는 것을 확인 할 수 있었다.

## 4. 고찰

항생제 감수성 결과에서 실험 균주는 aminoglycoside, marcolide, quinolone 계열의 항생제에 55.4%에서 72.3%로 높은 내성을 나타냈다. 그러나 CLI, RIF, FOF 와 FSA 에 대한 내성율은 상대적으로 낮아서 각각 38.6%, 23.8%, 31.7% 그리고 16.8%를 보였다. Tenover 등의 보고에 의하면 세균의 다제 내성이란 세 종류이상의 항생제에 내성이 동시에 나타나는 경우를 의미한다(Tenover, 2006). 이러한 기준으로 볼 때 모든 MRSA 균주는 다제 내성을 보였으며, 그 다제 내성의 정도는 MSSA 균주 보다 더 높았다(그림 1). 다제 내성의 양상은 다른 사람들에 의해 보고된 것과 약간의 차이를 보였다(Draghi, 2006; Millon, 2004; Santos, 2000). 이러한 다제 내성 양상의 차이는 지리적 다양성 때문으로 생각 되었다. 본 연구에서는 TEC, Q-D, LZD, VAN, SXT, NIT 를 포함한 항생제가 아직까지 MRSA 균주에 효과가 있지만 VAN, SXT 에서는 한 균주, NIT 에서는 두 균주가 내성 혹은 감소된 감수성을 보였다.

*S. epidermidis* 임상 분리 균주는 *ica operon* 양성과 음성 균주로 나눌 수 있으며, 이러한 분류는 항생제 감수성에 다른 영향을 보였다. 또한 *ica A gene* 의 존재는 균막 형성과 깊은 관계가 있다고 보고되었다(Cafiso, 2004; Silva, 2002). *S. epidermidis* 경우와는 반대로, 대부분의 *S. aureus* 는 *ica operon* 에 양성으로 알려져 있다(Cramton, 1999; Fowler, 2001). *rbf gene locus* 또한 실험 균주에서 모두 존재하는 것으로 보고 되었다 (Lim, 2004). 이러한 결과와 일치하게, 본 실험에서도 *S. aureus* 실험 균주에서 *icaA* 뿐만 아니라 *rbf gene* 이 모두 존재 함을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 사람의 보고와 일치하였다(Cafiso, 2004; Silva, 2002). 이러한 까닭에 *icaA gene*, *rbf gene* 의 존재와 균막 형성, 항생제 내성율과의 상관관계를 통계적으로 비교하기가 불가능하였다.

다양한 임상적 상황, 특히 의료기기에 의한 감염의 경우, 균막을 형성할 수 있는 *S. aureus* 균주가 균막을 형성하지 못하는 균주보다 더 많이 분리 되었다고 보고 되었다(Ammendolia, 1993). Aricola 등은 *S. epidermidis* 임상 분리 균주에서 CRA

(congo red agar)-positivity 가 63.2% 이었으며, Congo red agar plate 방법을 통하여 확인된 균막 형성은 GEN, AMK, NET, TOB 같은 aminoglycosides 계열의 항생제, CIP, 그리고 SXT 와 의미 있게 관련이 있었다(Aricola, 2005). 본 연구에서는 *S. aureus* 균주의 균막 형성율은 실험 균주인 101 주의 30%였다. 실험 균주의 항생제 내성율과 균막 형성율을 서로 비교하였을 때에 18 개 항생제에 대한 각 내성율은 균막 형성과 연관이 있었다(표 2). 또한 균막 형성율은 항생제 다제 내성을 보인 균주에서 훨씬 더 높았으며 통계적인 의미를 확인할 수 있었다(표 4, 그림 2). 하지만 검사된 균주 거의 대부분에서 다제 내성을 가지고 있기 때문에 항생제 개개 내성이나 다제 내성 혹은 둘 다에서 어느 쪽이 균막 형성과 관련이 있는지가 불분명하다. 그럼에도 불구하고 항생제에 내성을 보이는 *S. aureus* 균주는 균막 형성율이 아주 높다는 결과를 보였다. 균막 내층에 위치한 *S. aureus* 는 항생제 치료 후에도 죽지 않는다는 보고가 있으며(Amorena, 1999), 또한 항생제의 최소 억제농도 이하의 농도(subinhibitory concentrations)에서는 ica 유전자를 발현 시킨다고 보고 되었다(Rachid, 2000). 이러한 결과들을 종합해 보면, planktonic growth 에서의 항생제 내성이 sessile status 에서 균막 형성의 증가와 관계가 있는 본 실험에 대한 해석은 다음과 같다. 즉, 치료 시에 사용하는 항생제가 균막에 대한 침투력이 떨어지기 때문에 균막 내의 세균은 항생제 치료에도 살아 남을 수 있다. 또한 균막 안쪽으로 갈수록 항생제의 농도가 낮아져서 오히려 균막 형성을 촉진시킬 수 있거나 사용한 항생제 대한 내성을 획득할 수 있는 기회가 될 수가 있다. 결국, 살아남은 세균은 임상환경에서 여전히 항생제 내성을 보일 것이며 균막을 더 잘 형성할 수 있으리라 생각된다.

