

악골골수염에서 분리된 연쇄상구균의 수종 항생제에 대한 감수성 조사

임석균, 김수관, 김미광*, 국중기*

조선대학교 치과대학 구강악안면외과, 구강생화학교실*,

조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

Suk-Kyun Kim, Su-Gwan Kim, Mi-Kwang Kim*, Joong-Ki Kook**

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, *Dept. Oral Biochemistry*, College of
Dentistry, Oral Biology Research Institute, Chosun University*

※ 교신저자 : 김수관 (Su-Gwan Kim),

광주광역시 조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실,

우편번호 : 501-759

전화 : 062-220-3815

팩스 : 062-224-9172

※ 필요한 별책 부수 : 50 부 (표지 유)

ABSTRACT

Antimicrobial susceptibility in *Streptococci* spp. bacteria isolated from osteomyelitis of the jaws

Suk-Kyun Kim, Su-Gwan Kim, Mi-Kwang Kim^{*}, Joong-Ki Kook^{*}

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, ^{}Dept. Oral Biochemistry,
College of Dentistry, Oral Biology Research Institute, Chosun University*

Previously, strains of *Streptococci* genera were isolated from osteomyelitis caused by the post-infection after extraction. In present study, to test the sensitivity of the *Streptococci* strains against seven antibiotics, penicillin G, amoxicillin, tetracycline, ciprofloxacin, cefuroxime, erythromycin, clindamycin, and vancomycin, minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using broth dilution assay. Our data showed that the value of MIC of the *Streptococci* against seven antibiotics were different among the strains. In addition, the degree of resistance to seven antibiotics of *Streptococci* strains was mainly depended on the origin of isolation. Our results suggest that the development of the rapid and accurate method to detect the antibiotics-resistant bacteria is need to prevention the misuse or abuse of antibiotics and outbreak of antibiotics-resistant bacteria.

I. 서론

악골골수염은 치성원인 또는 다른 여러 원인 요인에 의해 상하악골에 발생하는 염증성 질환이다¹⁾. 특히 악골에 발생한 만성 골수염의 경우 임상적 증상도 다양하고 그 원인요인도 분명하지 않기 때문에 진단에도 여러 어려운 점이 있다. 즉, 교통사고에 의한 악골의 골절, 치수 및 치근단 감염, 근관치료의 실패, 결핵, 발치 후 발치와의 감염 등이 악골골수염의 원인이다²⁾. 구강 내에 존재하는 세균은 약 500여 종이라고 알려져 있고³⁾, 악골골수염이 치성 기원 이외의 다양한 원인에 의해 발생하기 때문에 악골골수염 병소에 존재하는 세균도 다양하다⁴⁾. 악골골수염에 관여하는 세균의 종류 및 이들의 여러 항생제에 대한 내성 유무에 대한 자료가 빈약하기 때문에 외국 문헌에 의존하여 항생제를 투여하고 있는 실정이다. 즉, 올바른 항생제 투여에 대한 기본 자료가 없기 때문에 광범위 항생제 또는 새로 개발된 항생제를 선호하여 처방하게 되고, 이로 인한 항생제 오·남용의 문제가 발생한다. 즉, 우리나라는 항생제 오·남용에 따른 페니실린에 대한 내성율이 매우 높은 실정으로 악골골수염의 원인 세균과 그들의 항생제 내성 유무에 관한 연구 결과물을 토대로 올바른 항생제 투여 기준 마련이 필요하다. 실제로, 본 연구팀이 발표를 준비 중인 연구 결과에 의하면, 신경치료의 실패로 인해 재발된 골수염부위에서 병독성이 강한 *Klebsiella oxytoca* 종이 검출되었으며, 상악동염 수술 후 지속적인 배농이 되는 만성 골수염 환자에서 *Serratia* 속의 세균이 검출되었으며, 이러한 세균들은 모두 기회감염성 세균들로서 페니실린 및 여러 항생제에 대한 내성을 가지고 있었다. 구강 악안면 감염성 질환 중, 항생제 투여가 절대적으로 필요한 질환이 악골골수염, 상악동염 등이지만 이에 대한 국내의 연구는 매우 미진한 편이며, 이에 대한 연구가 절대적으로 필요하다.

특히, 병원성 감염에 의한 이차 감염인 경우 이에 대한 신속한 병원체의 감별 및 감수성이 있는 항생제 투여가 폐혈증 등의 심각한 부작용을 방지할 수 있다.

