

2009년 8월

박사학위 논문

임상에서 분리된 황색포도알균 *fnbB*, IS256,
agr-1, SCC*mec* III 유전자의 존재와 균막
형성과의 유의성

조선대학교 대학원

의 학 과

류 종 현

임상에서 분리된 황색포도알균 *fnbB*, IS256,
agr-1, SCC*mec* III 유전자의 존재와 균막
형성과의 유의성

Prevalence of biofilm-associated genetic makers including *fnbB*, IS256, *agr-1* and SCC*mec* III genes and their relationship in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.

2009년 8 월 25 일

조선대학교 대학원

의 학 과

류 종 현

임상에서 분리된 황색포도알균 *fnbB*, IS256,
agr-1, SCC*mec* III 유전자의 존재와 균막
형성과의 유의성

지도교수 김 진 호

이 논문을 의학 박사학위 신청 논문으로 제출함.

2009년 4 월

조선대학교 대학원

의 학 과

류 종 현

류종현의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 (인)

위 원 경북대학교 교수 (인)

위 원 전남대학교 교수 (인)

위 원 조선대학교 교수 (인)

위 원 조선대학교 교수 (인)

2009년 6 월

조선대학교 대학원

목 차

표 목 차	1
도 목 차	2
ABSTRACT	3
1. 서론	4
2. 재료 및 방법	9
2.1. 세균 및 동정	9
2.2. Methicillin 내성 검사	9
2.3. 균막 검사	10
2.4. <i>agr</i> class, <i>SCCmec</i> type의 분류와 IS256와 MSCRAMMs 유전자의 확인	10
2.5. Statistical analysis	11
3. 결과	12
3.1. 분리장소와 균막형성과의 관계	12
3.2. 균막형성에 관여하는 MSCRAMMs 유전자의 확인	12
3.3. 균막에 관여하는 단일 요소와 균막형성과의 관계	12
3.3.1. Methicillin 내성 여부와 균막형성과의 관계	13
3.3.2. <i>SCCmec</i> type과 균막형성과 관계	13
3.3.3. <i>fnbB</i> 유전자의 존재와 균막형성과의 관계	14
3.3.4. <i>agr</i> class와 균막형성의 관계	14
3.3.5. IS256 유전자의 존재와 균막형성의 관계	14
3.4. 두 가지 균막형성 관련인자와 균막형성의 관계	15
3.4.1. 황색포도알 균막형성에 있어 <i>fnbB</i> 유전자와 메티실린 내성과의 관계	15
3.4.2. 황색포도알 균막형성에 있어 <i>fnbB</i> 유전자와 <i>agr</i> class 의 관계	16
3.4.3. 황색포도알 균막형성에 있어 <i>fnbB</i> 유전자와 IS256 유전자의 관계	16
3.4.4. 황색포도알 균막형성에 있어 <i>agr</i> class와 메티실린 내성과의 관계	17
3.4.5. 황색포도알 균막형성에 있어 <i>agr</i> class와 IS256 유전자의 관계	18
3.4.6. 균막형성에 있어 IS256 유전자와 메티실린 내성과의 관계	18
3.5. 황색포도알균의 균막형성과 관련이 있는 인자들의 민감도와 특이도	19
4. 고찰	20
국문 초록	28
참고문헌	29

표 목 차

Table 1. Primers used for screening <i>IS256</i> gene and classifying <i>agr</i> class and <i>SCCmec</i> type	35
Table 2. Primers used for screening MSCRAMMs	36
Table 3. The prevalence of biofilm-positive strains according to recovered sites	37
Table 4. Prevalence of biofilm-related genetic factors in this study	38
Table 5. The prevalence of biofilm-positivity in the presence of each biofilm-related genetic factor	39
Table 6. Prevalence of biofilm-positivity of <i>fnbB</i> -positive strains with other biofilm-related factors	40
Table 7. Prevalence of biofilm-positivity in the presence of MRSA strains with <i>agr</i> classes and in <i>agr</i> -I strains according to <i>SCCmec</i> types	41
Table 8. Prevalence of biofilm-positivity of strains according to <i>agr</i> classes in the presence or absence of <i>IS256</i> gene	42
Table 9. Prevalence of biofilm-positivity in the presence of <i>IS256</i> gene with either MRSA or <i>SCCmec</i> types	43

도 목 차

Fig 1. Proportion of biofilm positivity according to <i>SCCmec</i> subtypes in total 199 biofilm-positive MRSA strains ($p < 0.001$)	44
Fig 2. Proportion of biofilm positivity according to <i>agr</i> classes in total biofilm-positive strains ($p < 0.001$)	45

ABSTRACT

Prevalence of biofilm-associated genetic makers including *fnbB*, *IS256*, *agr-1* and *SCCmec* III genes and their relationship in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.

Jong hyun Reu

Advisor : Prof. Jin Ho Kim M.D., Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

We previously identified methicillin resistance, *SCCmec* IV and *IS256* gene as biofilm-associated determinants in 101 *Staphylococcus aureus* clinical isolates. We additionally observed the prevalence of *agr* class and *fnbB* gene to the previously identified factors in 465 *S. aureus* clinical strains of which 413 stains were recovered from Korea and 52 strains from the 10 South-East Asian countries, following biofilm assays. The prevalence of biofilm positivity in strains with each single genetic determinant was significantly higher than in those without the genetic factor ($p < 0.001$): 84.1% in 151 *fnbB*-positive strains, 67.4% in 215 strains carrying *agr-1* and 58.2% in 268 *IS256*-positive strains. In 146 *IS256*-positive strains carrying *agr-1*, the positive predictability for biofilm formation increased up to 82.9%. In comparison of biofilm positivity with *SCCmec* types, *SCCmec* III was more closely related to biofilm formation any other type, with 90.2% of biofilm positivity of 92 *SCCmec* III strains ($p < 0.001$). There was a significant relationship amongst *agr-1*, methicillin resistance and *SCCmec* III, and the presence of *IS256* gene ($p < 0.001$). However, no significant relationship between the presence of *fnbB* gene and either *agr* class or the presence of *IS256* gene ($p = 0.568$) was noted. The sensitivity of methicillin resistance for biofilm positivity was 80.8%, whereas the specificity of the presence of *fnbB* gene and *SCCmec* III for biofilm positivity was 89.0% and 95.9%, respectively. We suggest that the four genetic factors including the presence of *fnbB* and *IS256* genes, *SCCmec* III and *agr-1* are closely associated with biofilm formation of *S. aureus* clinical isolates.

1. 서론

인체의 세균감염은 세균이 각각 떨어져 별개로 증식하는 free-floating cells 즉 planktonic cell에 의해서 발생할 있으며, 또한 영양소의 결핍이나 인체 내에 침입 시에 세균들이 집단을 이루는, 즉 cell-community를 이루는 형태인 biofilm (이하, 균막)에 의해서 야기된다 [1]. 세균은 병원에서 사용하는 다양한 의료기구 뿐만 아니라 인체 내의 죽은 혹은 살아있는 조직의 표면에 균막을 형성할 수 있다. 이러한 세균의 균막 형성은 실제로 임상에서 발생하는 만성, 혹은 지속감염과 깊은 관련이 있으며, 특히 인공의료기구를 사용하는 환자의 병원감염의 원인으로 흔하며 환자의 경제적 손실 또한 매우 크다 [2]. 예를 들면 비뇨기계에 일시적으로 장착 하는 배뇨관 혹은 체 내에 이식하는 여러 의료 기구 즉 인공 뼈, 인공 관절, 인공 심장판막과 심박동기 등의 표면에 형성되는 세균의 균막은 오염원으로 작용하여 인공이식의료기구로 인한 반복 감염을 야기하고 결국 이들 의료기구를 새로운 것으로 교체해야 하는 결과를 낳는다 [3]. 균막형성으로 인한 지속, 만성 감염과 반복 감염의 기전은 먼저 planktonic cell에 비해 일반적으로 사용하는 항생제에 대해서 내성율이 상대적으로 매우 높은 점을 들 수 있으며 [4], 개개의 세균으로 존재하는 경우에 비해 인체의 면역체계에 의해서 균막형성 세균을 제거하기 무척 어려운 점을 들 수 있다 [1].

Staphylococcus aureus (이하, 황색포도알균)은 인체 비강 전반부에 서식하며, 장내에도 존재하는 병원균이다 [5]. 황색포도알균은 병원감염의 가장 흔한 원인균이다 [6, 7], 항생제의 내성 또한 빈번하여 메티실린 내성 황색포도알균 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 이하, MRSA) 분리율은 지역, 나라에 따라 차이가 있지만 최고 80%에 이른다 [8]. 또한 MRSA 치료제로 사용하는 glycopeptide 계열 항생제인 vancomycin에 중등도의 내성 균주 (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA)가 1997년 일본에서 발견된 이래, vancomycin에 고농도의 내성을 보이는 소위 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)가 2002년 미국에서 발견되었다 [9]. 황색포도알균은 빈번한 항생제 내성 빈도를 보일 뿐만 아니라 또한 균막을 형성하여 사용하는 다양한 인공의료기구를 통한 감염을 일으키는 대표

적인 원인균이다 [10]. 즉 예를 들면 인공관절에 의한 감염의 경우 황색포도알균과 피부포도알균에 의한 감염은 약 65%를 차지하기도 한다 [11]. 더욱 심각한 점은 이미 언급했듯이 황색포도알균은 균막을 잘 형성할 뿐만 아니라 항생제에 대한 내성 획득 빈도가 매우 높다 [8, 9]. 더군다나 Kwon 등 [12]은 최근 보고를 통해서 황색포도알균의 경우 항생제 내성이 다양한 균주일수록 균막을 더욱 잘 형성하는 것이 확인하였다. 그러므로 황색포도알균의 균막형성에 의한 감염 시에는 항생제를 병합치료를 권장하고 있으며, 새로운 의료기구로 교체를 권장하고 있다 [2].

황색포도알균의 균막 형성에는 *ica operon*에 그 유전정보가 존재하며, 발현, 생산되는 PNAG (poly-N-acetylglucosamine) 으로 부르는 다당체 (exopolysaccharide)가 가장 잘 알려져 있다. PNAG는 황색포도알균 뿐만 아니라 응고효소 비 발현 균인 (coagulase-negative *Staphylococcus* spp.) *Staphylococcus epidermidis* (이하, 피부포도알균)에서도 균막형성에 관여하는 대표적인 요인으로 알려져 있다 [13]. 특히 피부포도알균의 경우, *ica operon*이 존재하여 발현하는 균주의 경우, 존재하지 않는 균주에 비해 균막을 더욱 형성하는 것으로 알려져 있다 [14]. 그러나 피부포도알균과는 달리, 대부분의 황색포도알균은 *ica operon*이 존재하며 *ica operon* 발현 여부가 실제로 균막을 형성과 상관없음을 보고하였다 [15], 또한 여러 연구자들은 계속해서 황색포도알균의 균막 형성에 *ica operon*의 발현을 통한 다당체에 의한 기전 외에 또 다른 기전이 존재함을 시사하고 있다 [16-19].