IS256은 staphylococcal genome 에서 독립적 혹은 Tn4001의 일부로서 존재한다(Dyke, 1992). 즉 IS256 는 staphylococcal genome 에서 독자적으로 존재하거나, 혹은 aminoglycoside-modifying enzyme acetyltransferase AAC(6')-phosphotransferase APH(2")의 생산을 담당하는 *aacA-aphD* 유전자를 발현하는 Tn 4001 을 구성하며 존재한다(Byrne, 1989; Dyke, 1992). 본 실험에서는 IS256 이 존재하는 68 주의 세균 중에서 95.6%에 해당되는 약 65 균 주가 gentamicin 과

tobramycin 내성을 보여서 IS256 이 Tn4001 의 일부로서 존재한다는 것을 알 수 있었다.

*S. aureus* 과 *S. epidermidis* 에서, IS256 은 *ica* gene operon 혹은 다른 유전자에 삽입되거나 혹은 빠져 나옴으로써 균막을 형성하거나, 균막 형성 능력이 소실되게 하는 것으로 알려 졌다(Colnon, 2004; Kiem, 2004; Ziebuhr, 1999). 병원성 감염을 일으키는 *S. epidermidis* 균주에서 IS256 는 aminoglycosides 계열의 항생제 내성에 관여하며, 이는 또한 균막 형성에도 관계가 있는 것으로 보고 되었다(Kozitska-ya, 2004). 이러한 기존의 보고를 바탕으로 본 실험에서는 polystyrene plate 에서 확인 된 균막 형성과 IS256 의 존재, 그리고 30 개 항생제 감수성과 IS256 element 존재 사이의 상관관계를 연구하였다. 실제 IS256 존재와 항생제 감수성을 비교 했을 때, 20 개의 항생제 내성 그리고 다제 내성을 보이는 세균의 경우에 그렇지 않는 세균에 비해서 IS256 이 더 많은 빈도로 존재하였다(표 3, 4 . 그림 2, 3). 또한 IS256 존재하는 경우에 균막 형성을 더 잘하는 것을 알 수 있었다(그림 2)( $p < 0.01$ ). 이러한 결과에 대한 가능한 두가지 해석은 다음과 같다. 첫째는 IS256 이 염색체 재배열을 유도하면서 그 결과 항생제 내성이 증가하고, 또한 균막 형성의 빈도가 증가될 수 있다(Ziebuhr, 2000). 둘째는 Tn4001에 존재하는 acetyltransferase AAC(6')-phosphotransferase APH (2")와 같은 항생제 내성과 관련된 어떤 효소가 균막 형성을 자극 할 수 있을 것으로 보인다. 더불어 본 실험의 결과를 볼 때, PCR 을 통해서 IS256 을 확인함으로써, 실제 다제 내성을 보이거나 균막 형성을 할 수 있는 병원성(invasive) *S. aureus* 균주와 *S. aureus* 의 상재균(other commensal strain)를 구별할 수 있어 임상진료의 지침이 될 수 있다고 생각한다. *S. epidermidis* 의 경우에 이러한 주장이 Gu 등에 의해 보고 되었다(Gu, 2005).

