

Effects of Biofilm Formation on The Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*

Kyung Jin Cho¹, Shen Jin¹, Jinghua Cui¹, Taek Rim Yoon² and Phil Youl Ryu^{1*}

¹Department of Microbiology, ²Orthopedic Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Republic of Korea

Received : November 25, 2008

Revised : December 1, 2008

Accepted : December 10, 2008

Staphylococcus aureus induces chronic infection in form of biofilm that exists in the host cells and arthroplastic prosthesis surface. In this study, the biofilm formation ability of *S. aureus* clinically isolated from bacteremia patients, biofilm processing and relationship of resistance to antibiotics, and difference of biofilm formation ability on different prosthetic material surfaces were studied. All of them formed biofilm and especially 6 strains of *S. aureus* had high ability of biofilm formation. In addition, it was found that some strains with higher biofilm formation ability make more higher polysaccharide layer production. When *S. aureus* ATCC 25923 forms biofilm, minimal bactericidal concentration (MBC) of biofilm bacteria is more increased than that of the planktonic state bacteria about one thousand folds. Especially, after 6 hours from starting on biofilm formation, the resistance to antibiotics was increased by more than 256 µg/ml of MBC to every antibiotics and after 8 hours prominent increase (more than 4096 µg/ml) was noted. Biofilm formation after bacterial adherence to plastic cover-slip was increased with time-dependent manner. Microcolonies were formed after 5 hours from a point that bacteria adhere to plastic cover-slip surface and after 6 hours biofilm was diffusely formed on entire surface, and then after 8 hours very thick biofilm was formed. Thicker biofilm was found on cobalt-chromium than titanium surface. These results suggest that titanium alloy materials are better than cobalt-chromium to minimize *S. aureus* biofilm formation on the arthroplastic material surface. Also, when microcolonies are formed after adherence of *S. aureus* to the arthroplastic material surface, resistance to antibiotics is starting.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, Biofilms, Resistance to antibiotics

서 론

오늘날 고관절 및 슬관절의 인공관절 치환술은 매우 효과적이고 성공적으로 시행되는 기본적인 정형외과 수술이지만 (15,39) 합병증이 생기는 경우 인공관절 치환술

의 실패와 장기간의 치료를 요한다. 가능한 합병증 중에서 인공관절에의 감염증 (prosthetic joint infection, PJI)은 진단과 치료가 가장 어려우며 심각한 조직손상을 초래한다 (18,20). 고관절 및 슬관절의 인공관절 치환술 이후 PJI의 합병증은 1~5%이며, 재치환술 이후에는 그 빈도는 더 높아진다 (33). 급성 및 만성 PJI에서 황색포도알균 (*Staphylococcus aureus*)과 혈장응고효소 음성 포도알균 (coagulase-negative staphylococcus)이 자주 분리되는 균이다. 감염된 세균은 인공관절의 표면에 융합성의 균막 내에서 성장하고 항균제에 내성을 보임으로써 항균제의 전신 투여에도 세균을 제거하기 매우 어렵다.

황색포도알균은 높은 이환율 및 사망률을 보이는 화농

*Corresponding author: Prof. Phil Youl Ryu, Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, Hak-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-746, Republic of Korea.
Phone: +82-62-220-4135, Fax: +82-62-228-7294
e-mail: pyryu@chonnam.ac.kr

**This work was supported by a grant (CUHRCM-U-2007017) from Chonnam National University Hospital Research Institute of Clinical Medicine.

성 질환과 독소-매개성 질환을 유발하는 가장 독력이 강한 세균으로서 (21) 원내감염의 주요 원인균이다. 대표적인 황색포도알균 감염증은 심내막염, 골수염, 독소충격증 후군, 식중독 및 피부감염증이 있다 (32). 황색포도알균은 사람에게 매우 잘 적응되어 있어, 숙주세포에의 부착, 숙주세포의 방어기전으로부터 보호 및 항균제 치료에 대한 내성에 관여하는 여러 가지의 인자를 가지고 있다 (8,14,16,19,28,29). 특히 인체감염에서, 항균제 치료와 숙주 방어기전에 대한 내성 획득 및 만성적인 원내감염은 균막 (biofilm) 형성과 밀접한 관계가 있다 (34).

황색포도알균은 조직이나 인체내 삽입물체의 표면에 부착하면 세균의 성장을 위한 뼈대 (scaffold)로서 다당체 (glycocalyx)와 단백질로 구성된 균막을 형성한다 (1). 피부포도알균 (*Staphylococcus epidermidis*)의 경우 stainless steel의 표면에 가장 많은 세균이 부착하며 다음으로는 cobalt-chromium, titanium, polymethylmethacrylate (PMMA)에 부착할 수 있다 (27). 균막을 형성한 포도알균은 여러 종류의 항균제에 대해 실험실내에서 배양된 세균 (planktonic bacteria) 보다 10~1000배 이상 높은 내성도를 보인다 (2,5,26). 따라서 PJI 치료의 어려움 때문에 병원성 세균에 의한 균막 형성을 예방하기 위한 방법들이 연구되고 있다 (24,31,38).