위에서 언급한 *ica operon* 외에 황색포도알균의 균막형성에 관여하는 유전자는 *agr*, *arIRS*, *atl*, *cidABC*, *citB*, *mgrA*, *rbf*, 그리고 *sarA*, 등이 알려져 있다 [20-26]. 이러한 균막 형성에 관련된 유전인자 중에서도 균막 형성에 있어 황색포도알균의 독력조절인자인 *agr* (accessory gene regulator) 유전자의 역할은 서로 매우 상반된 연구결과가 최근 까지도 보고되고 있다. 최근 발표된 상반된 연구보고들을 살펴보면, 2007년 O'Neil 등 [17]은 MRSA균주와 메티실린 감수성 황색포도알균 (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 이하, MSSA)에 따라 균막형성의 기전이 서로 다르다고 보고하였다. 즉 MRSA의 경우, 균막 형성에는 다당체가 아닌 단백질이 관여하고 *agr* 유전자는 일부 MRSA 균주에서 균막형성을 억제하지만, MSSA의 경우는 다당체가 주로 관여하며 다당체의 생산의 조절은 *agr* 유전자보다는 *sarA* 유전자에

좌우된다고 보고하였다. 그러나 이러한 결과와는 달리 Coelho 등 [27]의 연구자들은 다양한 황색포도알균의 여러 균주에서 *agr* 유전자 변이주에서 *agr* 유전자의 기능은 MRSA 혹은 MSSA 균주에 관계없이 때로는 균막을 형성을 조장하고 혹은 균막형성을 억제하는 즉 균주 따라서 서로 상반된 이중적인 기능을 한다고 보고하고 있다. 2008년 발표된 또 다른 연구결과에서는 이러한 보고와는 달리 *agr* class에 관계없이 Agr은 황색포도알균의 균막형성을 저해, 분산시키는 작용을 한다고 보고하고 있다 [26].

황색포도알균의 또 다른 균막형성의 한 요소로서 황색포도알균의 세포 표면에는 숙주의 기질 단백질을 인식하는 균부착 표면단백질 (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, 이하 MSCRAMMs)을 들 수 있다 [28]. 의료기구를 환자의 체내에 장착하는 경우, 의료기구는 인체 내의 세포외 기질 단백질 (extracellular matrix protein)에 의해 신속히 덮이게 된다. 황색포도알균은 이러한 의료기구를 덮은 세포외 기질 단백질을 MSCRAMMs을 이용하여 인식하여 결합하게 되고, 이는 균막 형성 초기에 중요한 단계이다 [16, 28]. 황색포도알균에서 다양한 MSCRAMMs은 황색포도알균의 조직표면에 부착하여 균막을 형성하게 할 뿐만 아니라, 세포내 침입 (invasion)과 독력에도 관여한다 [28].

상기의 이유로 균막을 형성하는 황색포도알균을 치료하기 위해서는 다음과 같은 실질적인 방법이 강구되어야 한다. 첫째 분리된 황색포도알균 균주가 균막을 잘 형성하는 능력이 있는지를 항생제 치료 전에 신속히 확인할 수 있는 방법이 절실히 필요하다. 두 번째 분리된 균주가 균막을 잘 형성하는 균주로 판단이 되면, 균막형성 황색포도알균 균주에 적합한 항생제를 선택하여 치료하여야 한다. 즉 기존의 planktonic cell에 대한 항생제 감수성법 검사가 아닌 균막형성 하에서 항생제 감수성검사를 개발, 시행하여 BPSA에 잘 듣는 항생제를 택하여야 한다.

먼저, 균막을 잘 형성할 수 있는 가능성이 있는 균주를 확인하는 방법으로 특정 암의 발현을 상관관계가 있는 특정 유전자를 통해 진단, 확인하듯이, 균막을 형성하는 황색포도알균의 균주에서 주로 존재하는 특정 유전자를 확인하는 것이다. 지금까지 제한적이거나 보고된 황색포도알균의 특정 유전자 존재와 균막 형성과의 관련성에 관한 연구를 살펴보면 다음과 같다. 최근 Kwon 등 [12]은 그들의 연구보고에서 항생제에 다제 내성을 보이는 경우

그리고 IS256 과 같은 유전자가 존재하는 황색포도알균의 임상균주가 다제내성이 적거나 IS256이 존재하지 않는 균주에 비해서 강한 균막을 형성하는 것을 보고하였다. 그들은 또한 MRSA 균주의 경우 MSSA 균주에 비해 균막을 더 잘 형성하는 것으로 보고하였으며, MRSA 중에서도 SCCmec IV 유전인자를 지닌 균주의 경우에 강한 균막을 형성함을 보고하였다. 2009년 Stefani 등 [29]은 PVL 양성이며, *agr-IV* 에 속하는 집단생활 분리 CA-MRSA (community-acquired MRSA) 균주의 경우 대부분이 leukocidin 과 다양한 부착인자 (adhesion factor)을 갖는 독력 균주임을 보고하였으며, 더불어 이러한 균주들이 특히 균막을 강하게 형성하는 것으로 보고하였다. 황색포도알균의 독력조절인자인 *agr* 유전자의 class와 균막형성과의 관계를 연구한 보고에서는 *agr-III*인 균주가 강한 균막을 형성하는 것을 보고하였다 [30, 31]. 이러한 기존의 연구보고를 종합해보건대, 황색포도알균의 균막형성의 정도는 *agr* class에 따라, IS256 존재 유무에 따라, 메티실린 항생제 내성 유무와 SCCmec type에 따라 달라진다고 보고되었다. 그러나 아직까지 황색포도알균의 경우에는 균막형성과 밀접한 관련성이 있는 유전자의 존재에 대한 큰 범주의 역학적 조사는 아직 없었다.

본 저자는 특정 유전자의 존재와 황색포도알균의 균막형성과 관련성을 조사하기 위한 예비실험으로 병원환경에서 분리된 황색포도알균 균주를 대상으로 수 차례의 균막형성 실험을 시행하였다. 이들 임상분리주 중에서 균막을 강하게 형성하는 황색포도알균과 균막을 매우 약하게 형성하는 균주 각각 9주, 10주를 택하여 이들 균주의 메티실린 내성 여부, *agr* class를 분류하였고, IS256의 존재, 그리고 13 종의 MSCRAMMs의 존재 유무를 PCR를 통해서 확인하였다. 예비실험 결과, 균막을 항상 형성하는 9 균주 중에는 모두 IS256 유전자가 존재하였고, MRSA가 8주, *agr* class I에 속하는 균주가 8주, 그리고 13종의 MSCRAMMs 유전자 중에서 *fnbB* 유전자가 존재하는 균주가 7주였다. 매번 균막을 형성하지 않는 10주의 황색포도알균에서는 IS256 유전자가 5주에서 존재하였고, 6주가 MSSA 균주였으며, *agr-I*균주는 2주이었고, *fnbB* 유전자는 한 주에서도 존재하지 않았으며, *fnbA* 유전자는 모든 균주에서 존재하였다. 그 외 다른 MSCRAMMs 유전자는 균막형성균주와 균막을 형성하지 않는 균주에서 존재하는 빈도가 두 군간에 큰 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서는 이러한 예비실험 결과를 바탕으로 한국내의 서로 다른 지역의 병원에서 각각 분리한 그리고 다른 나라에서 분리한 임상분리균주 465 주를 대상으로 균막형성 실험을 시행하였다. 또한 PCR를 통하여 *agr* class의 분류, IS256, *fnbB* 유전자의 존재 여부, 그리고 메티실린 내성여부를 확인하였고, MRSA균주의 경우 SCC*mec* type을 분류 확인하였다. 이러한 균막형성에 연관된 유전적 인자와 균막형성과의 상관관계를 통계적으로 분석하여 통계적으로 유의한 흥미로운 결과를 얻었기에 여기에 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세균 및 동정

본 실험에서는 동남아시아 그리고 한국전역에서 분리된 황색포도알균 임상분리주 총 465주를 사용하였다. 465주 중에는 동남아시아에서 분리된 52주 그리고 나머지 413주는 한국에서 분리된 균주이었다. 동남아시아에서 분리된 균주는 중국에서 6주, 인도에서 5주, 인도네시아에서 6주, 필리핀 5주, 사우디아라비아 5주, 싱가포르 5주, 스리랑카 5주, 태국 5주, 대만, 5주, 베트남 5주 등이며 ARFID (Asian-Pacific Research Foundation for Infectious Diseases) 담당자인 성균관의대 고관수 교수에게서 분양 받아 실험에 사용하였다. 한국에서 분리된 균주의 지역별로 살펴보면 전남 지역 325주, 서울, 경북, 강원에서 분리된 균주 88주 등을 사용하였다. 사용 균주는 1994년 분리한 균주부터 2008년 최근에 분리된 균주가 모두 포함되었다. 실험에 사용한 총 465주의 균주는 병원환경 및 서로 다른 환자의 병변에서 분리된 것으로 분리 장소를 보면, 농에서 108주, 혈액에서 77주, 배뇨관을 장착한 환자의 뇨에서 57주, 환자 가래에서 47주, 의료인의 손바닥, 혹은 비강 전방부에서 34주, 복수, 흉막액, 복막 투석액, 척수액 등과 같은 체액에서 31주, 병원 외래환자 24주, 피부과 병변에서 분리된 균주 15주, 이비인후과 병변에서 분리된 균주 14주, 입원실 공기 중에서 5주, 질염환자의 질 내에서 1주, 그리고 분리 장소가 정확히 알려지지 않은 52주이다.

실험에 사용한 황색포도알균은 API-Staph system을 사용하여 동정하였으며, PCR을 이용하여 황색포도알균에 특이한 *nuc* 유전자를 검색하여 다시 확인하였다 [32].

2.2. Methicillin 내성 검사

Methicillin 내성 여부는 AST-P536 감수성 카드를 사용하여 VITEK II (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)을 사용하여 Oxacillin의 내성 여부를 확인하였다.

2.3. 균막 검사

균막형성 검사는 폴리스티렌에 균막형성 여부를 확인한 Heilman 등 [33]의 방법을 사용하여 확인하였다. 간략히 서술하면, 실험균주를 하룻밤 배양하여 660nm에서 흡광도를 4.0으로 맞춘 다음, 0.25% glucose를 추가한 Tryptic soy broth (이하, TSB, Difco, Detroit, Mich, USA)로 200배 희석하였다. 세균 희석액을 200 μ l씩 밀이 평평한 96 well 조직배양플레이트 (Corning, Inc., Costar, NY, USA). 의 각 well에 넣고, 48시간 37도 배양기에 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well을 200 μ l의 PBS를 넣어 두 번 부드럽게 씻어 낸 다음, 공기 중에 말리고 난 후, 0.1% safranin으로 1분간 염색하였다. 염색된 플레이트는 Micro-ELISA reader (SUNRISETM, Tecan Co. Gr?dig, Austria)를 사용하여 흡광도 490nm 에서 측정하였다. 같은 실험을 3번 이상 반복하여 얻은 평균치인 0.150이상을 보이는 경우, 균막형성 황색포도알균으로 간주하였다.