본 실험의 또 다른 결과를 보면, polystyrene culture plate 에서 MRSA 균주가 MSSA 균주보다 균막 형성을 더 잘 하는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 *S. epidermidis* 의 경우, methicillin 에 내성을 보이는 균주의 균막을 형성하지 못하는 변이주 (slim-negative phase variants)에서 *mecA* transcription 이 발현되지 않았다는 Mempel 등의 보고와 일치하였다(Mempel, 1994). 또한 Jones 등(Jones, 2001)은 MRSA 에서 형성된 균막이 MSSA 에 의해 형성된 균막 보다 더 두껍다고

보고함으로써 본 실험의 결과를 입증할 수 있었다. 이러한 기존의 보고들과 본 실험의 결과는 methicillin 을 비롯한 기타 다른 항생제에 내성이 있는 *S. aureus* 의 균주에서 균막 형성을 잘 할 수 있음을 예측할 수 있었다.

IS256 유전자 내의 이동(transposition)이 *S. aureus* 와 *Staphylococcus sciuri* 에서 *mecA* transcription 이나 homologue(동족체)를 증진시키는 것으로 알려져 있다(Couto, 2003; Maki, 1997). 실제 본 실험에서도, MRSA 균주에서 IS256 이 존재하는 빈도가 매우 높아서 IS256의 *S. aureus* 유전자 내에서 이동해서 methicillin 의 내성에 관여하는 것으로 유추할 수 있었다.

결론적으로, *S. aureus* 임상 분리 균주에서 methicillin 내성을 비롯한 여러 항생제에 대한 내성, 의료기구에서 균막형성, IS256 존재 등 이들 3 가지 요인 간에는 깊은 상관관계가 있음을 알 수 있다. 또한 이러한 실험의 결과는 균막을 형성하는 *S. aureus* 는 기존의 항생제 치료에는 듣지 않을 수 있어, 새로운 항생제의 개발과 화학요법의 지침이 절실히 요구된다고 할 수 있다.

## 참고 문헌

**Ammendolia, M. G., R. D. Rosa, L. Montanaro, C. R. Arciola, L. Baldassarri.** 1999. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3235-3238.

**Amorena, B., E. Gracia, M. Monzón, J. Leiva, C. Oteiza, M. Pérez, J-L. Alabart, and J. Hernández-Yago.** 1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* biofilms developed *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:43-55.

**Aricola, C. R., D. Campoccia, S. Gamberini, M. E. Donati, V. Pirini, L. Visai, P. Speziale, and L. Montanaro.** 2005. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials.* **26**:6530-6535.

**Brakstad, O. G., K. Aasbakk, and J. A. Maeland.** 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1654-1660.

**Byrne, M. E., D. A. Rouch, and R. A. Skurray.** 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene.* **81**:361-367.

**Cafiso, V., T. Bertuccio, M. Santagati, F. Campanile, G. Amicosante, M. G. Perilli, L. Selan, M. Artini M, G. Nicoletti, and S. Stefani.** 2004. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:1081-1088.

**Caiazza, N. C., and G. A. O'Toole.** 2003. Alpha-toxin is required for biofilm formation by

*Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **185**:3214-3217.

**Colnon, K. M., H. Humphreys, and J. P. O’Gara.** 2004. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotype variation in *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. **186**:6208-6219.

**Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. **284**:1318-1322.

**Couto, I., S. W. Wu, A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2003. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. **185**:645-653.

**Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Götz.** 1999. The intracellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. **67**:5427-5433.

**Draghi, D. C., D. F. Sheehan, P. Hogan, and D. F. Sahn.** 2006. Current antimicrobial resistance profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* encountered in the outpatient setting. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **55**:129-133.

**Dyke, K. G. H., S. Aubert, and N. E. Solh.** 1992. Multiple copies of IS256 in Staphylococci. Plasmid. **28**:235-246.

**Fowler Jr., V. G., P. D. Fey, L. B. Reller, A. L. Chamis, G. R. Corey, and M. E. Rupp.** 2001. The intercellular adhesion locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Med. Microbiol. Immunol. **189**:127-131.