본 연구는 인공관절의 표면에 황색포도알균에 의한 균막 형성을 억제하는 방법을 개발하기 위한 기본 연구로서, 균혈증 환자의 혈액에서 분리된 균주의 균막 형성능, 균막 형성시 항균제에 대한 내성도의 변화 및 균막 형성 과정과 내성 획득 시점과의 상관관계와 인공관절의 합금 소재에 따른 균막 형성에 어떠한 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주 및 시약

균막 형성능을 조사하기 위하여 2005년 7월부터 9월까지 균혈증 환자의 혈액에서 분리된 황색포도알균 17주와 표준균주 ATCC 25923, 14458 및 29213를 사용하였다. 실험균주는 -70℃에 보관하였다가 사용하였다. Mueller-Hinton broth (MHB) 및 tryptic soy broth (TSB)는 Becton-Dickinson (Sparks, MD, USA)에서 구입하였으며, crystal violet과 glucose는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항균제 감수성 검사에는 clarithromycin

(CAM, Abbott, Abbott Park, IL, USA), cefotaxime (CTX, 하원 제약, 서울, 대한민국), cefmetazole (CMZ, 극동제약, 서울, 대한민국), erythromycin (EM, Abbott), benzylpenicillin (PCG, 신풍제약, 서울, 대한민국) 및 vancomycin (VCM, 삼성제약, 서울, 대한민국) 등 6종을 사용하였다.

2. 균막 형성 실험

황색포도알균의 균막 형성 실험은 Melchior 등의 방법 (22)을 변형하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. TSB에서 24시간 배양된 균액을 TSB에 1:100으로 희석하여 4시간 동안 37℃에서 진탕배양한 후 0.5% glucose가 함유된 TSB에 1:100으로 희석하고 20-well plate (Becton Dickinson)에 1 ml를 분주하여 37에서 24시간 배양하여 균액을 버린 후 생리식염수로 조심스럽게 3회 세척하였다. Plate를 80℃에서 건조시킨 후 plate 바닥에 형성된 균막을 0.4% crystal violet으로 염색하였다. 염색된 균막의 정도를 측정하기 위해 ethanol-acetone (95:5) 0.5 ml를 분주하여 탈색시킨 후 200 µl를 96-well plate (Becton Dickinson)로 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

균막 형성을 광학현미경으로 관찰하기 위한 실험은 Jabra-Rizk 등의 방법 (17)을 변형하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. 6-well plate (Becton Dickinson)에 멸균된 plastic microscope cover-slip (VWR, West Chester, PA, USA)을 넣고 0.5% glucose가 함유된 TSB 4 ml에 실험균주를 접종하여 일정시간 배양한 후, cover-slip을 phosphate buffered saline으로 조심스럽게 세척하고 crystal violet으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 당질층 생성능

균막 형성에 중요한 역할을 하는 당질층 생성능은 Congo red agar (CRA)를 사용하였다 (11). CRA는 1 L의 brain heart infusion agar (Oxoid, Cambridg, UK)에 0.8 g의 congo red (Sigma), 36 g의 saccharose (Sigma)를 첨가하여 제조하였다. 실험균주를 접종하고 37℃에서 24시간 배양하여 균 집락의 특성을 관찰하였다.

4. 부유세균 (planktonic bacteria)에 대한 항균제 감수성 검사

부유세균에 대한 항균제의 최소억제농도 (MIC, minimum inhibitory concentration)와 최소살균농도 (MBC, minimum bactericidal concentration)는 Nishimura 등의 방법 (25)에

준하여 실시하였으며, 그 방법은 다음과 같다. 항균제를 MHB에 512 µg/ml에서부터 2배수 계단희석하여 96-well plate에 100 µl를 분주하고 1×10^7 cfu/ml로 희석된 균액 5 µl를 접종하였다. 24시간 배양한 후 균의 성장이 관찰되지 않은 농도를 MIC로 판정하고, MIC 이상의 농도의 well의 균을 한천배지에 24시간 배양하여 MBC를 판정하였다.

5. 균막 형성 세균에 대한 항균제 감수성 검사

균막이 형성된 세균에 대한 항균제 감수성 검사는 Nishimura 등의 방법 (25)에 준하여 실시하였으며, 그 방법은 다음과 같다. TSB에서 24시간 배양된 균액을 TSB에 1:100으로 희석하여 4시간 동안 37°C에서 진탕배양한 후 0.5% glucose가 함유된 TSB에 1:100으로 희석하고 96-well plate에 200 µl를 분주하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 균막을 형성시킨 후 균 배양액을 제거한 후, MHB에 2배수로 계단희석된 항균제 200 µl를 분주하였다. 24시간 처리한 후 항균제가 함유된 MHB를 제거하고 멸균된 생

리식염수를 각 well에 넣고 균막을 부유시켜 한천배지에 접종하여 24시간 배양한 후 균의 성장이 관찰되지 않은 최소농도를 MBC로 판정하였다.