2.4. *agr* class, *SCCmec* type 분류와 IS256 와 MSCRAMMs 유전자의 확인

PCR에 사용한 실험균주의 DNA 는 Reicshl 등 [34]에 의한 방법을 사용하여 분리하였다. 해당 방법을 기술하면 TSB 한천배지에 자란 집락을 백금으로 취하여 이를 1% Triton X-100, 0.5% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 와 1 mM EDTA 으로 이뤄진 용해액 200 μ l에 잘 현탁시켰다. 10min 간 끓인 다음, 현탁액을 2분간 원심분리 시켜 미처 녹지 않은 세균의 찌거기를 침전시켰다. 상청액 2 μ l을 취하여 직접 PCR에 사용하였다. 남은 sample은 영하 20도 냉동고에 보관하며 사용하였다. 균막과 형성과 관련이 있는 MSCRAMMs 존재는 균막형성 실험에서 항상 균막을 형성한 균주 9주와 매우 약한 균막을 형성한 10주를 대상으로 PCR을 통하여 확인하였다. 기존의 보고된 MSCRAMMs 유전자 중에서 *clfA*, *B* gene (clumping factor A, B), *cna* gene (collagen-binding protein), *eno* gene (laminin binding protein), *fib* gene (fibrinogen binding protein), *fnBPA*, *B* gene (fibronectin-binding protein A, B), *map/eap* gene (major histocompatibility complex class II analogue protein), *sdrC*, D gene (putative adhesions C, D) *spa* gene (protein A), *V8* gene (serine protease) 등을 기존의 보고에서 사용한 동일한 sequence의 primer를 사용

하여 [35, 36] 확인하였고, *emp* gene (extracellular matrix binding protein, Accession No. AJ271347)은 본 실험에서 알맞은 primer sequence를 선택하여 사용하였다. 또한 *agr* class는 Ando 등 [37]의 방법으로 Staphylococcal cassette chromosome *mec* (이하 SCC*mec*) type은 Oliveira 등 [38]의 방법으로 먼저 분리하였으며, Oliveira 등의 방법으로 분류되지 않는 subtype은 Shore 등 [39]의 방법으로 분류하였다. IS256 유전자의 존재는 Gu등 [40]이 사용한 동일한 sequence의 primer를 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer sequence는 table 1, 2에 정리하였다. PCR 반응물은 Tris-HCl (pH 9.0), 20mM MgCl₂, (NH₂)₄SO₄, 10mM dNTPs mixture 와 0.5U of Taq polymerase (Prime Taq DNA polymerase; GENET BIO, Nonsan, South Korea) 사용하였다.

2.5. Statistical analysis

통계분석은 SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, Ill. USA)을 사용하여 분석하였다. 각 균막형성과 관련이 있는 유전자와 *agr* class, SCC*mec* type과 균막형성과의 통계적 의미는 Chi-square test 혹은 Fisher's exact test로 결정하였다. $p < 0.05$ 경우, 통계적으로 의미가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과

3.1. 분리장소와 균막형성과의 관계

실험균주가 분리된 장소와 균막형성과의 관계를 살펴보면, 의료인에서 분리된 균주 중 61.8% (21/34)가 그리고 배뇨관을 장착한 환자의 뇨에서 분리된 균주의 61.4% (35/57)에서 균막을 형성하여 상대적으로 다른 분리장소의 균주에 비해서 높은 균막양성율을 보였다 ($p < 0.001$). 다음 순서로 객담 59.6% (28/47), 혈액분리균주 57.1% (44/77), 외래환자 분리주 50.0% (12/24), 상처분리주 46.3% (50/108), 체액분리주 41.9% (13/31)의 균막양성율을 보였다 (Table 3). 그러나 그 외 피부과분리주와 이비인후과분리주 등은 각각 20.0% (3/15), 14.3% (2/14)로 상대적으로 낮은 균막양성율을 보였다 ($p < 0.001$).

3.2. 균막형성에 관여하는 MSCRAMMs 유전자의 확인

균막을 항상 강하게 형성하는 9주의 실험균주, 그리고 10주의 균막을 형성하지 않는 균주를 택하여 MRSA 여부, IS256 유전자 존재 여부, *agr* class, 그리고 13종류의 MSCRAMMs 유전자의 존재를 확인하였다. 균막을 형성하는 9 균주의 경우, 8주가 MRSA 균주이었고, 그 중에 6주가 SCC*mec* IV에 속하는 균주이었고, *agr*-I 균주가 7주, IS256 유전자는 모두 존재하였다. 또한 균막형성 주에서는 7주에서 *fnbB* 유전자를 확인할 수 있었다. 그러나 균막을 형성하지 않는 10주의 실험균주의 경우 MRSA 균주가 4주에 불과하였고, 그 중에 3주가 SCC*mec* II, 나머지 한 주가 SCC*mec* IV에 속했다. 특히 *agr* class를 비교해 볼 때, 10주 중 단 2주만 *agr*-I이었으며, 나머지 8주는 다른 *agr* class를 보였으며, *fnbB* 유전자는 모두 존재하지 않았다. *fnbA* 유전자의 경우 균막형성 균주와 균막을 형성하지 않는 균주 모두에 존재하였고, 그 외 본 실험에서 검색한 다른 MSCRAMMs 유전자 존재율 또한 두 군간에 차이가 없었다 (data not shown).

3.3. 균막에 관여하는 단일 요소와 균막형성과의 관계

3.3.1. Methicillin 내성 여부와 균막형성과의 관계

본 실험에 사용한 총 465주의 균주 중에서 메티실린에 내성이 있는 MRSA 균주는 78.1% (363/465), MSSA 균주는 21.9% (102/465)이었다 (Table 4). 균막형성 실험에서 MRSA 균주는 54.8% (199/363) 그리고 MSSA 균주의 경우 46.6% (47/102)가 균막을 형성하여, MRSA균주의 균막 양성율이 상대적으로 높았으나 통계적 의미는 없었다 (Table 5, $p=0.120$).

3.3.2. SCCmec type과 균막형성과 관계

항생제 감수성 검사에서 MRSA 균주로 확인된 363주의 SCCmec type을 PCR을 통해 분류하였다. MRSA 균주의 SCCmec type 비율은 type II, IV, III 순으로 각각 41.6% (151/363), 31.1% (113/363), 25.3% (92/363)으로 확인되었다 (Table 4). MRSA 균주의 SCCmec subtype의 분포는 살펴보면, 먼저 SCCmec II의 경우, subtype IIA/B 균주가 18.5% (67/363), IID 균주가 23.1% (84/363)이었다. SCCmec IV 균주의 subtype 분포는 subtype IV 균주가 12.1% (44/363), subtype IVA 균주가 18.5% (67/363), subtype IVE/F균주가 0.5% (2/363)이었다. SCCmec III에 속하는 균주의 subtype의 분포는 subtype III 균주 19.6% (71/363), IIIA/B균주가 5.8% (21/363)를 차지하였다. 본 실험균주에서 SCCmec I 균주는 확인되지 않았다. 363주의 MRSA 균주 중에 5주에서 *mecA* 유전자를 확인할 수 없었고, 2주는 실험에 사용한 SCCmec type을 나누는 방법으로 구분이 되지 않았다 (Table 4).

SCCmec type을 II, III, IV 3가지 형태와 균막형성과의 관계를 분석한 결과, SCCmec type 중 type III에 속하는 균주가 90.2% (83/92)의 균막양성율을 보여서 type II 균주의 균막양성율 37.1% (56/151) 그리고 type IV 균주의 49.6% (56/113) 균막양성율에 비해 1.8배 이상 높은 균막양성율을 보였다 (Table 5, $p<0.001$). 균막형성 양성인 총 199주의 MRSA 균주 중에서 SCCmec type의 분포를 보면, 41.7% (83/199)가 SCCmec III에 속하는 균주이었으며, 각각 28.1% (56/199)을 보인 type II, IV에 비해서 그 비율이 높았다 (Figure 1, $p<0.001$). 이러한 결과는 SCCmec III에 속하는 MRSA 균주가 다른 type II, 혹은 type IV에 속하는 균주에 비해 압도적으로 균막을 잘 형성함을 알 수 있다.

Subtype 별로 균막형성의 정도를 살펴보면 SCCmec subtype III가

93.0% (66/71)로 제일 높은 균막양성율을 보였으며, subtype IIIA/B 경우 81.0% (17/21), 그리고 subtype IV 균주의 경우 65.9% (29/44)으로 상대적으로 높은 균막양성율을 보였다 (Table 5). 또한 type II 균주 중에서도 subtype에 따라 균막형성의 큰 차이를 보였는데, 즉 subtype IID 균주는 52.4% (44/84)가 균막을 형성하였으나, IIA/B 균주에 속하는 균은 4.9% (12/67)에서 균막을 형성하여 type II 균주 중에서도 IID 균주가 균막형성을 더 잘했다 (Table 5, $p < 0.001$)

3.3.3. *fnbB* 유전자의 존재와 균막형성과의 관계

465주의 실험균주에서 *fnbB* 유전자 존재율은 32.5% (151/465)에 불과하지만 (Table 4), 총 151주의 *fnbB* 유전자가 존재하는 실험균주의 균막양성율을 보면, 84.1% (127/151)가 균막을 형성하여 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 균주의 37.9% (119/314) 균막양성율에 비해 2배 이상 높았다 (Table 5, $p < 0.001$).

3.3.4. *agr* class와 균막형성의 관계

실험균주 465주를 *agr* class에 따라 분류하면, *agr*-I에 속하는 균주가 46.2% (215/465), *agr*-II균주가 34.8% (162/465)이었다. 즉 본 실험균주의 80%이상이 *agr*-I과 -II에 속하는 균주이었다. *agr*-III과 -IV 균주의 비율은 각각 11.0% (51/465)와 1.3% (6/465)로 상대적으로 매우 낮았다 (Table 4, $p < 0.001$). 각 *agr* class에 따른 균막형성 여부를 확인한 경우, 총 실험균주 중 *agr*-I 균주가 다른 *agr* class에 비해서 균막양성율이 67.4% (145/215)로서 제일 높았다. 다음으로 *agr*-III 균주가 47.1% (24/51), *agr*-II 균주가 38.9% (63/162), *agr*-IV 균주가 16.7% (1/6) 순서로 균막양성율을 보였다 (Table 5, $p < 0.001$). 본 실험균주 중 균막형성 양성인 총 246균주 중에서 분포를 살펴보면, *agr*-I에 속하는 균주가 58.9% (145/246)이었으며, *agr*-II균주가 25.6% (63/246), *agr*-III 균주가 9.8% (24/246), *agr*-IV 균주는 0.1% (1/246) 순이었다 (Figure 2, $p < 0.001$).

3.3.5. IS256 유전자의 존재와 균막형성의 관계

465주의 실험균주에서 IS256 유전자의 존재를 PCR로 확인하였다. 실험

균주의 57.6% (268/465)가 IS256 유전자가 존재하였다 (Table 4, $p < 0.001$). 268주의 IS256 유전자가 존재하는 실험균주 중에서 58.2% (156/268)가 균막을 형성하였으며, IS256 유전자가 존재하지 않는 균주의 경우에서 45.7% (90/197)의 균막양성율을 보여서 IS256 유전자가 존재하는 균주가 균막을 더 잘 형성하였다 (Table 5, $p < 0.001$).

3.4. 두 가지 균막형성 관련인자와 균막형성의 관계

3.4.1. 황색포도알 균막형성에 있어 *fnbB* 유전자와 메티실린 내성과의 관계

먼저 *fnbB* 유전자의 존재 유무와 MRSA균주의 분포와 균막형성의 상관 관계를 확인하였다. *fnbB* 유전자가 존재하는 151균주 중에서 MRSA 균주인 경우는 84.8% (128/151)이었고, MSSA 균주인 경우 15.2% (23/151)에 비해서 높았다. *fnbB* 유전자가 없는 균주의 경우에서 74.8% (236/314)가 MRSA 균주였으며, 25.2% (79/314)가 MSSA 균주였다 (Table 4, $p < 0.001$). *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주의 SCCmec type의 분포를 확인한 결과, SCCmec III에 속하는 균주가 68.8% (88/128)로 제일 높았으며, SCCmec IV에 속하는 균주가 28.1% (36/128), SCCmec II에 속하는 균주는 단 2.3% (3/128)에 불과하였다 (Table 4). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주 중에서 SCCmec III분포가 상대적으로 제일 높은 것을 알 수 있었다 ($p < 0.001$). 반대로 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 MRSA 균주의 경우, SCCmec II형의 MRSA 균주가 63.0% (148/235)로 제일 흔히 존재했으며, SCCmec III 속하는 균주가 1.7% (4/235)로 가장 낮았다. SCCmec IV 균주의 경우, *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주의 경우, subtype IV가 25.8% (33/128)로서 subtype IVA 균주의 2.3% (3/128)에 비해 훨씬 높았으나, 반대로 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 MRSA 균주에서는 subtype IVA가 25.8% (33/128)를 차지하여 subtype IV 균주의 분포율인 4.7% (11/236)에 비해 높았다 (Table 4, $p < 0.001$). 이러한 결과를 통해서 MSSA 균주보다 MRSA 균주에서 *fnbB* 유전자가 더 많이 존재하며, 이러한 *fnbB* 유전자의 존재유무는 MRSA 균주의 SCCmec type과 subtype의 분포와 관계가 있음을 알 수 있었다.