현재까지 개발된 세균 동정(identification)법으로는 세균배양법, ribotyping법, DNA-DNA hybridization, DNA fingerprinting, DNA probes, 16S 또는 23S 라이보솜 RNA(rRNA) 유전자 핵산염기서열 결정법, 중합효소연쇄반응법 등이 있다. 전통적인 세균배양법은 병소의 모든 세균을 배양할 수 없고, 많은 경제력 및 노동력이 필요하다는 단점은 있으나, 직접 세균을 배양하여 세균의 생화학적 특성, 유전학적 특성, 숙주와의 상호 관계, 독립인자의 검색 및 분리 등의 연구를 할 수 있다는 장점이 있다. 여러 세균 동정법 중 가장 신뢰할 만한 방법이 16S 또는 23S rRNA 유전자 염기서열 결정법이다. 세균의 16S 또는 23S rRNA 유전자 염기서열은 종간에 서로 상동성이 보존되어 있어 세균 분류학에 있어서 가장 신뢰할 수 있는 기준점이 된다. 특히, 16S rRNA 유전자는 23S rRNA 유전자보다 염기서열이 짧기 때문에 많은 세균 종에 대한 자료가 있어, 미지의 세균의 종 수준에서의 동정에 가장 많이 사용되고 있다. 일반적으로 두 세균간의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열이 약 98%이상 같으면, 같은 종으로 여긴다.

최근 김 등²⁾은 두 명의 발치와에 발생한 골수염 환자와 한 명의 교통사고 후 양측 우각부위의 부적절한 고정술에 의한 골수염들을 가진 환자의 병소로부터 혐기성 조건, 10% 이산화탄소가 첨가된 조건, 그리고 대기 조건 등에서 세균을 분리하였다. 그리고 각각의 세균의 16S rRNA 유전자 클로닝 및 핵산염기서열결정법을 이용하여 동정하였다. 그 결과 발치와에 발생한 골수염의 경우 두 환자에서 모두 47 균주가 검출되었는데, 그 중에서 33 균주(70.2%)가 연쇄상구균 속에 속하였다²⁾. 두 환자 모두 개인 치과의원에서 치료를 받았지만, 병소에서 지속적인 농이 나오는 등 여러 증상이 호전되지 않아서 조선대학교 치과병원 구강악안면외과

에 진료 의뢰된 경우였다. 골수염의 경우 정확한 미생물학적 진단과 적절한 피사조직의 제거가 치료에 필수적이다⁴⁾. 하지만, 이들의 경우는 개인 치과의원에서 일반적인 미생물검사 및 항생제 내성 검사를 실시하지 못하였기 때문에 올바른 항생제를 제대로 사용하지 못한 결과로 본 병원에 진료 의뢰되었다.

본 연구에서는 김 등²⁾의 연구에서 발치와에 발생한 골수염 병소 부위에서 검출된 연쇄상구균 속에 속하는 균주들의 수종 항생제 (penicillin G, amoxicillin, tetracycline, ciprofloxacin, cefuroxime, erythromycin, clindamycin 및 vancomycin)에 대한 내성 유무를 알아보아 향후 유사한 악골골수염 병소로 내원한 환자의 초기 항생제 처방에 대한 기초적인 자료를 얻기 위하여 시행하였다. 이와 더불어, 김 등²⁾의 연구 결과 중 수준에서 확실하게 동정이 되지 않았거나, 누락되었던 연쇄상구균들을 16S rRNA 유전자 핵산염기서열결정법으로 다시 또는 새롭게 동정하고자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세균 및 세균 배양

김 등²⁾의 선행 연구에서 2명의 발치와에 발생한 악골골수염 병소부위에서 분리 검출된 연쇄상구균을 본 연구에서 사용하였다(Table 1). 이들 연쇄상구균들은 5% sheep blood(KOMED CO., LTD, Seoul, Korea)가 첨가된 Brain Heart Infusion(BHI; Difco Laboratory, Detroit, MI, U.S.A.) 한천 배지에 도말하고, 각각의 세균이 배양된 조건 공기 중, 10% CO₂가 첨가된 상태, 및 혐기성 상태(5% CO₂, 85% N₂, 10% H₂)에서 1-2일 동안 세균 배양을 실시하였다. 한천배지에 균락을 형성한 세균은 백금이를 이용하여 5 ml의 BHI 액체배지에 접종하여 1일 동안 배양한 다음, 다음 실험에 사용하였다.