6. 금속합금 disc에의 균막 형성능

인공관절의 표면에 대한 균막 형성능은 Gallo 등의 방법 (12)을 변형하여 실험하였는데 그 방법은 다음과 같다. 인공관절에 사용되는 titanium 합금 (이하, Ti-Eli)과 cobalt-chromium 합금 (이하, Co-Cr) 소재를 disc (지름 8 mm)로 만들어 멸균한 후 사용하였다. 12-well plate에 disc를 넣고 0.5% glucose가 함유된 TSB 2 ml를 분주하고 균을 접종한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 균액을 버린 후 saline으로 조심스럽게 3회 세척하였다. Disc를 80°C에서 건조

Table 1. Association of biofilm production with slime production in *Staphylococcus aureus* isolates from bacteremia patients

Tested strains	OD at 570 nm	Colony color on the CRA*
H05-727	1.276	Bordeaux
H05-735	1.093	Red
H05-736	1.152	Bordeaux
H05-749	2.489	Black
H05-756	1.007	Bordeaux
H05-764	1.367	Bordeaux
H05-774	2.671	Black
H05-877	1.499	Bordeaux
H05-887	1.361	Bordeaux
H05-896	3.019	Black
H05-914	1.472	Bordeaux
H05-915	2.303	Black
H05-916	3.919	Black
H05-918	2.305	Black
H05-929	1.347	Bordeaux
H05-931	1.559	Bordeaux
H05-932	1.105	Bordeaux
ATCC14458	1.622	Bordeaux
ATCC25923	2.725	Black
ATCC29213	1.562	Bordeaux

*: congo red agar

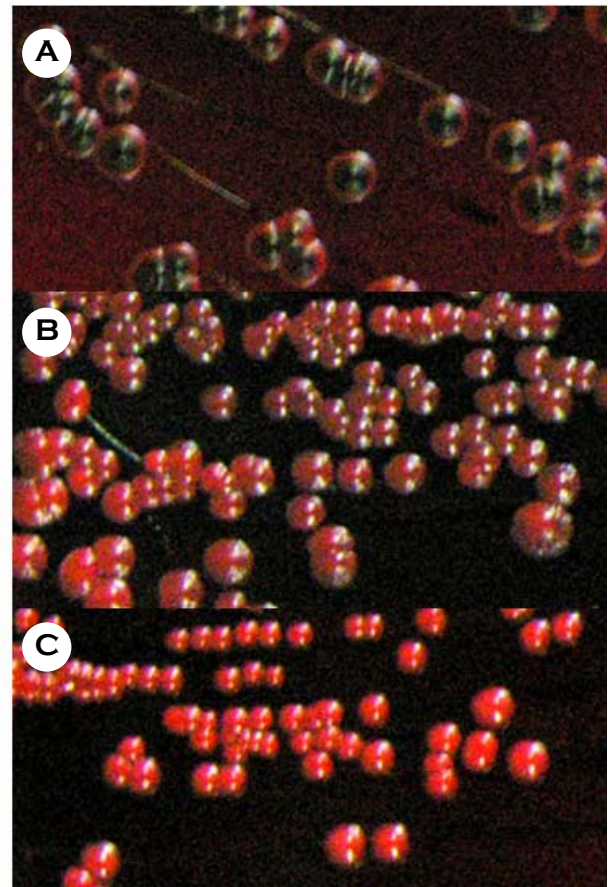


Figure 1. Detection of glycocalyx formation ability of *Staphylococcus aureus* isolated from bacteremia patients. *S. aureus* strains were cultured on the congo red plates for 24 hrs, and colony morphology was observed. (A) Black colonies of highly-slime-producing *S. aureus* H05-749. (B) Bordeaux colonies of moderate-slime-producing *S. aureus* H05-736. (C) Red colonies of non-slime-producing *S. aureus* H05-735.

시킨 후 disc 표면에 형성된 균막을 0.4% crystal violet으로 염색하였다. 정지배양과 진탕배양시 균막 형성능을 비교하기 위해서, conical tube에 disc를 고정시킨 후 균 배양액을 넣고 rotater (FINEPCR, Seoul, Korea)에서 20 rpm으로 회전배양하였다. 24시간 후에 균 배양액을 제거하고 새로운 배지를 첨가하면서 6일간 배양한 후 disc를 생리식염수로 조심스럽게 3회 세척하였다. Disc를 80에서 건조시킨 후 disc 표면에 형성된 균막을 0.4% crystal violet

Table 2. Minimum bactericidal concentration (MBC, µg/ml) of planktonic bacteria (PB) and biofilm-forming bacteria (BB) of *S. aureus* ATCC 25923

Antimicrobial agents	PB	BB
Clarithromycin	1	>2080
Cefotaxime	4	>2080
Cefmetazole	2	>2080
Erythromycin	4	>2080
Benzylpenicillin	2	>2080
Vancomycin	4	>2080

으로 염색하였다.