균막양성율을 비교해보면 *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주의 균막양성율은 88.3% (113/128)이었으며, 반대로 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는

MRSA 균주의 균막양성율은 36.5% (86/235)이었다. *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA균주 중에서 SCCmec III에 속하는 균주의 균막양성율이 63.3% (81/128)으로 다른 type에 비해 높았다 (Table 6, $p < 0.001$). Subtype 별로 보면 *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA균주 중에서 subtype III에 속하는 균주가 56.7% (64/128)의 균막양성율을 보여서, IIIA/B 균주의 15.0% (17/128), subtype IV 균주의 23.0% (26/128)에 비해서 월등히 높은 균막양성율을 보였다. *fnbB* 유전자가 없는 MRSA 균주 중에서는 특징적으로 subtype IID에 속하는 균주가 18.7% (44/235)의 균막양성율을 다른 subtype에 비해 높았으나, *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주에서 가장 높은 균막양성율을 보인 subtype III 균주의 경우 0.8% (2/235)에 불과하였다 (Table 6, $p < 0.001$). 이러한 결과는 MRSA 균주의 경우, *fnbB* 유전자의 유무에 따라 균막을 잘 형성하는 SCCmec type이 서로 달라지는 것을 알 수 있었다.

3.4.2. 황색포도알 균막형성에 있어 *fnbB* 유전자와 *agr* class 의 관계

fnbB 유전자가 존재하는 균주의 경우, *agr*-I에 속하는 경우가 89.4% (135/151), *agr*-II, -III속하는 경우는 각각 4.6% (7/151)와 2.6% (4/151)이었으며, *agr*-IV에 속하는 균주는 없었다. 그리고 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 균주는 *agr*-II에 속하는 균주의 비율이 49.4% (155/314)로 다른 *agr* class 보다 더 높았다 (Table 4, $p < 0.001$). 균막형성 실험에서 *fnbB* 유전자가 존재하는 *agr*-I 균주의 경우 85.2% (115/135)의 균막양성율을 보였으나 *fnbB* 유전자가 존재하는 다른 *agr* class 균주의 균막양성율과 통계학적인 유의성이 없었다 (Table 6, $p = 0.568$). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자의 존재하는 균주의 경우, *agr*-I에 속하는 경우가 많지만, 실제로 각 *agr* class에 속하는 균주가 균막을 형성하는데 있어 *fnbB* 유전자의 존재 유무와 서로 관계가 없음을 알 수 있었다.

3.4.3. 황색포도알 균막형성에 있어 *fnbB* 유전자와 IS256 유전자의 관계

실험 균주의 IS256 유전자의 존재 여부를 확인한 결과, *fnbB* 유전자가 존재하는 균주의 92.1% (139/151)에서 그리고 *fnbB* 유전자가 없는 균주의 41.1% (129/314)에서 IS256 유전자가 존재하여 *fnbB* 유전자 존재 유무에 따라 큰 차이를 보였다 (Table 4, $p < 0.001$). 균막양성율을 확인해 보면,

fnbB 유전자와 IS256 유전자가 동시에 존재하는 균주의 경우, 84.9% (118/139)의 균막양성율을 보여서, *fnbB* 유전자가 존재하며 IS256 유전자가 없는 균주의 75.0% (9/12)에 비해서 높았으나, 두 그룹간의 균막양성율에 있어서 통계적 유의성은 없었다 (Table 6, $p=0.568$). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자가 존재하는 균주의 경우, IS256 유전자가 동시에 존재할 가능성은 매우 높지만 실제 두 유전자가 존재하는 균주의 경우가 *fnbB* 유전자만 존재하는 균주에 비해 균막을 더 잘 형성하지는 않는 것을 알 수 있었다.

3.4.4. 황색포도알 균막형성에 있어 *agr* class와 메티실린 내성과의 관계

총 363주 MRSA 균주의 *agr* class를 분류한 결과, *agr*-I가 48.5% (176/363) 그리고 *agr*-II에 속하는 균주가 39.4% (143/363)을 차지하여 *agr*-I과 -II 균주가 MRSA 균주의 85% 이상 대부분을 차지하였다. *agr*-III에 속하는 균주의 분포는 MSSA 균주의 경우, 28.4% (29/102)이었고, MRSA균주는 6.1% (22/363)로 차이를 보였다 (Table 7, $p<0.001$).

균막양성율을 비교해보면 MRSA 균주이며 *agr*-I에 속하는 균주의 경우, 71.0% (125/196)가 균막양성율을 보여, *agr*-II 균주의 36.7% (52/143), 그리고 *agr*-III 균주 54.5% (12/22)의 균막양성율에 비해서 상대적으로 높은 균막양성율을 보였다 (Table 7, $p<0.001$). 이러한 결과는 MRSA 균주이며 *agr*-I에 속하는 균주가 *agr*-II와 -III 균주에 비해서 균막을 더 잘 형성하는 것을 알 수 있었다. MRSA 이며 *agr*-I에 속하는 균주의 SCCmec type 별 균막양성을 비교하면, SCCmec III 균주가 45.5% (80/176)의 균막양성율을 보여서 SCCmec IV 균주 24.4% (43/176)에 비해 상대적으로 높은 균막양성율을 보였다 (Table 7, $p<0.001$). 이러한 결과는 MRSA 균주 중에서 *agr*-I에 속하는 균주가 균막형성을 잘하며 그 중에서도 SCCmec III 균주인 경우 다른 SCCmec type 균주에 비해 균막을 잘 형성하는 것을 알 수 있었다. 실험 균주 중에서 MRSA 이며 *agr*-I 균주가 아닌 다른 *agr* class에 속하는 균주의 경우, 균막형성에 있어 SCCmec type 간의 균막형성간의 통계적 의미가 없었다 (data not shown). 또한 MSSA 균주의 경우 *agr* class에 따른 균막양성율에는 통계적 유의성을 찾을 수 없었다 (Table 7, $p=0.385$)

3.4.5. 황색포도알 균막형성에 있어 *agr* class와 IS256 유전자의 관계

IS256 유전자가 존재하는 균주의 *agr* class의 분포를 확인할 결과, *agr*-I 균주가 54.5% (146/268)로 제일 많았다. 다음으로 *agr*-II 균주 29.5% (79/268), *agr*-III 균주 9.0% (24/268), *agr*-IV 균주 1.9% (5/268) 순으로 확인되었다 (Table 4, $p < 0.001$). IS256 유전자가 존재하지 않는 균주의 *agr* class의 분포를 보면 *agr*-II 균주가 42.1% (93/197)로 제일 많았다. 즉 IS256 유전자의 존재 유무에 따라 *agr* class의 분포가 달랐다.

균막형성 관계를 분석해 볼 때, IS256 유전자가 존재하며 *agr*-I에 속하는 균주의 경우 82.9% (121/146)가 균막을 형성하여서, *agr*-III 균주의 균막양성율 50.0% (12/24), 그리고 *agr*-II 균주의 균막양성율 19.0% (15/79)에 비해 월등히 균막을 잘 형성하였다 (Table 8, $p < 0.001$). IS256이 존재하지 않는 실험균주의 경우, *agr*-II에 속하는 균주가 57.8% (48/83)의 제일 높은 균막양성율을 보였고, 다음으로 *agr*-III에 속하는 균주의 44.4% (12/27) 그리고 *agr*-I에 속하는 균주 34.8% (24/69) 순으로 균막양성율을 보였다 (Table 8, $p < 0.01$). 종합해보면 IS256 유전자가 존재하는 균주의 경우에는 *agr*-I에 속하는 균주가 제일 빈도가 높으며, 또한 IS256이 존재하는 다른 *agr* class 균주에 비해 균막을 더 잘 형성하는 것을 알 수 있었다. IS256 유전자가 존재하지 않는 균주에서는 *agr*-II가 많으며, 이들 균주가 다른 *agr* class에 비해서 균막을 더 형성하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과에 비추어 볼 때, IS256 유전자의 존재 유무는 *agr* class의 분포와 균막형성과 통계적으로 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

3.4.6. 황색포도알 균막형성에 있어 IS256 유전자와 메티실린 내성과의 관계

IS256 유전자가 존재하는 균주의 87.3% (234/268)가 MRSA, 12.7% (34/268) 균주가 MSSA 균주이었다. MRSA균주에서 IS256 유전자 존재 유무에 따른 SCCmec type의 분포를 확인해보면, IS256 유전자가 존재하는 MRSA 균주 중에서 SCCmec II 균주가 31.6% (74/234), SCCmec III 균주 38.5% (90/234), 그리고 SCCmec IV 균주 29.1% (68/234)의 분포를 보였다. 그러나 IS256 유전자가 없는 MRSA 균주 중에서는 SCCmec II 균주가 59.6% (77/129)로 가장 높았다 (Table 4, $p < 0.001$).

균막형성여부를 보면 IS256 유전자가 존재하는 MRSA균주의 60.3%

(141/234)가 균막을 형성하여 IS256 유전자가 없는 MRSA 균주의 45.4% (59/130)에 비해서 높은 균막양성율을 보였다 (Table 9, $p < 0.001$). IS256 유전자가 존재하는 MRSA균주 중에서도 SCCmec III 에 속하는 균주가 35.0% (82/234)로 균막을 제일 잘 형성하였다. Subtype 별 균막양성율을 비교하면, IS256 유전자가 존재하는 MRSA 균주 중에서 subtype III균주가 27.8% (65/234)의 균막양성율을 보여서 다른 subtype에 비해 높았다. 다음으로 subtype IV 균주 11.5% (27/234), IIIA/B 균주의 7.3% (17/234), 7.3% (17/27), IIA/B 균주 4.7% (11/234) 순으로 균막양성율을 보였으며, IID 균주는 0.8% (2/234) 가장 낮은 균막양성율을 보였다 (Table 9, $p < 0.001$). 그러나 IS256이 존재하지 않는 경우에는 subtype IID 균주가 32.5% (42/129)의 가장 높은 균막양성율을 보였다 (Table 9, $p < 0.05$). 이러한 결과를 통해 보면 MRSA 균주의 경우, IS256 유전자 존재하는 균주가 균막을 더 잘 형성하며, IS256 유전자 유무는 SCCmec subtype의 분포와 균막형성과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

3.5. 황색포도알균의 균막형성과 관련이 있는 인자들의 민감도와 특이도

임상에서 균막형성 균주를 검색하여 치료와 예후를 판단하는 자료로 사용하기 위해서 지금까지 균막양성과 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 확인된 *fnbB*와 IS256 유전자, 그리고 *agr-I*, SCCmec III에 대한 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specificity)를 확인하였다. MRSA 균주인 경우, 민감도가 80.8%으로 제일 높았으며, 특이도는 SCCmec III 인자는 95.9%, 그리고 subtype III의 경우 97.7%으로 높았으며, 다음으로 *fnbB* 유전자가 89.0%의 높은 특이도를 보였다.