2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1 ml를 10,000x g의 원심력을 이용하여 세균을 수확하고, 이를 G-spin^{et} Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 50 µl의 Pre-incubation solution과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65 °C에서 15분간 반응시키고, 250 µl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spinTM column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 µl의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 µl의

washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 μ l의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 12,000x *g*에서 1분간 원심분리하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	Species name (new ^a)	Species name (old ^b)	Isolation
ChDC ^c B182	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	#36
ChDC B183	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>	#36
ChDC B186	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp or <i>S. mitis</i>	#36
ChDC B188	<i>S. mitis</i>	NI ^d	#36
ChDC B227	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	#36
ChDC B229	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp., <i>S. mitis</i> or <i>S. oralis</i>	#36
ChDC B231	<i>S. mitis</i>		#36
ChDC B239	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp or <i>S. mitis</i>	#36
ChDC B219	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>	#36
ChDC B185	<i>S. parasanguis</i>	<i>S. parasanguis</i>	#36
ChDC B195	<i>S. parasanguis</i>	<i>S. parasanguis</i>	#36
ChDC B212	<i>S. parasanguis</i>	NI	#36
ChDC B213	<i>S. parasanguis</i>	NI	#36
ChDC B215	<i>S. parasanguis</i>	<i>S. parasanguis</i>	#36
ChDC B217	<i>S. parasanguis</i>	<i>S. parasanguis</i>	#36
ChDC B184	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	#36
ChDC B181	<i>S. anginosus</i>	<i>S. anginosus</i>	#36
ChDC B232	<i>S. anginosus</i>	<i>S. anginosus</i>	#36
ChDC B180	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i> or <i>S. mitis</i>	#36
ChDC B211	<i>S. gordonii</i>	NI	#36
ChDC B216	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i> or <i>S. mitis</i>	#36
ChDC B241	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i> or <i>S. mitis</i>	#36
ChDC B237	<i>S. constellatus</i>	NI	#36
ChDC B194	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	#36
ChDC B196	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	#36
ChDC B218	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	#36
ChDC B317	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus</i> spp	#13
ChDC B340	<i>Streptococcus</i> spp.	NI	#13
ChDC B315	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	#13
ChDC B338	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. oralis</i> or <i>S. mitis</i>	#13
ChDC B402	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. oralis</i> or <i>S. mitis</i>	#13

^a Reidentified in this study

^b Identified in the previous study

^c Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

^d Not identified in the previous study

3. 중합효소연쇄반응을 이용한 16S rRNA 유전자의 증폭

16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 *AccuPower*[®] Premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하고, PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, MA, U.S.A) PCR machine 을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 이때 PCR의 조건은 다음과 같았다. 20 μ l의 PCR 혼합용액이 되도록, 20 pmoles씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94 °C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 μ l씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

4. 증폭된 16S rRNA 유전자의 클로닝 및 플라스미드 추출

앞에서 증폭한 16S rRNA 유전자를 pEZ-T easy vector(RNA Corp., Seoul, Korea)에 제조 회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 균락을 5 개를 선택하여 이를 5 ml의 LB broth에서 배양한 다음, 통상의 alkaline lysis법⁵⁾으로 *AccuPrep*[™] Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리(12,000x g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 μ l의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 μ l Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μ l의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 10분간 원심분리(12,000x g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리(12,000x g)하였다. 여과액은 버리고, binding column

tube에 80% 에탄올을 700 μ l 넣은 후 1분간 원심분리 (12,000x g)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리 (12,000x g) 하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μ l의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리 (12,000x g)하여 여과액을 -70°C에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다.

5. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-F(5'-AAT ACg ACT CAC TAT Agg gCg AA-3'), ChDC-R(5'-CCT CAC TAA Agg gAA CAA AAg C-3'), Seq-F1(5'-CCT ACg ggA ggC AgC Ag-3') 및 Seq-R2(5'-gAC TAC CAg ggT ATC TAA TCC-3')를 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다. 위에서 결정된 핵산염기서열을 GenBank 등의 데이터 베이스를 이용하여 상동성을 검색하고, 그 결과 98% 이상 상동성을 보이는 세균과 같은 종이라고 판정하였다.