결 과

1. 균혈증 환자에서 분리된 황색포도알균의 균막 형성능
환자의 혈액에서 분리된 균주 17주와 표준균주 3주의

Table 3. Change of minimum bactericidal concentration (MIC, µg/ml) of biofilm-forming sessile *S. aureus* ATCC 25923 with the biofilm ages

Biofilm age (hours)	Antimicrobial agents					
	CAM	CTX	CMZ	EM	VCM	PCG
0	1	4	2	4	2	4
2	<256	<256	<256	<256	<256	<256
4	<256	<256	<256	<256	<256	<256
6	512	512	256	1024	512	512
8	2048	>4096	>4096	>4096	>4096	4096
10	>4096	>4096	>4096	>4096	>4096	>4096
24	>4096	>4096	>4096	>4096	>4096	>4096

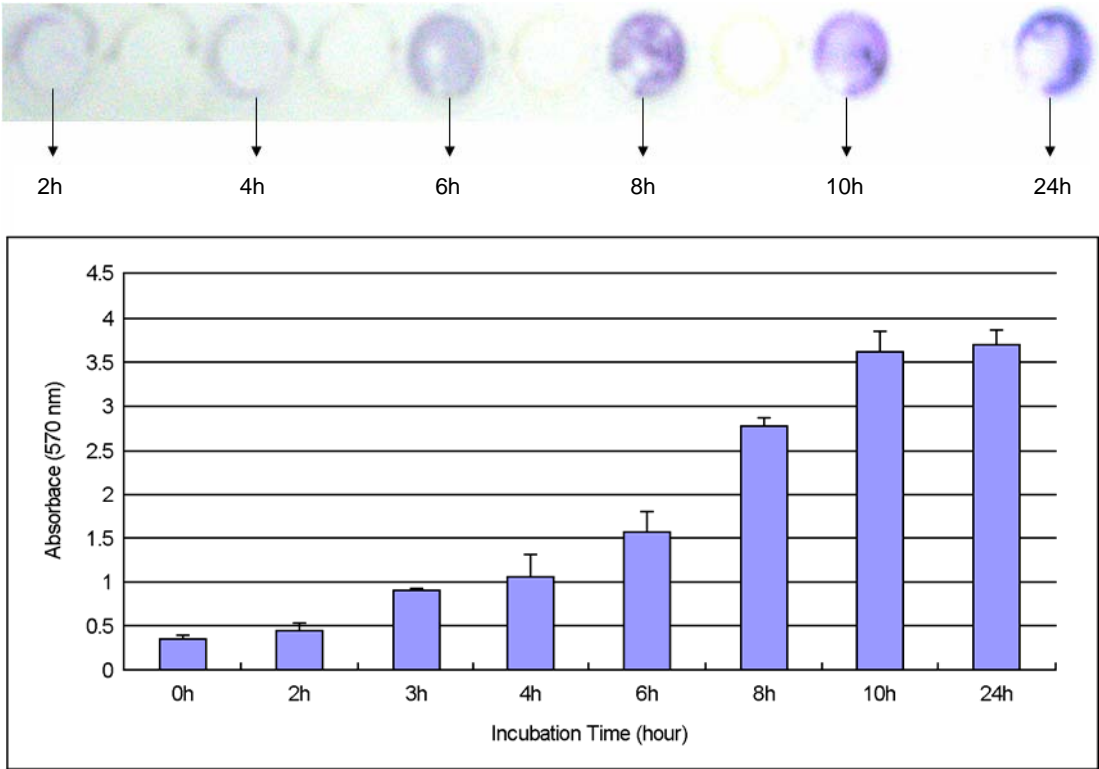


Figure 2. Biofilm formation kinetics of *S. aureus* ATCC 25923 in tryptic soy broth with 0.5% glucose. A photograph of typical crystal violet-stained biofilms is shown at top of the panel and spectrophotometric results are charted with respect to time at the bottom of the panel.

균막 형성능을 조사하였던 바, Table 1과 같은 결과를 얻었다. 환자에서 분리된 모든 균주가 균막을 형성하였으며, 특히 H05-749, H05-774, H05-896, H05-915, H05-916, H05-918과 표준균주 ATCC 25923에서는 570 nm에서의 흡광도가 2.3 이상으로 균막 형성능이 매우 높았다.