**Gross, M. S., E. Cramton, F. Götz, and A. Peschel.** 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**:3423-3426.

**Gu, J., H. Li, M. Li, C. Vuong, M. Otto, Y. Wen, and Q. Gao.** 2005. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* **61**:342-348.

**Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz.** 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**:1083-1091.

**Jones, S. M., M. Morgan, T. J. Humphrey, and H. Lappin-Scott.** 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet.* **357**:40-41

**Kiem, S., W. S. Oh, K. R. Peck, N.Y. Lee, J. Y. Lee, J. H. Song , E. S. Hwang, E. C. Kim, C. Y. Cha, and K. W. Choe.** 2004. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J. Korean. Med. Sci.* **19**:779-782.

**Klevens, R. M., J. R. Edwards, F. C. Tenover, L. C. McDonald, T. Horan, R. Gaynes, and the National Nosocomial Infections Surveillance System.** 2006. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin. Infect. Dis.* **42**:389-391

**Kozitskaya, S., S. H. Cho, K. Dietrich, R. Marre, K. Naber, and W. Ziebuhr.** 2004. The



bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect. Immun.* **72**:1210-1205.

**Lewis, K.** 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:997-1007.

**Lim, Y., M. Jana, T. T. Luong, and C. Y. Lee.** 2004. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**:722-729.

**Maki, H., and K. Murakami.** 1997. Formation of potent promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**:6944-6948.

**Maki, H., N. McCallum, M. Bischoff, A. Wada, and B. Berger-Bächi.** 2004. *tacA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1953-1959.

**Manago, K., J. Nishi, N. Wakimoto, H. Miyanojara, J. Sarantuya, K. Tokuda, M. Iwashita, K. Yamamoto, M. Yoshinaga, I. Maruyama, and Y. Kawano.** 2006. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **27**:188-190.

**Mempel, M., H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs, and L. Grütter.** 1994. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **38**:1251-1255.

**Millan, L., P. Cerda, M. C. Rubio, P. Goni, M. Canales, S. Capilla, M. Oca, and R. Gomez-Lus.** 2004. In vitro activity of telithromycin, quinupristin/dalfopristin, linezolid and

comparator antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J. Chemother. 16:230-237.

**Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:3357-3363.

**Santos, S. I., R. Mato, H. de Lencastre, A. Tomasz; CEM/NET collaborators and the international collaborators.** 2000. Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococcus collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. Microb. Drug Resist. **6**:199-211.

**Silva, G. D. I., M. Kantzanou, A. Justice, R. C. Massey, A. R. Wilkinson, N. P. J. Day, and S. J. Peacock.** 2002. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. **40**:382-388.

**Steckelberg, J. M., and D. R. Osmon.** 1994. Prosthetic joint infection. p.259-290. In A. L. Bisno, F. A. Waldvogel (ed.), Infections associated with indwelling medical devices, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.

**Stewart, P. S, and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. **358**:135-138.

**Tenover, F. C.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. 2006. Am. J. Med. **119**:S3-S10

**Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lößner, F. Götz, and J. Hacker.** 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**:345-356.

**Ziebuhr, W., K. Dietrich, M. Trautmann, and M. Wilhelm.** 2000. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:115-120.

표 1. 30개 항생제의 내성률

Antibiotics	No. of isolates of antibiotic susceptibility		
	susceptible	resistant	% of resistance
PEN	4	97	96.0
AMP	4	97	96.0
OXA	35	66	65.3
AMC	35	66	65.3
SAM	35	66	65.3
IPM	35	66	65.3
CEC	35	66	65.3
CXM	35	66	65.3
CRO	35	66	65.3
CTX	35	66	65.3
VAN	100	1(1*)	1.0
TEC	101	0	0
TET	35	66 (2)	65.3
GEN	28	73 (6)	72.3
TOB	26	75 (5)	74.3
ERY	35	66 (2)	65.3
CLR	35	66 (2)	65.3
AZM	35	66 (2)	65.3
CLI	62	39	38.6
Q-D	101	0	0
LZD	101	0	0
NOR	45	56	55.4
CIP	45	56	55.4
LVX	45	56 (3)	55.4
MXF	53	48 (22)	47.5
SXT	100	1	1.0
RIF	77	24	23.8
FOF	69	32	31.7
NIT	99	2 (1)	1.0
FSA	84	17 (13)	16.8