6. 항생제 감수성 실험

본 실험에서는 penicillin G, amoxicillin, tetracycline, ciprofloxacin, cefuroxime, erythromycin, clindamycin 및 vancomycin 등 총 8개의 항생제를 씨그마사(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 여러 항생제에 대한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration; MIC)는 Murry 와 Jorgensen⁶⁾의 방법에 따라 액체 배지 회석법으로 측정하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 항생제의 농도가 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 μ g/ml씩

되도록 조절된 0.1 ml의 액체배지에, 450 nm의 파장에 대한 흡광도(A_{450})가 0.05로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml씩 접종하고, 이를 각각의 세균에 최적의 성장 조건에서 48 시간 배양한 후 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과 음성대조군인 세균을 넣지않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 MIC 값으로 결정하였다. 이때 양성 대조군으로는 항생제를 넣지 않고 세균 배양액으로 하였다. 이때 항생제에 대한 각각의 세균 균주들의 민감도는 Table 3을 기준으로 민감도를 결정하였다.

Table 2. Interpretive standards for dilution susceptibility testing ⁷⁾

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin G	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Ampicillin	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Cefuroxime axetil	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycin	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Clindamycin	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Vancomycin	≤ 8		≥ 16

Ⅲ. 연구결과

1. 연쇄상구균의 재동정

김 등²⁾의 연구에서 발치와에 발생한 골수염 병소에서 분리 동정된 33 균주의 연쇄상구균 중 지속적인 계대배양시 보존이 유지되는 25 균주와 그 당시 16S rRNA 클로닝 및 핵산염기서열결정시 실패한 6 균주의 16S rRNA 유전자를 새로이 핵산염기서열을 결정하였다(Table 1). 그 결과 중 수준에서 동정이 되지 않았던 9 균주 중 ChDC B182, ChDC B183, ChDC B227, ChDC B229, ChDC B239, 및 ChDC B317 균주는 *S. mitis*로, ChDC B180, ChDC B216, 및 ChDC B241 균주는 *S. gordonii*로 동정되었다. 하지만, 6 균주(ChDC B194, ChDC B196, ChDC B218, ChDC B315, ChDC B338, 및 ChDC B402)는 여전히 16S rRNA 유전자 핵산염기서열결정법으로는 특정 종으로 동정할 수 없었다(Table 2). 본 연구에서는 새로이 6 균주를 추가로 분리 동정한 결과, 1 균주의 *S. mitis*, 2 균주의 *S. parasanguinis*, 1 균주의 *S. gordonii*, 1 균주의 *S. constellatus* 및 아직 중 수준에서 동정이 되지 않은 1 균주의 연쇄상구균을 얻었다.

2. 수종 항생제에 대한 최소성장억제농도 측정

김 등²⁾의 연구에서 #36 발치와의 골수염에서 얻은 연쇄상구균들은 모두 cefuroxime에 감수성을 보였고, penicillin과 amoxicillin에는 중정도의 감수성을 보였다(Table 2 & 3). 또한, *S. salivarius* ChDC B184 균주를 제외하고는 모두 erythromycin과 clindamycin에도 감수성을 보였다(Table 3). *S. sanguinis* ChDC B219, *S. parasanguinis* ChDC B217, *S. gordonii* ChDC B216, ChDC B241, *S. constellatus* ChDC B237, 및 *Streptococcus gordonii* ChDC B211 등 6

균주는 vancomycin에 대한 저항성을 갖었다(Table 3).

#13 발치와의 골수염에서 얻은 연쇄상구균들은 #36 발치와의 골수염을 갖은 환자에서 얻은 균주들보다 본 연구에 사용한 대부분의 항생제에 대하여 높은 최소성장억제농도 값을 갖었다(Table 3). 특히, ChDC B338과 ChDC B402 균주들은 vancomycin을 제외한 7가지 항생제에 대하여 내성을 갖고 있었다(Table 3). ChDC B315 균주만이 cefuroxime에 대해서 감수성을 보였고, penicillin, amoxicillin과 ciprofloxacin에 중정도의 감수성을 보였다(Table 3).