4. 고찰

실험균주의 분리장소에 따른 균막형성여부를 확인한 결과, 의료인의 비강과 손에서 분리된 균주의 경우, 약 60%가 넘는 균막양성율을 보였다. 이러한 균막양성율은 Satorres 등 [41]이 2007년에 의료인에서 분리된 황색포도알균의 균막양성율인 22.2%을 무려 3배나 상회한 수치이다. 의료인에서 분리된 균주 총 47주 중에서 MRSA는 28주, MSSA 균주는 19주이었으나 MSSA 균주의 68.4%에 해당되는 13주가 균막양성균주로서, 의료인에서 분리된 MSSA 균주를 제외한 나머지 MSSA 균주 83주에서 41.0% (34/83) 균막양성율에 비해 상대적으로 높은 수치를 보였다 (data not shown). 본 실험에 참여한 의료인에서 이렇듯 균막형성 양성 균주의 보급율이 높은 이유는 만성, 지속감염 환자와 장기적인 접촉으로 인하여 치료하는 도중에 균막형성 양성인 황색포도알균이 의료인에게 집락화되어 있는 것으로 생각된다. 이러한 의료인에 균막양성균주의 높은 황색포도알균 집락화되어있는 사실은 균막양성균주의 보급자인 의료인에 의한 황색포도알균에 의한 병원감염은 만성, 지속감염이 될 가능성이 높다. 이러한 결과로 볼 때, 병원감염에을 막기 위해서는 우선적으로 의료인의 균막양성 황색포도알균의 집락화를 줄이는 방안을 강구하는 것이 시급하다고 생각된다. 배뇨관을 장착한 환자의 요에서 분리된 균주 역시 60.0%을 상회하는 균막양성율을 보여서 다른 분리장소에서 얻은 균주에서 비해서 높은 균막양성율을 보였다. 이러한 결과는 비뇨기계감염 균주의 경우 균막형성을 잘 한다는 기존의 보고와 일치하였다 [37].

본 실험균주 총 465균주 중에서 MRSA 균주는 363주 (78.0%)이었으며, 나머지는 102주(21.9%)이었다. 이러한 분리율은 Smith 등 [42]이 2008년에 스코틀랜드에서 분리한 972주의 황색포도알 중 78.4% (763주)의 MRSA 분리율과 비슷하였다. 두 균주간의 균막양성율을 비교해보면, MRSA 균주의 경우 54.8% (199/363)이었으며, MSSA 균주는 46.0% (47/102)로 MRSA균주의 균막양성율이 약간 높았으나 통계학적 의미를 찾을 수 없었다 ($p=0.120$). 본 실험실에서는 Kwon 등 [12]의 보고를 통해서 MRSA 균주가 MSSA 균주보다 유의성 있게 균막형성을 잘하는 것을 확인하였다. 그러나 본 실험의 경우, 465주를 사용하였기에 본 실험결과가 더 유의하다고 할 수 있다. 또한 MRSA와 MSSA간의 균막형성에 있어 상관관계가 없었다는

Smith 등 [42]의 보고를 감안하면 MRSA균주와 MSSA 균주 사이에 균막양성율은 실험자와 분리된 지역에 따라서 서로 다른 결과가 있을 수 있다고 생각된다.

SCC*mec*은 *mecA* 유전자와 재조합효소의 정보가 있는 *ccr* 유전자로 구성이 되어있으며, 균주 간에 이동 가능한 유전자(mobile element)이다. *ccr* 유전자 type에 따라서 type I, II, III 그리고 변이유전자로서 CA-MRSA 균주와 혈액감염 균주에서 흔하게 발견되는 *ccr* type 2을 갖는 SCC*mec* type IV 균주로 분류된다 [43]. type I 그리고 type IV SCC*mec*의 경우, *mecA* 유전자 외에 항생제내성 유전자가 없지만, SCC*mec* II, III의 경우에는 항생제 다제 내성과도 밀접한 관계가 있다 [44]. 본 실험균주 중 MRSA의 SCC*mec* type의 분포를 보면 type II균주가 41.6% (151/363), type III균주가 25.3% (92/363), type IV 균주가 31.1% (113/363) 이었다. SCC*mec* type I에 속하는 균주는 없었다 (Table 4). 실험균주의 SCC*mec* type에 따른 균막양성율을 보면 SCC*mec* type III 균주인 경우 90.2% (83/92)의 가장 높은 균막양성율을 보였으며, type IV, 49.6% (56/113), type II 균주의 경우 37.1% (56/151) 균막양성율을 보였다. 앞서 언급했듯이, 본 실험실의 기존 보고 [12]에서는 SCC*mec* type IV 균주의 경우, 균막양성율이 제일 높았으나 기존의 보고에서 사용한 균주 중 SCC*mec* type III속하는 균주가 상대적으로 적은 것이 통계적 차이를 보이는 원인이라고 생각한다. 그러나 본 실험에서도 SCC*mec* type IV에 속하는 균주는 type II 균주의 균막양성율 37.1%에 비해서 상대적으로 높은 49.6% (56/113)이며 그 중에서도 subtype IV 균주의 경우 65.9% (29/44)의 높은 균막양성율을 보였다. SCC*mec* type II 균주의 균막양성율을 subtype 별로 비교한 경우, subtype인 IID에 속하는 균주의 52.4% (44/84) 그리고 IIA/B에 속하는 균주의 4.9% (12/67)에 비해서 월등히 높은 균막양성율을 보였다 (Table 5, $p < 0.001$).

MSCRAMMs은 세포벽 즉 peptidoglycan 층에 공유결합으로 부착되어있는 부착단백질로서 실제 균이 숙주의 세포외 기질 (extracellular matrix)에 부착할 수 있게 하는 단백질이다. MSCRAMMs에 속하는 단백질은 fibronectin-binding protein (FnBP), collagen-binding protein (Cna), fibrinogen-binding protein (Fib) 그리고 clumping factor (Cif) 등이 알려져 있다 [28]. 이러한 MSCRAMMs의 LPXTG motif 부위는 세포벽을 가로질러

고정되어 있으며, 이후 세포 신호를 받아서 세포벽에 고정된다. 이때 세포신호를 받는 장소가 carboxyl-terminal 부분에 존재하는 LPXTG motif이다. 즉 MSCRAMMs 의 LPXTG motif의 Thr 과 Gly 사이를 sortase 효소가 자른 후, 결국 세포벽에 결합시킨다. LPXTG motif는 Proline 과 Glycine으로 구성되어 있거나 Ser-Asp dipeptide로 반복되는 것이 특징이며 소수성 (hydrophobic)과 양전하를 띄고 있다. 부착 단백질의 amino-terminal 부분은 세포외 기질과 결합한다 [28].

FnBPs은 구조적으로 매우 유사한 FnBPA와 FnBPB가 있다. FnBP은 균이 숙주에 부착하거나 fibronectin으로 둘러 쌓인 biomaterials에 부착하는데 깊이 관여하며, 실험동물의 심내막염을 유발하는데 관여한다 [45]. FnBP은 다양한 결합기능이 있는 것으로 알려져 있다. 즉 FnBPA의 경우 fibronectin, fibrinogen, elastin 등과 결합할 수 있으며, FnBPB 역시 fibronectin 뿐만 아니라 elastin과 결합한다 [46]. 최근 O' Neill 등 [47]의 보고에 의하면 *fnbA* 와 *fnbB* 유전자를 변이시킨 경우, MRSA 균주의 균막형성이 감소되었으나 MSSA 균주에서는 균막형성에 영향이 없다고 보고하였다. 또한 그들은 FnBP는 실제 균막형성의 primary attachment에 관여하는 것이 아니고 균막형성의 다음 단계인 세포의 축적단계에 관여하여 균막형성을 촉진하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 전체 실험균주의 MSCRAMMs 유전자의 존재를 확인하기에 앞서서, 먼저 9주의 항상 균막을 강하게 형성하는 균주와 10주의 균막형성이 매우 약한 균주를 선택하였고, 두 균 간에 MSCRAMMs 유전자의 분포를 확인하기 위해서 모두 13종의 다양한 황색포도알균의 MSCRAMMs의 유전자를 PCR을 통해서 확인하였다. *fnbA* 유전자는 균막형성에 관계없이 두 균에서 모두 존재하였다. 그러나 *fnbB* 유전자의 경우 9주의 균막형성 균주 균에서 7주가 존재하였으며, 10주의 균막을 형성하지 않는 균주 균에서는 존재하지 않았다. 이러한 결과는 Ando 등 [37]이 연구보고에서 *fnbA*가 존재하는 균주의 경우 균막을 잘 형성했다는 보고와는 다른 결과이었다. 이러한 결과의 차이는 실험에 사용한 분리 장소의 차이와 지형학적 차이 때문으로 판단되었다.

본 저자는 이러한 기본 결과를 바탕으로 총 465 주의 실험균주에서 *fnbB* 유전자의 존재를 확인하여 균막형성과의 관계를 통계적으로 분석하였다. 전체 균주 중에서 *fnbB* 유전자가 존재하는 균주는 32.5% (151/465)에

불과했으나 (Table 4), 총 151 주의 *fnbB* 유전자가 존재하는 균주 중에서 균막양성율은 84.1% (127/151)로서 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 균주의 균막양성율 37.9% (119/314)에 비해서 통계적으로 유의하게 높았다 (Table 5, $p < 0.001$). 본 실험균주 중에서 균막을 형성한 균주 총 246 주에서 *fnbB* 유전자가 존재하는 실험균주 균의 분포는 51.6% (127/246)에 해당되었다 (Table 10). 이러한 결과는 황색포도알균에서 *fnbB* 유전자의 존재하는 경우, 균막양성 균주일 가능성이 80.0% 이상이며, *fnbB* 유전자가 존재하며 균막을 형성하는 균주는 실제 임상환경에서 분리되는 균막양성균주의 약 50%에 해당된다. 그러므로 *fnbB* 유전자의 존재유무는 황색포도알균의 균막양성을 판단할 수 있는 중요한 단일 유전인자로 판단된다.

fnbB 유전자가 존재하며 MRSA 균주의 균막형성과의 관계를 분석해보면 *fnbB* 유전자를 지니는 균주의 84.8%가 MRSA 균주였으며, 특히 SCCmec III에 속하는 균주가 68.8% (88/128) 제일 많았다. 그러나 *fnbB* 유전자 없는 MRSA 균주의 경우, SCCmec II에 속하는 균주가 63.0% (148/235)로 제일 흔했다 (Table 4). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자 존재 유무와 SCCmec type의 분포와는 밀접한 관계가 있음을 시사한다. 균막형성 실험의 결과를 보면 *fnbB* 유전자 양성이며 MRSA 균주 중에서 SCCmec subtype III 균주의 경우 56.7% (64/128)의 높은 균막양성율을 보였다. 그러나 *fnbB* 유전자가 존재하지 않는 MRSA 균주에서는 SCCmec subtype IID 균주가 18.7% (44/235)로 제일 높은 균막양성율을 보였다 (Table 6, $p < 0.001$). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주는 *fnbB* 유전자가 없는 MRSA 균주에 비해서 균막을 형성을 잘하며 *fnbB* 유전자가 존재하는 MRSA 균주의 중에서도 SCCmec III에 속하는 균주가 균막형성을 제일 잘하는 것을 알 수 있었다. 또한 MRSA 균주에서 *fnbB* 유전자 존재 유무는 SCCmec type의 분포와 균막양성과 밀접한 관련이 있음을 강력히 시사하고 있다.