\* indicates number of strains showing intermediate susceptibility within no. of resistance strains

표 2. 항생제 내성과 균막 형성의 상관관계

Antibiotics	Frequency of biofilm positivity (%)		significance
	susceptible	resistant	
PEN	0/4 (0)	30/97 (30.9)	NS
AMP	0/4 (0)	30/97 (30.9)	NS
OXA	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
AMC	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
SAM	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
IPM	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
CEC	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
CXM	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
CRO	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
CTX	5/35 (14.3)	25/66 (37.9)	<i>p</i> <0.05
VAN	30/100 (30.0)	0/1 (0)	NS
TEC	30/101(29.7)		NS
TET	7/35 (20.0)	23/66 (34.8)	NS
GEN	2/28 (7.1)	28/73 (38.4)	<i>p</i> <0.01
TOB	3/26 (11.5)	27/75 (36.0)	<i>p</i> <0.05
ERY	4/35 (11.4)	26/66 (39.4)	<i>p</i> <0.01
CLR	4/35 (11.4)	26/66 (39.4)	<i>p</i> <0.01
AZM	4/35 (11.4)	26/66 (39.4)	<i>p</i> <0.01
CLI	12/62 (19.4)	18/39 (46.2)	<i>p</i> <0.01
Q-D	30/101 (100)		NS
LZD	30/101 (29.7)		NS
NOR	8/45 (17.8)	22/56 (39.3)	<i>p</i> <0.05
CIP	8/45 (17.8)	22/56 (39.3)	<i>p</i> <0.05
LVF	8/45 (17.8)	22/56 (39.3)	<i>p</i> <0.05
MXF	14/53 (26.4)	16/48 (33.3)	NS
SXT	29/100 (29.0)	1/1 (100)	NS
RIF	13/77 (16.9)	17/24 (70.8)	<i>P</i> <0.001
FOF	17/69 (24.6)	13/32 (40.6)	NS
NIT	30/99 (33.3)	0/2 (0)	NS
FSA	27/84 (32.1)	3/17 (17.6)	NS

NS: not significant

Statistical analysis was performed by Chi-square test or Fisher's exact tes

표 3. 다제 내성의 항생제 수와 IS 256 존재율, 그리고 균막 형성율의 상관관계

Frequency (%)	No. of multidrug resistance			
	<u>2&gt; : 2≤</u>	<u>8&gt; : 8≤</u>	<u>21&gt; : 21≤</u>	<u>23&gt; : 23≤</u>
Biofilm positivity	0 : 30.0	9.4 : 39.1**	17.6 : 42.0*	24.7 : 66.7**
IS256	0 : 68.0	34.4 : 82.6***	47.1 : 88.0***	62.9 : 100.0*

Statistical analysis was performed by Chi-square test or Fisher's exact test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$