Table 3. Minimal inhibitory concentration of several antibiotics for *Streptococci* species isolated from osteomyelitis

Strains	Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)							
		PEN ¹	AMX ²	TET ³	CIP ⁴	CMX ⁵	ERY ⁶	CLI ⁷	VAN ⁸
<i>S. mitis</i> ChDC* B182		1	2	32	2	2	0.25	0.25	8
<i>S. mitis</i> ChDC B186		0.5	0.5	32	2	0.5	0.25	0.25	4
<i>S. mitis</i> ChDC B229		0.25	0.25	8	8	1	0.25	0.25	4
<i>S. mitis</i> ChDC B239		0.25	0.25	8	4	0.25	0.25	0.25	8
<i>S. mitis</i> ChDC B227		0.25	0.25	0.25	4	1	0.25	0.25	4
<i>S. mitis</i> ChDC B183		2	4	0.5	2	1	0.25	0.25	8
<i>S. mitis</i> ChDC B188		1	1	0.25	2	2	0.25	0.25	8
<i>S. mitis</i> ChDC B231		1	0.5	0.25	2	2	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B185		2	16	64	2	1	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B212		1	4	64	4	1	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B213		1	4	64	4	2	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B215		1	2	16	4	1	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B195		1	2	8	4	1	0.25	0.25	8
<i>S. parasanguinis</i> ChDC B217		0.5	0.25	1	8	4	0.25	0.25	16
<i>S. sanguinis</i> ChDC B219		0.25	0.5	0.5	2	0.5	0.25	0.25	16

*Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

¹Penicillin G ²Amoxicillin ³Tetracycline ⁴Ciprofloxacin

⁵Cefuroxime ⁶Erythromycin ⁷Clindamycin ⁸Vancomycin

(Continued on next page)

Table 3. (Continued)

Strains	Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
		PEN ¹	AMX ²	TET ³	CIP ⁴	CMX ⁵	ERY ⁶	CLI ⁷	VAN ⁸
<i>S. salivarius</i> ChDC B184		1	1	64	8	0.5	64<	32	8
<i>S. anginosus</i> ChDC B181		1	2	1	2	0.5	0.25	0.25	8
<i>S. anginosus</i> ChDC B232		0.25	0.25	1	2	0.5	0.25	0.25	8
<i>S. gordonii</i> ChDC B180		0.25	0.5	32	2	0.25	0.25	0.25	8
<i>S. gordonii</i> ChDC B211		0.5	0.5	16	8	0.25	0.25	0.25	16
<i>S. gordonii</i> ChDC B216		0.25	0.25	32	4	0.25	0.25	0.25	16
<i>S. gordonii</i> ChDC B241		0.25	0.5	16	16	2	0.25	0.25	16
<i>S. constellatus</i> ChDC B237		0.25	0.25	1	1	0.5	0.25	0.25	16
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B194		0.5	2	1	16	1	0.25	0.25	8
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B196		0.25	0.25	64	4	0.5	0.25	0.25	8
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B218		0.25	0.25	64<	4	0.25	0.25	0.25	8
<i>S. mitis</i> ChDC B317		16	8	32	4	64	4	16	4
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B315		1	1	64	2	0.5	16	32	8
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B340		4	8	64<	4	8	1	64	8
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B338		16	32	64	32	32	64<	64	8
<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B402		16	32	64	32	32	64<	64	8

*Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

¹Penicillin G ²Amoxicillin ³Tetracycline ⁴Ciprofloxacin

⁵Cefuroxime ⁶Erythromycin ⁷Clindamycin ⁸Vancomycin

IV. 총괄 및 고안

본 연구 결과 김 등²⁾의 최근 연구에서 발치와에 발생한 악골골수염 병소에서 분리 동정한 연쇄상구균의 수종 항생제 내성 유무를 조사한 결과, 환자에 따른 수종 항생제 내성 균주 보유 정도의 차이가 많은 것으로 나타났다. 즉, #13에 발치와에 골수염 병소를 갖은 환자에서 분리 동정된 연쇄상구균들이 #36의 발치와에 발생한 골수염 병소를 갖는 환자에서 분리 동정된 연쇄상구균들보다 많은 종류의 항생제에 대해 내성을 보였다(Table 3). 하지만, #36의 발치와에 발생한 골수염 병소에서는 연쇄상구균이나 포도상구균에 있어 최후의 항생제라 할 수 있는 vancomycin에 대한 내성을 보이는 6 균주가 발견되었다(Table 3). 이러한 개인간의 항생제 내성 보유 균주 차이의 원인 중 하나가 항생제 오·남용이라 생각되며, 일반적으로 세균 내 항생제 내성유전자가 conjugation plasmids나 transposons로 같은 종 내의 세균 또는 다른 종의 세균으로 전달될 수 있음⁸⁾을 고려하면, 연쇄상구균이외의 다른 세균 종들도 본 연구에서 사용하였던 항생제에 대한 내성을 갖고 있을 확률이 높을 것으로 사료된다.