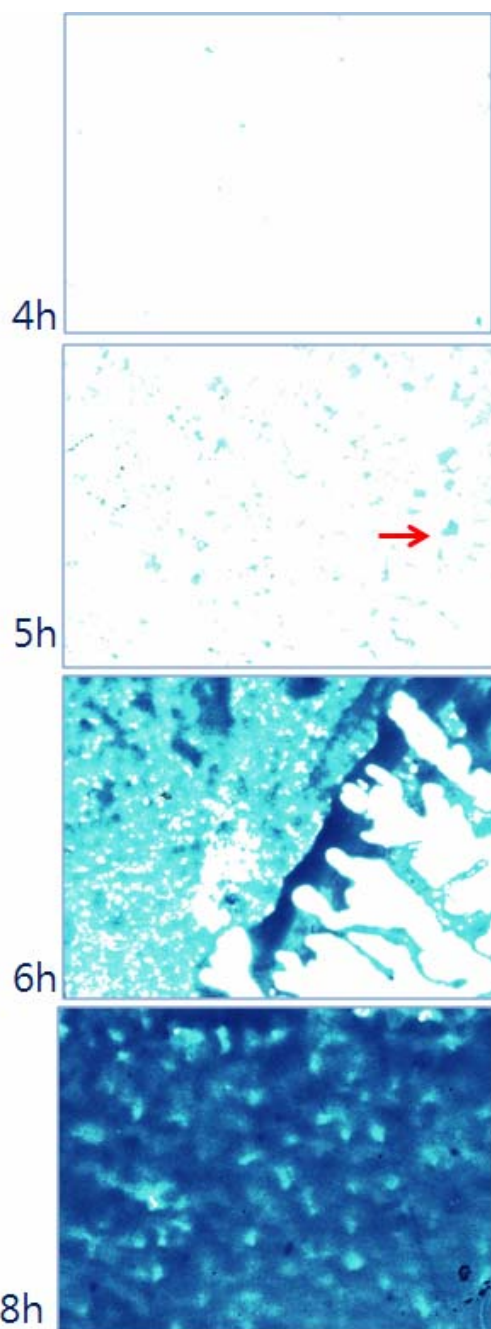


Figure 3. Microscopic photographs of *S. aureus* ATCC 25923 incubated on the plastic cover-slips for 4, 5, 6, and 8 hrs (100 × magnification). Arrow indicates the microcolony of *S. aureus*.

2. 분리균주의 당질층 생성능

황색포도알균의 균막 형성능은 다당류 (polysaccharide)로 이루어진 당질층의 생성능에 결정된다. 균혈증 환자에서 분리된 균주의 당질층 생성능을 CRA 배지에서 배양한 결과 균막 형성능이 우수한 균은 검은색의 집락을 보여 당질층의 생성을 확인할 수 있었다 (Fig. 1 및 Table 1). 낮은 균막 형성능을 보인 균주는 대부분 포도주색의 집락을 보이는 경향을 보였다.

3. 배지내 부유세균과 균막 형성균에 대한 각종 항균제의 MBC 비교

항균제 감수성 검사에 이용되는 표준균주 ATCC 25923이 균막이 형성된 경우, 각종 항균제에 대한 내성도의 변화를 비교하기 위해, 배지내 부유세균과 균막 형성균의 MBC를 비교하였던 바, Table 2와 같은 결과를 얻었다. 부유세균에 대한 CAM, CTX, CMZ, EM, PCG 및 VCM의 MBC는 1~4 µg/ml이었으나, 균막 형성균에 대한 MBC는 >2080 µg/ml으로 1,000배 이상 증가한 경향을 보였다.

4. 균막 형성 시간에 따른 균막 형성균의 내성도 변화

황색포도알균이 균막 형성 시간에 따라 균막 형성균에 대한 각종 항생제의 MBC를 조사하여 Table 3와 같은 결과를 보였다. 균막 형성 6시간 이후부터 각종 항균제에 대한 MBC가 256 µg/ml 이상으로 항균제에 대한 내성이 형성됨을 알 수 있었으며, 균막 형성 8시간 이후부터는 4096 µg/ml 이상의 MBC를 보였다.

균막 형성균의 내성도의 변화와 균막 형성과의 관계를 조사하기 위해 균막 형성 정도를 crystal violet으로 염색한 결과, Fig. 2와 같이 배양 6시간 후부터 균막이 형성됨

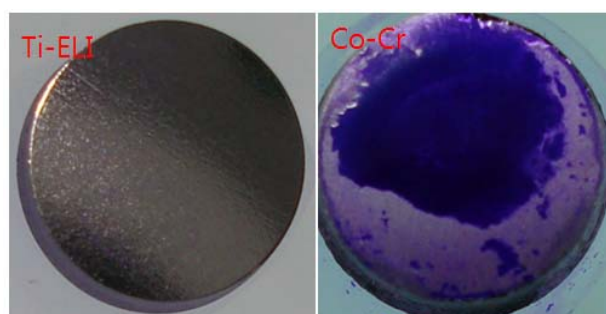


Figure 4. Microscopic photographs of biofilm of *S. aureus* ATCC 25923 incubated on the artificial bone surfaces for 24 hrs without shaking. Ti-ELI; titanium, Co-Cr; cobalt-chromium.