표 4. 항생제 내성과 IS 256 존재의 상관관계

Antibiotics	Frequency of the presence of IS256 (%)		significance
	susceptible	resistant	
PEN	2/4 (50)	66/97 (68.0)	NS
AMP	2/4 (50.0)	66/97 (68.0)	NS
OXA	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
AMX	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
SAM	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
IPM	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
CEC	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
CXM	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
CRO	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
CTX	14/35 (40.0)	54/66 (81.8)	<i>p</i> <0.001
VAN	68/100 (68.8)	0/1 (0)	NS
TEC	68/101 (67.3)		NS
TET	10/35 (28.6)	58/66 (87.9)	<i>p</i> <0.001
GEN	1/28 (3.6)	67/73 (91.8)	<i>p</i> <0.001
TOB	3/26 (11.5)	65/75 (86.7)	<i>p</i> <0.001
ERY	16/35 (45.7)	52/66 (78.8)	<i>p</i> <0.01
CLR	16/35 (45.7)	52/66 (78.8)	<i>p</i> <0.01
AZM	16/35 (45.7)	52/66 (78.8)	<i>p</i> <0.01
CLI	36/62 (58.1)	32/39 (82.1)	<i>p</i> <0.05
Q-D	68/101 (67.3)		NS
LZD	68/101 (67.3)		NS
NOR	19/45 (42.2)	49/56 (87.5)	<i>p</i> <0.001
CIP	19/45 (42.2)	49/56 (87.5)	<i>p</i> <0.001
LVX	19/45 (42.2)	49/56 (87.5)	<i>p</i> <0.001
MXF	23/53 (43.4)	45/48 (93.8)	<i>p</i> <0.001
SXT	67/100 (67.0)	1/1 (100)	NS
RIF	44/77 (57.1)	24/24 (100.0)	<i>P</i> <0.001
FOF	43/69 (62.3)	25/32 (78.1)	NS
NIT	68/99 (68.7)	0/2 (0)	NS
FSA	55/84 (65.5)	13/17 (76.5)	NS

NS: not significant      Statistical analysis was performed by Chi-square test or Fisher's exact test