항생제에 대한 내성 기전으로는 크게 자연내성과 획득 내성으로 나눌 수 있다⁹⁾. 즉, vancomycin은 그람양성 세균에는 항균력이 강하지만, 그람음성 세균에 대한 항균력은 없는데, 이는 vancomycin의 분자가 크고, 소수성이어서 그람음성 세균의 외막을 투과할 수 없기 때문이다⁹⁾. 이러한 내성기전을 자연내성이라 한다. 획득내성이란 세균의 염색체 유전자 변이나, plasmids^{10,11)} 또는 transposons¹²⁾에 매개되는 내성유전자의 획득에 의해서 생기며, 일부 균주만 갖게되는 것을 의미한다. 특정 항생제에 대한 내성유전자에는 beta-lactamase¹³⁻¹⁶⁾나, aminoglycoside acetyltransferase^{17,18)}와 같은 효소나, 세포 내로 유입된 항생제(리보솜의 단

백질 생성을 저해하는 tetracycline이나 macrolide이나 DNA gyrase의 활성을 억제하는 quinolone계)를 능동적으로 세포 외로 유출하여 내성을 획득하는 다제내성 펌프(multidrug resistance pump, MDR) 단백질 등이 있다¹⁹⁻²⁶⁾. 본 연구에서 #13번 발치와에 발생한 골수염 병소 부위에서 분리 동정된 5 균주의 연쇄상구균들이 여러 항생제에 대한 내성을 보였는데, 본 연구결과만으로는 어떠한 기전으로 그러한 현상을 보이는 지 알 수는 없지만, 다제내성 펌프 유전자에 의한 것일 수 있고, 이들 유전자들이 conjugation plasmids나 transposons에 의해 여러 세균 종에 transfer되었을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이러한 내성 기전을 증명하기 위하여, 차후에 다제내성 펌프 유전자의 존재 유무를 분자생물학적 방법(중합효소연쇄반응법)을 이용하여 알아보고자 한다.

본 연구 결과 한 사람의 같은 골수염 병소에서 분리 동정된 같은 종의 세균들일지라도 균주에 따른 항생제 내성의 차이가 있는 것으로 나타났다. 즉, #13번 발치와에 발생한 골수염 병소 부위에서 분리 동정된 *S. mitis* 종의 경우 ChDC B182와 ChDC B186 균주들은 tetracycline에만, ChDC B227, ChDC B229 및 ChDC B239 균주들은 ciprofloxacin에만, ChDC B183 균주는 amoxicillin에만 내성을 보였고, ChDC B188과 ChDC B231 균주들은 8가지 모든 항생제에 감수성을 보였다(Table 3). 또한, 모든 8가지 항생제 각각에 대한 최소성장억제농도 값을 갖는 균주들은 없었다. 이러한 현상은 *S. parasanguinis*와 *S. gordonii* 균주에서도 관찰할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과의 원인은 현재로써는 알 수 없지만, 다음의 두 가지 이 유일 것이라고 사료된다. 첫 번째로 지속적인 항생제 투여에 의한 세균의 항생제에 대한 내성 유전자의 획득 때문일 수 있을 것이다. 실제로 #13 발치와에 골수염이 발생한 환자의 경우 본 병원에 내원 후 약 2달 정도 지속적으로 augmentin을 투여하였는데, 이는 amoxicillin을 포함한 페니실린계 항생제에 대해 전혀 호전되지 않았기 때문이었다. 또한, #36 발치와에 골수염