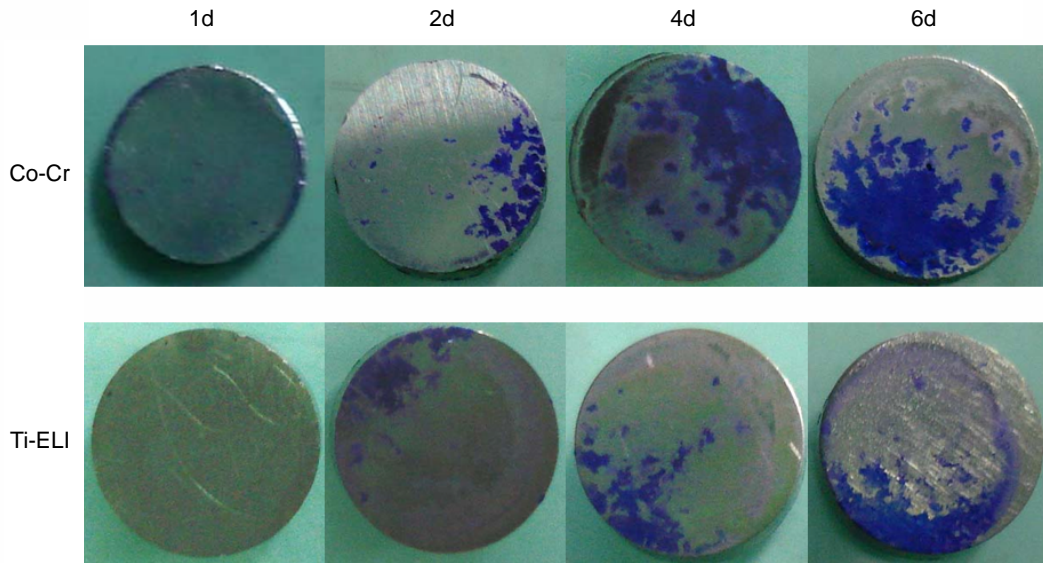


Figure 5. Microscopic photographs of biofilm of *S. aureus* ATCC 25923 incubated on the artificial bone surface for 1, 2, 4, and 6 days with shaking (3 × magnification).

을 관찰할 수 있었으며, 8시간 이후부터는 뚜렷한 균막 형성이 관찰되었다. 균막 형성 정도를 알기 위하여 crystal violet으로 염색된 균막을 ethanol-acetone으로 추출하여 570 nm에서 흡광도를 측정한 결과, 배양 시간에 비례하여 증가하는 양상을 보였으며 특히 8시간 이후에 2.5 이상으로 현저한 증가가 관찰되었다.

Plastic cover-slip에 형성된 균막을 crystal violet으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과, Fig. 3에서와 같이 5시간 이후에 plastic 표면에 세균이 부착한 이후 균 집락이 형성되기 시작하여 6시간 이후에는 표면 전반에 걸쳐 균막이 형성되었으며, 8시간 이후에는 매우 두꺼운 균막이 형성되었다.

5. 금속합금 disc 표면에 형성된 균막의 비교

인공관절의 주된 소재인 Ti-ELI와 Co-Cr을 8 mm의 disc로 만들어 균막이 형성되는 것을 정지배양과 회전배양하면서 비교하였다. 정지배양시에는 24시간 이후에 균막 형성이 관찰되었으며, 특히 Co-Cr의 표면에 뚜렷한 균막이 형성되었다 (Fig. 4). 회전배양시에는 2일 이후에 균막 형성이 관찰되기 시작하여 Ti-ELI보다는 Co-Cr의 표면에 보다 더 많은 균막 형성이 4일 이후부터 관찰되었다 (Fig. 5).

고찰

고관절 및 슬관절의 인공관절 치환술 이후 급성 및 만성 PJI에서 황색포도알균과 혈장응고효소 음성 포도알균이 자주 분리된다. 황색포도알균은 높은 이환율 및 사망률을 보이는 화농성 질환과 독소-매개성 질환을 유발하는 가장 독력이 강한 세균으로서 (21) 원내감염의 주요 원인균이다. 감염된 세균은 인공관절의 표면에 융합성의 균막내에서 성장하고 항균제에 내성을 보임으로써 항균제의 전신 투여에도 세균을 제거하기 매우 어렵다 (34).

최근 인공관절과 같은 인체내 삽입물과 연관된 심각한 고 정복할 수 없는 포도알균 감염증의 기전과 균막 구조에 대한 연구가 수행되어 보고되고 있다 (3,9,23). 포도알균이 인공생체물질의 표면에 부착하고 집락을 형성하는데 가장 중요한 인자는 다당체로 이루어진 점액층의 생성이다 (36). 황색포도알균에서 점액층은 *ica* 유전자에 의해 조절받아 생성된다고 한다 (6). Arslan과 Ozkardes (4)은 혈액, 요도관, 전비강 및 상처와 같은 임상검체에서 분리된 황색포도알균의 점액층 생성균 빈도는 약 30%이었다고 보고하였으며, Votava과 Woznicova (37)은 혈액에서 분리된 균주에서 약 56%에서 관찰되었다고 보고하였다.

본 연구에서는 혈액에서 분리된 황색포도알균 균주 17주 중 6주 (35%)에서 CRA에서 검은색 집락, 10주 (59%)에서 포도주색의 집락으로 약 94%에서 다당체로 이루어

진 점액층을 생성하는 균주로 다른 연구자의 보고보다 높은 경향이 있었지만, Fowler 등 (10)의 관절 치환술 수술 환자 및 균혈증 환자의 혈액에서 분리된 황색포도알균 모두에서 점액층을 생성한다는 보고와 일치하였다. 본 연구에서 혈액에서 분리된 균주 모두 균막을 형성하였으며, 특히 CRA에서 검은색 집락을 보인 균주는 다른 균주에 비해 균막의 형성능이 우수하였으며, Fowler 등 (10)의 보고에서도 혈액에서 분리된 균주 모두 균막을 형성한다는 보고와 일치하였다.