fnbB 유전자가 존재하는 균주의 경우, *agr*-I에 속하는 균주, 혹은 IS256 유전자가 존재하는 균주일 경우가 각각 89.4%, 92.1%로서 통계적인 의의가 있었다 (Table 4, $p < 0.001$). 그러나 *fnbB* 유전자 양성이며 *agr*-I 균주의 경우, 다른 class *agr* 균주인 경우에 비해 균막양성율에는 유의할 만한 차이점이 없었다. *fnbB* 유전자가 존재하며 동시에 IS256이 존재하는 균주의

균막양성율은 *fnbB* 유전자가 존재하며 IS256 유전자가 없는 균주의 균막양성율과 통계적인 의미가 없었다 ($p=0.568$). 이러한 결과는 *fnbB* 유전자의 존재는 *agr*-I의 분포와 IS256 유전자의 양성과 밀접한 관계가 있으나, *agr*-I, IS256 유전자와 균막형성과는 관련성이 없음을 알 수 있었다.

agr 유전자는 황색포도알균의 quorum-sensing system에 대한 유전정보를 관할하며, 독력을 조절하는 인자로 잘 알려져 있다. Quorum-sensing system은 균의 증식 시에 exponential phase에서 stationary phase로 전환하는 시기에 활성화된다. 여기에는 pheromone peptide와 세균 밀도 (density) 등이 관여한다. 또한 pheromone은 황색포도알균 병변이 생기는 것을 효과적으로 차단하였다고 보고하였다 [48]. 그러나 Vuong 등 [49]은 *agr* 변이주와 quorum-sensing blocker를 사용하여 오히려 균막형성이 증가되는 것을 확인하여 quorum-sensing blocker를 황색포도알균의 균막형성에 의한 감염 치료제로써 사용하는 것에 대해서 의문을 제기하였다. 이러한 Vuong 등의 보고를 뒷받침하는 최근 보고로서 Boles 등 [26] 역시 *agr* 유전자를 통해서 황색포도알균의 균막형성을 분산시킨다고 보고하였다. 그러나 2008년 Coelho 등 [27]은 *agr* 유전자의 경우 균막형성을 억제하거나 촉진하기도 한다고 보고하였다. *agr* class에 따른 균막형성을 확인한 기존의 보고를 살펴보면, *agr*-II 경우, 균막형성을 잘 하며, MRSA 균주에서 흔하게 발견되었다 [30]. 또한 일본에서는 비뇨기계 감염 균주 중 황색포도알균의 유전적 분석에서 *agr*-II 유전자가 많이 존재함을 보고하였으나 실험균주의 균막형성과는 연관이 없음을 보고하였다 [37]. Cafiso 등 [31]은 *agr*-II 황색포도알균의 균주의 경우 균막형성과 관계 있다고 보고하였다. 이렇듯 *agr* 유전자의 균막형성에 관한 서로 상충된 연구결과가 있음에도 불구하고, *agr* 유전자의 균막형성에 관한 역학적인 보고는 매우 제한적이었다.

본 실험에서는 실험균주의 *agr* type을 결정하고 균막형성과의 관계를 통계적으로 분석하였다. 본 실험균주의 *agr* class의 분포를 보면 80.0%에 이르는 균주의 대부분이 *agr*-I (46.2%), *agr*-II (34.8%)균주였다. 또한 *agr* class로 분류되지 않은 균주가 20주였으며, *agr* 유전자가 검색되지 않는 균주가 11주였다 (Table 4). *agr* 유전자가 존재하지만 본 실험에서 사용한 방법에 의해 검출되지 않았을 가능성을 배제하기 위해서 *hld* (δ hemolysin) 유전자의 발현여부를 다시 확인하여 11주의 경우, *agr* 유전자가 존재하지 않는

균주임을 확인할 수 있었다 (data not shown). *agr* class에 따른 균막양성율을 비교해보면, *agr*-I 균주의 경우 제일 높은 균막양성율 (67.4%)을 보여서 *agr*-I 유전자의 존재는 황색포도알균의 균막형성과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다 (Table 5, $p < 0.001$). 또한 본 실험의 균막양성균주인 총 246균주 중에서 차지하는 비율 역시 *agr*-I에 속하는 균주가 58.9% (145/246)이었으며, *agr*-II균주가 25.6% (63/246), *agr*-III 균주가 9.8% (24/246), *agr*-IV 균주는 0.1% (1/246) 순이었다 (Figure 2, $p < 0.001$). 이러한 결과는 실제 임상환경에서 황색포도알균 균주의 경우, *agr*-I에 속하는 균주가 흔하며 다른 *agr* class에 속하는 균주에 비해서 균막형성을 잘 하는 것을 시사한다.

agr class의 균막양성 여부를 확인하는 실험에는 실험균주의 MRSA 여부, 그리고 IS256 유전자의 존재 여부가 고려해야 할 중요한 요소로 판단된다. 이를 뒷받침하는 본 실험의 결과를 보면 MRSA 균주 여부에 따라 *agr* class의 분포가 서로 달랐으며, 균막형성을 잘하는 *agr* class 또한 차이가 났다. 즉, MRSA 균주 중에서 *agr*-I에 속하는 균주가 제일 많았으며 (48.5%, 176/363), *agr*-I에 속하는 MRSA 균주가 71.0% (125/176) 균막양성율을 보여 다른 *agr* class에 속하는 균주보다 높은 균막양성율을 보였다 (Table 7, $p < 0.001$). MRSA이며 *agr*-I 균주 중에서도 SCC*mec* III 균주가 45.5% (80/176)으로 다른 type에 비해서 높은 균막양성율을 보였다 (Table 7, $p < 0.001$). 또한 IS256 유전자가 존재하는 균주 중에서 *agr*-I 균주가 54.5%으로 다른 *agr* class 균주보다 더 흔했다. IS256 유전자가 존재하며 *agr*-I 균주는 82.9%의 가장 높은 균막양성율을 보여서 다른 *agr* class에 속하는 균주에 비해 그 통계적학적 의미를 확인할 수 있었다 (Table 8, $p < 0.001$). 균막형성 단일 유전자가 존재하는 균주의 균막양성율, 즉 *agr*-I 균주의 67.4%, IS256 유전자 양성인 균주의 58.2% 균막양성율에 비해서 두 가지 유전자 동시에 존재하는 경우에 균막양성율이 82.9%로 높아진 것은 두 유전자 동시 존재하는 황색포도알균의 경우, 균막을 형성을 더 잘하는 유전적 환경이 조성되는 것으로 추정할 수 있었다. 흥미로운 점은 IS256 유전자가 없는 균주의 경우, *agr*-II 속하는 균주가 많았으며 (Table 4), *agr*-II 균주의 57.8% 균막양성율은 다른 *agr* class 균주에 비해서 높았다 (Table 8, $p < 0.01$).

IS256 유전자는 황색포도알균의 균막형성의 phase variation에 관여하

며, 특히 *sigma factor B* 유전자가 IS256 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다 [50, 51]. 또한 IS256 유전자는 독력인자로서 그리고 항생제 내성 특히 다제내성과도 연관이 있다 [12, 40]. 본 실험균주 중 IS256 유전자가 존재하는 균주의 경우 58.2% (156/268)의 균막양성율을 보여서 IS256 유전자가 존재하지 않는 균주의 균막양성율 45.7% (90/197)에 비해서 높았다. IS256 유전자가 존재하는 경우 87.3%가 MRSA 균주였으며, SCC*mec* subtype III 균주가 29.9% (70/234)로 제일 높았다 ($p < 0.001$). 그러나 IS256 유전자가 없는 MRSA 균주의 경우 57.3% (74/129)가 SCC*mec* subtype IID 균주로 제일 많았다 (Table 4, $p < 0.01$). 균막양성율을 비교해보면, IS256 유전자가 있으며 MRSA 균주의 경우 60.3% (141/234)의 균막양성율을 보여서 IS256 유전자 없는 MRSA 인 균주의 45.7% (59/129)에 비해서 높았다. IS256 유전자가 존재하는 MRSA 균주 중에서는 SCC*mec* subtype III 균주가 27.8% (65/234)로 균막양성율이 제일 높았으며, IS256 유전자가 없는 MRSA 균주 중에서는 SCC*mec* subtype IID 균주가 32.5% (42/129)로 제일 높았다 (Table 9, $p < 0.001$). 이러한 결과는 MRSA 균주에서 IS256 유전자의 존재 여부는 SCC*mec* type의 분포와 각 type의 균막양성과 관계가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 *agr-I*, SCC*mec* III, *fnbB* 유전자, IS256 유전자는 황색포도알균 균주 중 균막양성균주에서 더 많이 존재하는 유전인자로서 균막양성과 관련 있는 유전인자로 판단된다. 특히 *agr-I*, SCC*mec* III, IS256, *fnbB* 유전자의 분포는 서로 밀접한 상관관계를 확인할 수 있었다. 그러나 균막형성여부를 분석해보면 *fnbB* 유전자가 존재하는 균주의 경우 균막형성에 있어 *agr* class, IS256 과 그 통계적 상관관계를 확인할 수 없었다. 그러나 IS256 유전자가 단독으로 존재하는 균주의 경우, 58.2%, 그리고 *agr-I* 유전자가 단독으로 존재하는 균주의 경우 67.4%의 균막양성율에 비해서 두 인자가 동시에 존재하는 균주의 경우에 균막양성율이 82.9%로 높아지는 결과는 두 인자가 동시에 존재하는 경우 황색포도알균의 균막양성에 상승 작용이 있는 것으로 생각되었다. MRSA 균주와 MSSA 균주의 경우 균막형성의 통계적 유의성을 확인할 수 없었지만, MRSA 균주이며, *fnbB* 유전자가 존재하는 균주이거나 혹은 IS256 유전자가 존재하는 균주 그리고 *agr-I* 유전자가 존재하는 균주인 경우에 균막양성율이 높아지는 것을 보아 MRSA 균주에

서 이들 유전인자의 존재는 균막양성율을 높이는데 관여하는 것으로 판단된다. 특히 MRSA 균주 중, SCCmec III type균주의 경우, 다른 황색포도알균의 균막형성에 관여하는 *fnbB*, IS256, *agr*-I 유전인자 중의 하나와 동시에 존재하는 경우, 균막형성이 모두 증가하여서 SCCmec III 유전자가 존재하는 균주의 경우, 균막양성에 관여하는 *fnbB*, IS256, *agr*-I 유전인자가 존재하여 더욱 균막양성에 서로 상승작용으로 관여하는 것으로 판단된다.

본 실험에서 확인된 황색포도알균의 균막형성의 유전인자의 경우는 균막양성균주를 사전에 검출하는데 유용한 유전적 지표가 되리라 생각된다. 즉 황색포도알균 임상 분리주의 균막양성균주의 가능성을 PCR을 미리 확인하여, 감염환자의 만성질환의 이환 가능성을 예상할 수 있으며, 이에 상응하는 치료의 지침으로서 유용한 정보가 되리라 생각한다.