이 발생한 환자의 경우 약 2달 정도 지속적인 제2세대 세파계 항생제인 cefaclor(ceclor)를 투여하여 증상이 호전되었다. 하지만, 동일한 세파계 항생제인 cefuroxime에 대한 감수성을 보이는 기준 농도인 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최소성장억제농도 값을 갖는 *S. parasanguinis* ChDC B217이 검출되었다. 이는 이 환자에게 지속적으로 cefaclor를 투여할 경우 내성을 보이는 세균이 출현할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다. 세균의 항생제에 대한 내성유전자 획득이 쉬운 이유는 아마도 짧은 시간에 증식이 가능하고, DNA 복제시 잘못된 뉴클레오타이드가 합성되더라도, 이를 치유할 수 있는 기전이 진핵세포보다 떨어지기 때문에 돌연변이가 일어날 수 있는 확률이 높기 때문일 것이다. 두 번째로는 전술한 바와 같이 특정 항생제에 대한 내성유전자를 갖는 같은 종 또는 다른 종으로부터 conjugation plasmids나 transposons에 의해 내성유전자를 획득하는 균주와 그렇지 못한 균주가 상존하기 때문일 것으로 생각된다. 이러한 가설은 각각의 항생제에 내성을 갖는 균주들의 내성 기전을 분자생물학적 수준에서 밝히고, 항생제에 감수성을 갖는 다른 종의 균주들을 함께 배양하여, 이들의 항생제 내성 획득 유무를 관찰함으로써 증명할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 김 등²⁾의 연구에서 골수염 병소에서 분리 동정된 연쇄상구균의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열 결정을 재시행하여, 이전 연구에서 중 수준으로 동정이 되지 않은 9 균주 중 3 균주를 중 수준으로 동정하였다(Table 1). 앞선 연구에서 16S rRNA 유전자 핵산염기서열결정 실험에 이용된 3가지 프라이머(T3 프로모터 결합, T7 프로모터 결합 및 Seq-F1) 중 하나인 T3 프로모터 결합 프라이머를 이용하여 핵산염기서열을 결정한 결과가 약 30%의 실패율을 보였다(자료는 제시 안 함). 이러한 이유를 알아보기 위해 T3 프로모터 결합 프라이머의 안정성과 특이성을 PrimerSelect 프로그램 (Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)으로 조사한 결과 불안정하고, 특이성도 떨어지는 것으로 분석되었다(자료는 제시

안 함). 본 연구에서는 PrimerSelect 프로그램을 이용하여 안정성이 높은 ChDC-F(T3 대신 이용) 및 ChDC-R(T7 대신 이용) 프라이머를 설계하여, 이를 합성하여 이용하였다. 또한 Seq-F1이외에 Seq-R2 프라이머를 새로이 추가하여 핵산염기서열을 결정하였다. 하지만, 본 연구 결과 여전히 7 균주(추가로 분리한 1 균주를 포함)를 종 수준에서 동정하는 데는 실패하였다. 이러한 결과는 첫 번째로 기존의 여러 연쇄상구균 종에 대한 16S rRNA 유전자 염기서열 데이터가 많지 않기 때문에 비교가 불가능하기 때문일 수 있고, 두 번째로는 서양인에 분리된 연쇄상구균 종의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열이 한국인에서 분리된 같은 종의 것과 차이가 있기 때문일 것으로 사료된다. 즉, 아직까지 한국인에서 분리 동정된 연쇄상구균의 16S rRNA 유전자 염기서열에 대한 데이터가 GenBank 데이터 베이스에는 거의 없는 실정이며, 서양인의 구강에서 분리된 연쇄상구균의 데이터도 부족하기 때문이다. 또한 16S rRNA 유전자 핵산염기서열 결정법으로는 절대적으로 세균을 종 수준에서 동정하기는 어렵기 때문인 점도 있다. 그러므로, 분자생물학적 방법 이외에도 기존의 생화학검사법(당 분해능, 여러 가지 효소의 존재 유무)을 병행하여 세균을 동정하는 것도 필요하리라 사료된다. 또한, 한국인에서 많은 균주들을 분리 배양하여, 이들의 유전학적 자료뿐만 아니라 전통적인 형태학적 및 생화학적 자료들을 많이 확보하여야 할 것으로 사료된다. 현재 분자생물학적 방법의 빠른 발전 속도를 감안할 때, 멀지 않은 미래에는 세균 지놈 핵산염기서열을 신속 정확하고, 저 비용으로 밝힐 수 있는 방법이 개발될 것으로 생각되며, 그 때에는 얼마나 많은 양의 임상분리 균주들이 확보되어 있느냐에 따라 좀더 정확한 종 수준에서의 세균 동정이 이루어질 것으로 사료된다. 또한, 이러한 자료를 토대로 세균배양을 하지 않고서도 악골골수염 병소 부위에 존재하는 원인균의 동정 및 항생제 내성유전자 존재 유무를 신속하게 조사할 수 있어 환자에 맞는 항생제를 조기에 투여할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합할 때, 16S rRNA 유전자 핵산염기서열 결정법을 이용한 세균의 종 수준에서의 확실한 동정을 위해서는 한국인에서 분리된 모든 종의 연쇄상구균의 데이터가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 두 환자간에 수종 항생제 내성 균주 보유 정도의 차이가 많은 것으로 나타났고, 항생제 내성 균주의 발생을 차단하기 위해서는 신속한 항생제 내성 균주 존재 유무를 밝힐 수 있는 방법의 개발과 항생제 오·남용을 막아야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 김 등²⁾의 연구에서 발치와에 발생한 골수염 병소 부위에서 검출된 33 균주의 연쇄상구균 중 지속적인 계대배양시 보존이 유지되는 25 균주와 그 당시 16S rRNA 클로닝 및 핵산염기서열결정 시 실패한 6 균주의 16S rRNA 유전자를 새로이 핵산염기서열을 결정하고, 그들의 수종 항생제(penicillin G, amoxicillin, tetracycline, ciprofloxacin, cefuroxime, erythromycin, clindamycin 및 vancomycin)에 대해 내성 유무를 알아본 결과,