균막이 형성되는 과정은 먼저 부유세균이 인공생체물질의 표면에 접촉하여 부착하고, 부착된 세균에서 나온 분자신호 (molecular signal)에 의해 미세집락 (microcolony)으로 증식하여 다당체로 이루어진 점액층으로 둘러싸인 균막이 형성된다 (7). Stewart와 Costerton (35)은 다음과 같은 세 가지 기전에 의해 항균제에 내성이 생긴다고 보고하였다: 1) 균막내로의 항균제 투과성 감소; 2) 균막내의 화학적 미세환경 변화; 3) 균막내의 일부 세균의 형질변화이다. 황색포도알균에 의해 균막이 형성되면 유용한 여러 종류의 항균제에 대해 현저히 내성도가 증가하여, 시판내의 부유세균 보다 100~1,000배 이상 높은 MBC를 보이는 내성을 갖는다고 보고되고 있다 (2,5,26). 그러나 균막 형성이 시작되어 어느 시점부터 내성도가 급격히 증가하는지에 대한 연구보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 균막 형성시 내성도의 증가와 균막 형성과정과의 상호연관성을 조사하고자 하였다. 본 연구에서 부유세균에 대한 CAM, CTX, CMZ, EM, PCG 및 VCM의 MBC는 1~4 µg/ml이었으나, 균막 형성균에 대한 MBC는 >2080 µg/ml으로 1,000배 이상 증가하여 다른 연구자의 보고와 일치하였다. 또한 균막 형성 6시간 이후부터 각종 항균제의 MBC가 256 µg/ml 이상으로 항균제에 대한 내성이 형성되고 균막 형성 8시간 이후부터는 4096 µg/ml 이상의 MBC를 보였다. Amorena 등 (2)은 6시간 및 48시간 동안 균막을 형성시킨 이후 각종 항균제를 100 µg/ml 또는 500 µg/ml의 농도로 24시간 동안 처치한 이후 생존수를 측정한 결과 뚜렷한 세균의 감소를 관찰할 수 없다고 보고하였는데, 이는 본 연구의 결과와 유사하였다. 20-well plate에서 배양한 후 crystal violet으로 염색하여 균막 형성을 정량적으로 관찰한 결과, 6시간 이후 부터 균막 형성을 관찰할 수 있었으며, 8시간 이후부터는 뚜렷한 균막 형성이 관찰되었다. Plastic cover-slip에 형성된 균막을 crystal violet으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과,

5시간 이후에 plastic 표면에 세균이 부착한 이후 미세집락이 형성되기 시작하여 6시간 이후에는 표면 전반에 걸쳐 균막이 형성되었으며, 8시간 이후에는 매우 두꺼운 균막이 형성되었다.

고관절 및 슬관절의 인공관절 치환술 이후 포도알균에 의한 감염증은 인공관절 표면에 세균의 부착과 균막의 형성과 가장 밀접한 관계가 있다 (13). 일차적인 세균의 부착은 세균 표면의 전하 (charge) 및 소수성 (hydrophobicity)과 같은 인자에 영향을 받는 비특이적이며 비가역적인 상호작용과 세균의 부착소 (adhesin)나 fibronectin binding protein이나 fibrinogen binding protein과 같은 혈청내의 부착단백에 의해 매개되는 특이적인 상호작용에 의해 일어난다. 그러나 인공관절에 사용되는 소재에 따른 황색포도알균의 균막 형성능과의 상호관계에 대한 연구보고는 접하기 어렵다. Olson 등 (27)은 PMMA, Co-Cr, titanium 및 stainless steel 표면에서의 다당체 형성 피루포도알균의 부착능을 비교하였던 바, stainless steel의 표면에 가장 많은 세균이 부착하였으며, 다음으로는 Co-Cr, titanium, PMMA의 순이었다고 보고하였다. 또 다른 연구에서는 Ramage 등 (30)은 황색포도알균은 PMMA 보다 titanium 표면에 균막의 형성이 낮다고 보고하였다. 본 연구에서 인공관절의 소재로 많이 사용되는 titanium과 Co-Cr의 표면에 황색포도알균의 균막 형성을 비교한 결과는 24시간 정지배양시에는 titanium보다 Co-Cr의 표면에 뚜렷한 균막이 형성되었으며, 회전배양시에는 2일 이후에 균막 형성이 관찰되기 시작하여 titanium보다는 Co-Cr의 표면에 보다 더 두꺼운 균막 형성이 4일 이후부터 관찰되어 Olson 등 (27)의 결과와 일치하였다.