그림 1. 항생제에 다제 내성을 보이는 MRS A 균주와 MSSA 균주의 분포

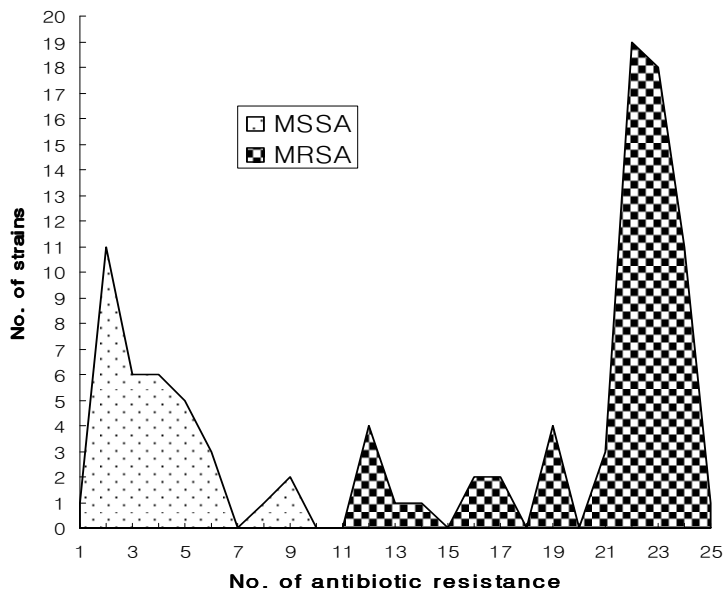




그림 2. 다제 내성의 항생제 수 증가에 따른 IS 256 존재율과 균막 형성율

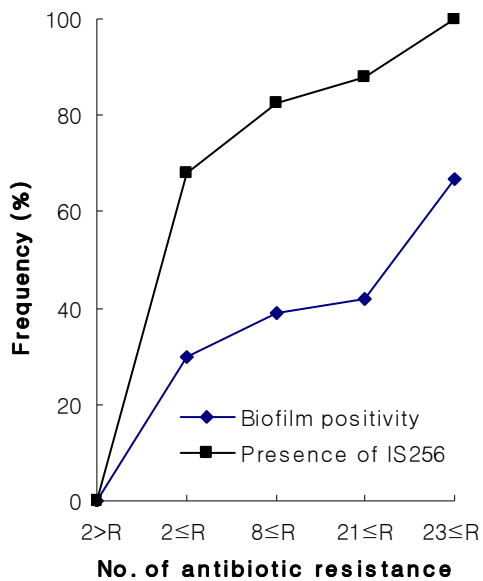
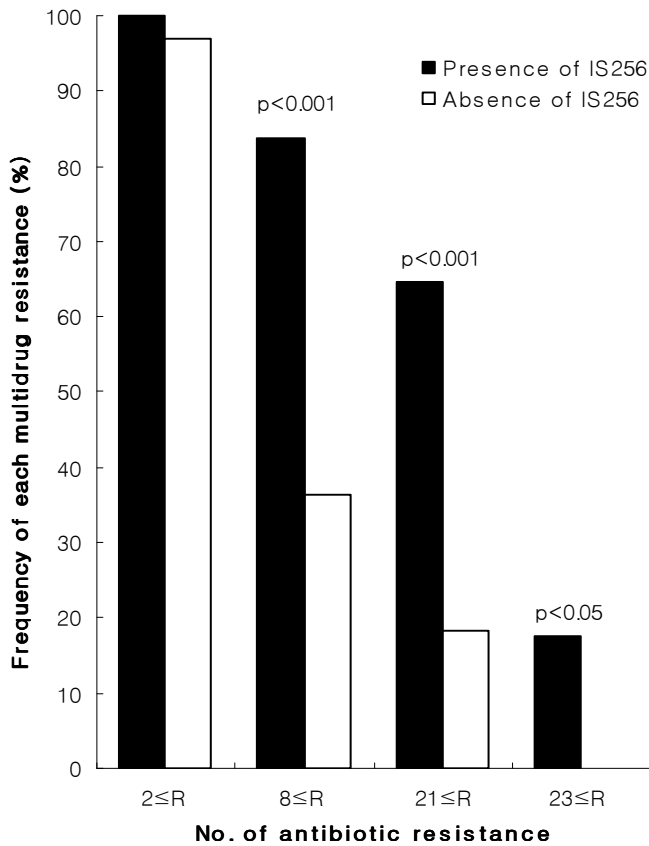


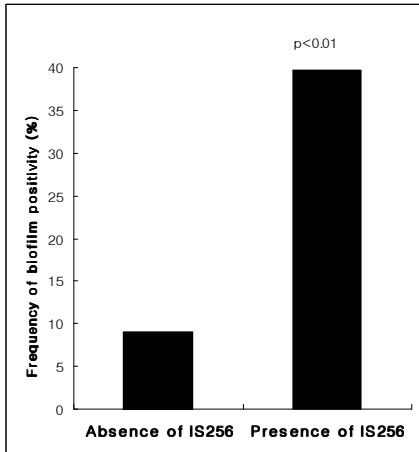
그림 3. IS256 존재 여부에 따른 다제 내성율



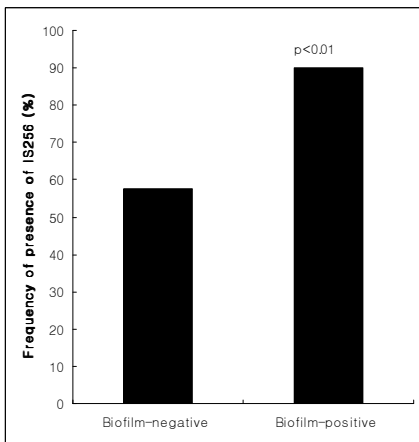
Statistical analysis was performed by Chi-square test or Fisher's exact test.

그림 4. IS256 존재 여부에 따른 균막 형성율(A)과  
균막 형성에 따른 IS256 존재율(B)

A.



B.



Statistical analysis was performed by Chi-square test or Fisher's exact test.

별 지)

## 저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	10341105	과 정	박 사
성 명	한글: 박 광 철      한문: 朴 光 哲      영문 : Park Gwang Choel				
주 소	광주광역시 북구 일곡동 동아 아파트 105-1901				
연 락 처	E-mail : drpkc@hanmail.net				
논문제목	한글: 임상 환경에서 분리한 메치실린 내성과 IS256을 지닌 황색포도알균에서 균막 형성의 증가 영문: Higher prevalence of biofilm formation in multidrug-resistant and IS256-harboring <i>Staphylococcus aureus</i> clinical isolates				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용 할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB 구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 지역 장치에의 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 사표시가 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 권리침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송 저작물의 전송·출력을 허락함.

2006년 12월 일

저작자: 박 광 철 (서명 또는 인)

## 조 선 대 학 교 총 장 귀 하