1. 종 수준에서 동정이 되지 않았던 9 균주 중 ChDC B182, ChDC B183, ChDC B227, ChDC B229, ChDC B239, 및 ChDC B317 균주는 *S. mitis*로, ChDC B180, ChDC B216, 및 ChDC B241 균주는 *S. gordonii*로 동정되었다.
2. 본 연구에서 새로이 6 균주를 추가로 분리 동정한 결과, 1 균주의 *S. mitis*, 2 균주의 *S. parasanguinis*, 1 균주의 *S. gordonii*, 1 균주의 *S. constellatus* 및 아직 종 수준에서 동정이 되지 않은 1 균주의 연쇄상구균을 얻었다.
3. #13 발치와의 골수염에서 얻은 연쇄상구균들은 #36 발치와의 골수염을 갖은 환자에서 얻은 균주들보다 본 연구에 사용한 대부분의 항생제에 대하여 내성을 갖었다.

이상의 결과를 종합할 때, 16S rRNA 유전자 핵산염기서열 결정법을 이용한 세균의 종 수준에서의 확실한 동정을 위해서는 한국인에서 분리된 모든 종의 연쇄상구균의 데이터가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 두 환자간에 수종 항생제 내성 균주 보유 정도의 차이가 많은 것

으로 나타났고, 항생제 내성 균주의 발생을 차단하기 위해서는 신속한 항생제 내성 균주 존재 유무를 밝힐 수 있는 방법의 개발과 항생제 오·남용을 막아야 할 것으로 생각된다.

9. 이연희 : 항생제내성기전. 미생물과 산업 2002;28(2)29-34.
10. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N : Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. Antimicrob Agents Chemother 1993;37(5):984-990.
11. Cloeckert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel JL, Chaslus-Dancla E : Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(10):2858-2860.
12. Simjee S, White DG, McDermott PF, Wagner DD, Zervos MJ, Donabedian SM, English LL, Hayes JR, Walker RD : Characterization of *Tn1546* in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. J Clin Microbiol 2002;40(12):4659-4665.
13. Bauernfeind A, Wagner S, Jungwirth R, Schneider I, Meyer D : A novel class C beta-lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(9):2041-2046.
14. Nelson EC, Elisha BG : Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(4):957-959.
15. Bonnet R, Chanal C, Ageron E, Sirot D, De Champs C, Grimont P, Sirot J : Inducible AmpC beta-lactamase of a new member Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(10):3316-3319.

16. Petrosino JF, Pendleton AR, Weiner JH, Rosenberg SM : Chromosomal system for studying AmpC-mediated beta-lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1535-1539.
17. Noguchi N, Emura A, Matsuyama H, O'Hara K, Sasatsu M, Kono M : Nucleotide sequence and characterization of erythromycin resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(10):2359-2363.
18. van Boxtel RA, van de Klundert JA : Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance gene *aacC3* in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(12):3173-3178.
19. Furukawa H, Tsay JT, Jackowski S, Takamura Y, Rock CO : Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J Bacteriol.* 1993;175(12):3723-3729.
20. Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T : The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11):2567-2569.
21. Hamzhepour MM, Pechere JC, Plesiat P, Kohler T : OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11):2392-2396.
22. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF : Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*

1996;40(12):2835-2841.

23. Mitchell BA, Brown MH, Skurray RA : QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 42(2):475-477.
24. Kaatz GW, Seo SM, O'Brien L, Wahiduzzaman M, Foster TJ : Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(5):1404-1406.
25. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H : High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):647.
26. Yu JL, Grinius L, Hooper DC : NorA functions as a multidrug efflux protein in both cytoplasmic membrane vesicles and reconstituted proteoliposomes. *J Bacteriol* 2002;184(5):1370-1377.