이상의 연구 결과에서 titanium 합금을 사용한 인공관절을 사용한 경우는 Co-Cr 합금을 사용한 인공관절 경우보다 PJI의 발생 가능성이 더 적다고 유추할 수 있으며, PJI의 발생을 줄이는 측면에서는 인공관절 표면에서의 황색포도알균의 균막 형성을 최소화하기 위해서는 Co-Cr 보다 titanium 합금소재가 우수하다고 생각된다. 또한 황색포도알균이 부착한 후 미세집락이 형성된 이후 균막이 형성되는 시점 (균부착 6~8시간 이후)이 항균제에 대한 내성이 생기는 시점으로 추측되었다. 본 연구에 있어 추가적으로 전자현미경 또는 confocal laser microscopy에 의한 균막의 미세구조나 균막 두께와 항균제 내성도와와의 상호관계에 대한 연구와 인공관절 표면에서의 균막 형성 억제 방법에 대한 연구가 이루어져야 한다고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Akiyama H, Hamada T, Huh WK, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W, Iwatsuki K: Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* **148**: 526-532, 2003.
- 2) Amorena B, Gracia E, Monzn M, Leiva J, Oteiza C, Prez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J: Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* **44**: 43-55, 1999.
- 3) An YH, Friedmann RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* **43**: 338-348, 1998.
- 4) Arslan S, Ozkardes F: Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**: 29-33, 2007.
- 5) Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* **37**: 1771-1776, 1999.
- 6) Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F: The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433, 1999.
- 7) Dasgupta MK, Larabie M: Biofilms in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **21**: S213-217, 2001.
- 8) Fedtke I, Gtz F, Peschel A: Bacterial evasion of innate host defenses: the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int J Med Microbiol* **294**: 189-194, 2004.
- 9) Foster J, McDevitt D: Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials, pp 31-43. In *Infection associated with indwelling medical devices*, 2nd ed, Bisno AL and Waldvogel FA (Ed), American Society for Microbiology, Washington D.C., 1994.
- 10) Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME: The intercellular adhesin 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, 2001.
- 11) Freeman DJ, Falkiner RF, Keane CT: New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol* **42**: 872-874, 1989.
- 12) Gallo J, Kolar M, Florschütz AV, Novotný R, Pantucek R, Kesselova M: *In vitro* testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Bio-med Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **149**: 153-158, 2005.
- 13) Götz F: Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378, 2002.
- 14) Greenberg DP, Bayer AS, Cheung AL, Ward JI: Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to *Staphylococcus aureus* in an infant rat model. *Infect Immun* **57**: 1113-1118, 1989.
- 15) Harris WH: Conquest of a worldwide human disease: particle-induced periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* **429**: 39-42, 2004.
- 16) Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M: Insertional inactivation of *Eap* in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* **70**: 2933-2940, 2002.
- 17) Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirliff ME: Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1463-1469, 2006.
- 18) Jahoda D, Sosna A, Landor I, Vavřík P, Pokorný D, Hudec T: Two-stage reimplantation using spacers-the method of choice in treatment of hip joint prosthesis-related infections. Comparison with methods used from 1979 to 1998. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* **70**: 17-24, 2003.
- 19) Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P, Höök M: Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* **18**: 211-223, 1999.
- 20) Krbec M, Čech O, Džupa V, Pacovský V, Klézl Z: Infection complications of total hip arthroplasty. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* **71**: 179-188, 2004.
- 21) Lowy FD: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520-532, 1998.
- 22) Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gastra W: Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 326-332, 2006.
- 23) Montanaro L, Arciola CR: Studying bacterial adhesion to irregular or porous surfaces, pp 331-343. In *Handbook of*

- bacterial adhesion: principles, methods and applications, An YH and Friedmann RJ (Ed), Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2000.
- 24) **Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ:** Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* **24**: 1829-1831, 2003.
- 25) **Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H:** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J Orthop Sci* **11**: 46-50, 2006.
- 26) **Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR:** Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* **66**: 86-92, 2002.
- 27) **Olson ME, Garvin KL, Fey PD, Rupp ME:** Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is augmented by PIA. *Clin Orthop Relat Res* **451**: 21-24, 2006.
- 28) **Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham RP:** Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **271**: 15803-15809, 1996.
- 29) **Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M:** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585-617, 1994.
- 30) **Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR:** Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials* **24**: 3221-3227, 2003.
- 31) **Scott CP, Higham PA, Dumbleton JH:** Effectiveness of bone cement containing tobramycin. *J Bone Joint Surg Br* **81**: 440-443, 1999.
- 32) **Shirliff ME, Mader JT:** Osteomyelitis: clinical features and molecular aspects of persistence. pp 375-395. *In* Persistent bacterial infections, Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S (Ed), ASM Press, Washington, D.C. 2000.
- 33) **Steckelberg JM, Osmon DR:** Prosthetic joint infections. pp 173-179. *In* Infections associated with indwelling medical devices, Waldvogel FA, Bisno AL (Ed), ASM Press, Washington, D.C., 2000.
- 34) **Stewart PS:** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**: 107-113, 2002.
- 35) **Stewart PS, Costerton JW:** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138, 2001.
- 36) **Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB:** Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **157**: 713-722, 1988.
- 37) **Votava M, Woznicová V:** Production of slime by staphylococcal isolates from blood cultures. *Cent Eur J Public Health* **8**: 18-20, 2000.
- 38) **Wahlig H, Dingeldein E:** Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* **51**: 49-56, 1980.
- 39) **Wright RJ, Sledge CB, Poss R, Ewald FC, Walsh ME, Lingard EA:** Patient-reported outcome and survivorship after Kinemax total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* **86**: 2464-2470, 2004.