국문 초록

임상에서 분리된 황색포도알균 *fnbB*, IS256, *agr-1*, SCCmec III 유전자의 존재와 균막 형성과의 유의성

류 종 현

(지도교수: 김 진 호)

조선대학교 대학원 의학과

황색포도알균의 균막형성에 관계있는 유전자를 황색포도알균주 451주를 대상으로 균막형성실험과 PCR를 통해 확인하였다. 균막음성균주와는 달리 균막양성균주는 SCCmec III, *agr-1*, 그리고 IS256, *fnbB* 유전자가 존재하는 비율이 높았으며, 그 통계적 의미를 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$). 즉 *fnbB* 유전자 양성균주의 84.1%, IS256 양성 균주의 58.2%, *agr-1*에 속하는 균주의 67.4%, SCCmec III에 속하는 균주의 90.2%가 균막양성을 보였다. 또한 IS256양성 균주이며, *agr-1*인 균주 146주의 경우 균막양성율이 82.9%으로 증가되어 상호간의 상승작용을 확인하였다 ($p < 0.001$). 또한 *fnbB* 유전자 존재를 제외한 나머지 3가지 유전자 요소간에는 서로 상관관계를 확인하였다 ($p < 0.001$). 메치실린내성 균주의 경우, 민감도가 80.8 %였으며, *fnbB* 유전자 양성균과 SCCmec III 양성인 균주의 민감도는 각각 89.0% 그리고 95.9% 이었다. 이상의 결과로 볼 때, *fnbB*, 그리고 IS256, SCCmec III 그리고 *agr-1* 유전자 요소들은 황색포도알균의 균막양성을 확인할 수 있는 중요한 유전적 요소임을 확인할 수 있었다. 이러한 황색포도알균의 균막양성 유전인자들은 황색포도알균의 균막에 의한 감염의 예방과 치료에 중요한 정보, 지침이 될 수 있을 것으로 판단된다

참고문헌

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999; **284**: 1318-1322.
2. Esposito S, Leone S. Prosthetic joint infections: Microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **32**: 287-293.
3. Petrelli D, Repetto A, Di Luca MC, et al. Characterization of a *Staphylococcus aureus* strain showing high levels of biofilm formation isolated from a vascular graft: Case report. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; **21**: 745-750.
4. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; **358**: 135-138.
5. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: How does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; **28**: 115-127.
6. Anderson DJ, Kaye KS. Staphylococcal surgical site infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; **23**: 53-72.
7. Al Reyami E, Al Zoabi K, Rahmani A, Tamim M, Chedid F. Is isolation of outborn infants required at admission to the neonatal intensive care unit? *Am J Infect Control*. 2009.
8. Witte W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: Epidemiological aspects. *J Antimicrob Chemother*. 1999; **44** Suppl A: 1-9.
9. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006; **119**: S3-10; discussion S62-70.
10. Donlan RM. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001; **33**: 1387-1392.
11. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; **19**: 349-356.

12. 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.
13. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002;**43**: 1367-1378.
14. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect*. 2004; **10**: 1081-1088.
15. Martin-Lopez JV, Perez-Roth E, Claverie-Martin F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. *J Clin Microbiol*. 2002; **40**: 1569-1570.
16. O'Gara JP. Ica and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; **270**: 179-188.
17. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol*. 2007; **45**: 1379-1388.
18. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J Bacteriol*. 2005; **187**: 5318-5329.
19. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**: 1973-1976.
20. 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.
21. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bachi B, Bischoff M. *Staphylococcus aureus ccpA* affects biofilm formation. *Infect Immun*.

- 2008; **76**: 2044-2050.
22. Trotonda MP, Tamber S, Memmi G, Cheung AL. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2008; **76**: 5645-5654.
 23. Simonetti O, Cirioni O, Ghiselli R, et al. RNA III-inhibiting peptide enhances healing of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; **52**: 2205-2211.
 24. Cassat J, Dunman PM, Murphy E, et al. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic *agr* and *sarA* mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology*. 2006; **152**: 3075-3090.
 25. Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**: 8113-8118.
 26. Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008; **4**: e1000052.
 27. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimaraes MA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Agr RNA III divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2008; **154**: 3480-3490.
 28. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 1998; **6**: 484-488.
 29. Stefani S, Bongiorno D, Cafiso V, et al. Pathotype and susceptibility profile of a community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain responsible for a case of severe pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; **63**: 100-104.
 30. Manago K, Nishi J, Wakimoto N, et al. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections.

- Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; **27**: 188-190.
31. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, et al. Agr-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; **51**: 220-227.
 32. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**: 1654-1660.
 33. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996; **20**: 1083-1091.
 34. Reischl U, Pulz M, Ehret W, Wolf H. PCR-based detection of Mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *Biotechniques.* 1994; **17**: 844-845.
 35. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**: 4465-4467.
 36. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2002; **70**: 4987-4996.
 37. 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.
 38. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex pcr strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**: 2155-2161.
 39. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**: 2070-2083.

40. Gu J, Li H, Li M, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect*. 2005; **61**: 342-348.
41. Satorres SE, Alcaraz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health*. 2007; **15**: 87-90.
42. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2008; **57**: 1018-1023.
43. Vourli S, Vagiakou H, Ganteris G, et al. High rates of community-acquired, panton-valentine leukocidin (*pvl*)- positive methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections in adult outpatients in greece. *Euro Surveill*. 2009; **14**.
44. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2001; **9**: 486-493.
45. Menzies BE. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; **16**: 225-229.
46. Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: Extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*. 2006; **9**: 5-11.
47. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, *fnbpA* and *fnbpB*. *J Bacteriol*. 2008; **190**: 3835-3850.
48. Mayville P, Ji G, Beavis R, et al. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**: 1218-1223.

49. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2000; **182**: 1688-1693.
50. Valle J, Vergara-Irigaray M, Merino N, Penades JR, Lasa I. SigmasB regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J Bacteriol*. 2007; **189**: 2886-2896.
51. Kiem S, Oh WS, Peck KR, et al. 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*. 2004; **19**: 779-782.

Table 1. Primers used for screening *IS256* gene and classifying *agr* class and *SCCmec* type

PCR Product	Primer sequences	Product size (bp)	Reference
IS256	F: 5'-AGTCCTTTTACGGTACAATG-3'	763	[40]
	R: 5'-TGTGCGCATCAGAAATAACG-3'		
agrI	F: 5'- ATCGCAGCTTATAGTACTTGT-3'	739	[37]
	R: 5'- CTTGATTACGTTTATATTTTCATC-3'		
agrII	F: 5'- AACGCTTGCAGCAGTTTATTT-3'	691	
	R: 5'- CGACATTATAAGTATTACAACA-3'		
agrIII	F: 5'- TATATAAATTCTTGATTTTTTATTG-3'	712	
	R: 5'- TTCTTTAAGAGTAAATTGAGAA-3'		
agrIV	F: 5'- GTTGCTTCTTATAGTACATGTT-3'	683	
	R: 5'- CTTAAAAATATAGTGATTCCAATA-3'		
SCCmecI	F: 5'- TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG-3'	49	[38]
	R: 5'-ATTTACCACAAGGACTACCAGC-3'		
SCCmecII	F: 5'-AATCATCTGCCATTGGTGATGC-3'	284	
	R: 5'-CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG-3'		
SCCmecI,III	F: 5'-ATCAAGACTTGCATTTCAGGC-3'	209	
	R: 5'-GCGGTTTCAATTCATTGTC-3'		
SCCmecII,IV	F: 5'-CATCCTATGATAGCTTGGTC-3'	342	
	R: 5'-CTAAATCATAGCCATGACCG-3'		
SCCmecIII	F: 5'-GTGATTGTTGAGATATGTGG-3'	243	
	R: 5'-CGCTTTATCTGTATCTATCGC-3'		
SCCmecII	F: 5'-TTCTTAAGTACACGCTGAATCG-3'	414	
	R: 5'-GTCACAGTAATCCATCAATGC-3'		
SCCmec IA,IIA/B,IIC,IVA	F: 5'-CAGGTCTCTTCAGATCTACG-3'	381	
	R: 5'-GAGCCATAAACACCAATAGCC-3'		
SCCmecII	F: 5'-CAGGTCTCTTCAGATCTACG-3'	303	
	R: 5'-GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC-3'		
mecA	F: 5'-TCCAGATTACAACCTCACCAGG-3'	162	
	R: 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'		

Table 2. Primers used for screening MSCRAMMs

PCR product	Primer sequences	Product size (bp)	Reference
<i>cflA</i>	F: ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT R: CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	292	[35]
<i>cflB</i>	F: ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC R: TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	205	[35]
<i>cna</i>	F: GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC R: AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423	[35]
<i>eno</i>	F: ACGTGCAGCAGCTGACT R: CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302	[35]
<i>emp</i>	F: TGTTACACCAGGGCATGCTA R: CTCGTGGTGCTGGTAAGCTA	365	In this study
<i>fib</i>	F: CTACAAC TACAATTGCCGTCAACAG R: GCTCTTGTAAAGACCATTTTCTTCAC	404	[35]
<i>fnbA</i>	F: CACAACCAGCAAATATAG R: CTGTGTGGTAATCAATGTC	1362	[36]
<i>fnbB</i>	F: GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT R: CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524	[35]
<i>map</i>	F: TAACATTTAATAAGAATCAA R: CCATTTACTGCAATTGT	943	[36]
<i>sdrC</i>	F: ACGACTATTAACCAAGAAC R: GTA CTTGAAATAAGCGGTTG	560	[36]
<i>sdrD</i>	F: GGAAATAAAGTTGAAGTTTC R: ACTTTGTCATCAACTGTAAT	500	[36]
<i>spa</i>	F: TCGAAATAGCGTGATTTTGC R: GCACTGAGCAACAAAAGATG	1892	[36]
<i>V8</i>	F: TTGTTCTTCGAAACTT R: GGCTTTGGCTTTATTG	1550	[36]

Table 3. The prevalence of biofilm-positive strains according to recovered sites

Recovered sites	Prevalence of biofilm-positive strains
Nasal cavity & hand from medical staff	61.8% (21/34)
Catheter-related urine	61.4% (35/57)
Sputum	59.6% (28/47)
Blood	57.1% (44/77)
Hands of outpatients	50.0% (12/24)
Wounds and pus	46.3% (50/108)
Body fluids *	41.9% (13/31)
Strains from dermatology dept.	20.0% (3/15)
Air in the wards.	20.0% (1/5)
Strains from ENT dept	14.3% (2/14)
Vagina from patient with vaginitis	0 % (0/1)
Unknown sites	71.2% (37/52)

Significance $p < 0.001$. Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

* Body fluids include cerebrospinal fluid, peritoneal fluid, dialysate, pleural fluid, and ascites.

Table 4. Prevalence of biofilm-related genetic factors in this study

Biofilm-related Factors	Ratio in total strains (No. of strain)	Prevalence of biofilm-related factors in the presence (+) or absence (-) of			
		<i>fnbB</i> (+)	<i>fnbB</i> (-)	IS256(+)	IS256(-)
MSSA	21.9% (102)	15.2% (23)	25.2% (79)	12.7% (34)	34.5% (68)
MRSA	78.1% (363)	84.8% (128)	74.8% (235)	87.3% (234)	65.5% (129)
SCC <i>mec</i> II	41.6% (151)	2.3 % (3)	63.0% (148)	31.6% (74)	59.6% (77)
subtype IIA/B	18.5% (67)	2.3 % (3)	27.2% (64)	27.4% (64)	2.3% (3)
subtype IID	23.1% (84)	0	35.8% (84)	4.3% (10)	57.3% (74)
SCC <i>mec</i> III	25.3% (92)	68.8% (88)	1.7% (4)	38.5% (90)	1.6% (2)
subtype III	19.6% (71)	53.1% (68)	1.3% (3)	29.9% (70)	0.8% (1)
subtype IIIA/B	5.8 % (21)	15.6% (20)	0.4% (1)	8.5% (20)	0.8% (1)
SCC <i>mec</i> IV	31.1% (113)	28.1% (36)	32.8% (77)	29.1% (68)	34.9% (45)
subtype IV	12.1% (44)	25.8% (33)	4.7 % (11)	16.7% (39)	3.9% (5)
subtype IVA	18.5% (67)	2.3 % (3)	27.2% (64)	11.5% (27)	31.0% (40)
subtype IVE/F	0.5 % (2)	0	0.9 % (2)	0.9% (2)	0
not detected	1.4 % (5)	0.8% (1)	1.7 % (4)	0	3.9% (5)
not typeable	0.6 % (2)	0	0.9 % (2)	0.9% (2)	0
<i>agr</i> - I	46.2% (215)	89.4% (135)	25.5% (80)	54.5% (146)	35.0% (69)
<i>agr</i> - II	34.8% (162)	4.6 % (7)	49.4% (155)	29.5% (79)	42.1% (83)
<i>agr</i> - III	11.0% (51)	2.6 % (4)	15.0% (47)	9.0% (24)	13.7% (27)
<i>agr</i> - IV	1.3 % (6)	0	1.9% (6)	1.9% (5)	0.50% (1)
not detected	2.4 % (11)	3.3 % (5)	1.9% (6)	3.0% (8)	1.50% (3)
not classifiable	4.3 % (20)	0	6.4% (20)	2.2% (6)	7.10% (14)
<i>fnbB</i> gene	32.5% (151)			51.9% (139)	6.1% (12)
IS256 gene	57.6% (268)	92.1% (139)	41.1% (129)		

Significance $p < 0.001$. Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test.

Table 5. The prevalence of biofilm-positivity in the presence of each biofilm-related genetic factor

Biofilm-associated factors	Ratio of biofilm-positivity in biofilm-associated factor	Significance
MSSA	46.1% (47/102)	$p = 0.120$
MRSA	54.8% (199/363)	
SCC <i>mec</i> II	37.1% (56/151)	$p < 0.001$
subtype IIA/B	4.9% (12/67)	
subtype IID	52.4% (44/84)	
SCC <i>mec</i> III	90.2% (83/92)	
subtype III	93.0% (66/71)	
subtype IIIA/B	81.0% (17/21)	
SCC <i>mec</i> IV	49.6% (56/113)	
subtype IV	65.9% (29/44)	
subtype IVA	38.8% (26/67)	
subtype IVE/F	50.0% (1/2)	
not detected	60.0% (3/5)	
not typeable	50.0% (1/2)	
<i>agr</i> - I	67.4% (145/215)	
<i>agr</i> - II	38.9% (63/162)	
<i>agr</i> - III	47.1% (24/51)	
<i>agr</i> - IV	16.7% (1/6)	
not detected	45.5% (5/11)	
not classifiable	40.0% (8/20)	
<i>fnbB</i> - positive	84.1% (127/151)	
IS256-positive	58.2% (156/268)	

Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

Table 6. Prevalence of biofilm-positivity of *fnbB*-positive strains with other biofilm-related factors

	Ratio of biofilm positivity	Significance
in <i>fnbB</i> - negative MRSA with	36.5% (86/235)	$p < 0.001$
SCC <i>mec</i> subtype IIA/B	4.3% (10/235)	
SCC <i>mec</i> subtype IID	18.7% (44/235)	
SCC <i>mec</i> subtype III	0.8% (2/235)	
SCC <i>mec</i> subtype IV	1.3% (3/235)	
SCC <i>mec</i> subtype IVA	9.8% (23/235)	
not typeable	0.8% (2/235)	
not determined	0.8% (2/235)	
in <i>fnbB</i> - positive MRSA with	88.3% (113/128)	$p < 0.001$
SCC <i>mec</i> subtype IIA/B	2.7% (3/128)	
SCC <i>mec</i> subtype III	56.7% (64/128)	
SCC <i>mec</i> subtype IIIA/B	15.0% (17/128)	
SCC <i>mec</i> subtype IV	23.0% (26/128)	
SCC <i>mec</i> subtype IVA	2.7% (3/128)	
not typeable	0.9% (1/128)	
In <i>fnbB</i> – positive strains with		$p = 0.568$
<i>agr</i> - I	85.2% (115/135)	
<i>agr</i> - II	85.7% (6/7)	
<i>agr</i> - III	75.0% (3/4)	
not determined	60.6% (3/5)	
In <i>fnbB</i> -positive strains		$p = 0.568$
with IS256	84.9% (118/139)	
without IS256	75.0% (9/12)	

Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

Table 7. Prevalence of biofilm-positivity in the presence of MRSA strains with *agr* class and in *agr*-I strains according to *SCCmec* types

	Ratio of biofilm positivity	Prevalence	Significance
In MRSA with			$p < 0.001$
<i>agr</i> -I	71.0% (125/176)	48.5% (176/363)	
<i>agr</i> - II	36.7% (52/142)	39.4% (143/363)	
<i>agr</i> -III	54.5% (12/22)	6.1% (22/363)	
<i>agr</i> - IV	0% (0/1)	0.3% (1/363)	
not classifiable	46.7% (7/15)	4.1% (15/363)	
not determined	57.1% (4/7)	1.9% (7/363)	
In MRSA & <i>agr</i> -I with			$p < 0.001$
<i>SCCmec</i> III	45.5% (80/176)		
<i>SCCmec</i> IV	24.4% (43/176)		
not determined	1.1% (2/176)		
In MSSA with			$p = 0.385$
<i>agr</i> -I	51.3% (20/39)	38.2% (39/102)	
<i>agr</i> - II	57.9% (12/20)	19.6% (20/102)	
<i>agr</i> -III	41.4% (12/29)	28.4% (29/102)	
<i>agr</i> - IV	20.0% (1/5)	4.9% (5/102)	
not classifiable	20.0% (1/5)	4.9% (5/102)	
not determined	25.0% (1/4)	3.9% (4/102)	

Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

Table 8. Prevalence of biofilm-positivity of strains according to *agr* class in the presence or absence of IS256 gene

	Ratio of biofilm-positivity	Significance
In IS256-positive strains with		$p < 0.001$
<i>agr</i> - I	82.9% (121/146)	
<i>agr</i> - II	19.0% (15/79)	
<i>agr</i> - III	50.0% (12/24)	
<i>agr</i> - IV	20.0% (1/5)	
not classifiable	50.0% (3/6)	
not determined	50.0% (4/8)	
In IS256-negative strains with		$p < 0.01$
<i>agr</i> - I	34.8% (24/69)	
<i>agr</i> - II	57.8% (48/83)	
<i>agr</i> - III	44.4% (12/27)	
not classifiable	35.7% (5/14)	
not determined	33.3% (1/3)	

Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

Table 9. Prevalence of biofilm-positivity in the presence of IS256 gene with either MRSA or SCCmec types

	Ratio of biofilm positivity	significance
in IS256-positive MRSA with	60.3% (141/234)	$p < 0.001$
SCCmec subtype IIA/B	4.7% (11/234)	
SCCmec subtype IID	0.8% (2/234)	
SCCmec subtype III	27.8% (65/234)	
SCCmec subtype IIIA/B	7.3% (17/234)	
SCCmec subtype IV	11.5% (27/234)	
SCCmec subtype IVA	7.3% (17/234)	
SCCmec subtype IVE/F	0.4% (1/234)	
not typeable	0.4% (1/234)	
in IS256-negative MRSA with	45.7% (59/129)	$p < 0.05$
SCCmec subtype IIA/B	0.7% (1/129)	
SCCmec subtype IID	32.5% (42/129)	
SCCmec subtype III	0.7% (1/129)	
SCCmec subtype IV	2.3% (3/129)	
SCCmec subtype IVA	7.0% (9/129)	
not determined	2.3% (3/129)	

Statistical analysis was determined by either the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test

Fig 1. Proportion of biofilm positivity according to SCC*mec* subtypes in total 199 biofilm-positive MRSA strains ($p < 0.001$)

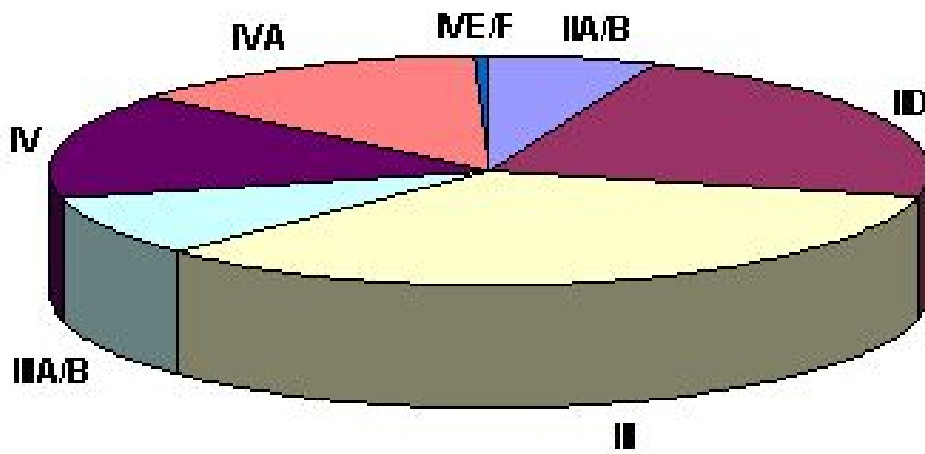
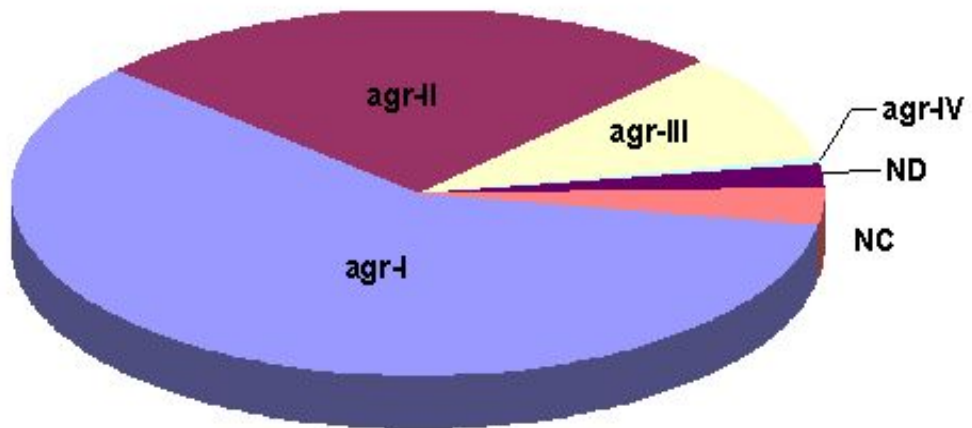


Fig 2. Proportion of biofilm positivity according to *agr* classes in total biofilm-positive strains ($p < 0.001$)



저작물 이용 허락서					
학 과	의학과	학 번	10341104	과 정	박 사
성 명	한글 : 류 종 현 한문 : 柳 宗 賢 영문 : Reu Jong Hyun				
주 소	광주 광역시 북구 용봉동 현대3차 301-1507호				
연락처	E-mail : reujh@kornet.net				
논문제목	한글 : 임상에서 분리된 황색포도알균 <i>fnbB</i> , <i>IS256</i> , <i>agr-1</i> , <i>SCCmec III</i> 유전자의 존재와 균막 형성과의 유의성				
	영문 : Prevalence of biofilm-associated genetic makers including <i>fnbB</i> , <i>IS256</i> , <i>agr-1</i> and <i>SCCmec III</i> genes and their relationship in clinical isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> .				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음. 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;"> 동의여부 : 동의(0) 반대() 2009 년 8 월 저작자 : 류 종 현 (인) </p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">조선대학교 총장 귀하</p>					