

Different Responses of MSSA and MRSA to Oxacillin of Their Respective MICs

Jong-Soon Jung¹, Woon-Seob Shin¹, Soo-Ki Kim^{2,3} and Yoon-Sun Park^{1*}

¹Department of Microbiology, Kwandong University College of Medicine, Gangneung, Korea;

²Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea;

³Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea

All of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains exhibit resistance to oxacillin by producing PBP2a encoded by *mecA*, whereas methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains do not. To investigate phenotypic differences other than oxacillin resistance level in responses to oxacillin between MSSA and MRSA, we compared alterations of viability and ultrastructure of MSSA by oxacillin treatment with those of MRSA. When MSSA and MRSA strains were exposed to oxacillin of their respective MICs, and then were assayed for viability and observed by transmission electron microscope, increase in thickness of cell wall was more prominent in MRSA strains than in MSSA strains, while decrease in number of surviving cells was more evident and change in morphology of growing cross wall was greater in MSSA strains than in MRSA strains. It is assumed that these different responses to oxacillin between MSSA and MRSA strains may be due to activation of some PBP2a unbound to oxacillin. In conclusion, MSSA and MRSA showed different functional and morphological responses to oxacillin, although they were treated with oxacillin of concentrations that respectively inhibit their proliferation.

Key Words: MSSA, MRSA, Oxacillin, PBP2a

서 론

황색포도알균 (*Staphylococcus aureus*)은 인체의 각 부위에서 경증 및 중증 감염을 모두 일으킬 수 있는 주요 병원균이며, 그 중 methicillin 내성 황색포도알균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)은 원내 감염을 유발하는 가장 흔한 원인균 중 하나로 잘 알려져 있다 (1). MRSA는 methicillin 뿐만 아니라 oxacillin, nafcillin, cloxacillin 등과 같은 페니실린 분해효소 내성 페니실린 (penicillinase-resistant penicillin, PRP)에 대해서 내성을 나타내는 모든 황색포도알균을 일컬으며, 황색포도

알균에 의한 감염증에 methicillin이 사용되기 시작한 이듬해인 1961년부터 PRP에 대한 내성을 갖는 황색포도알균이 분리되기 시작했다 (2~4).

MRSA가 methicillin과 같은 PRP에 대해서 내성을 나타내는 가장 기본적인 기전은 약물이 결합하는 표적의 친화력 감소이다. 즉 MRSA는 PRP를 포함한 베타 락탐 계열의 항균제들과의 결합력 (binding affinity)이 매우 낮은 수용체인 PBP2a (penicillin-binding protein 2a)를 생산함으로써 베타 락탐 항균제의 영향을 받지 않고 증식을 계속할 수 있다 (5~7). PBP2a (또는 PBP2'이라고도 불림)는 MRSA의 염색체 상에 존재하는 *mecA* 유전자에 의해서 발현되며, *mecA*를 포함하고 있는 염색체 상의 이동성 유전자 부분을 SCC_{mec} (staphylococcal cassette chromosome *mec*)이라 부른다 (8). MRSA의 methicillin 내성 발현과 연관된 또 다른 인자로서 *fem* (factor essential for the expression of methicillin resistance) 유전자 (9), *lrm* (lipophilic protein which affects bacterial lysis rate and methicillin

Received: August 21, 2009/ Revised: September 17, 2009

Accepted: September 24, 2009

*Corresponding author: Yoon-Sun Park. Department of Microbiology Kwandong University College of Medicine, 522 Neagok-Dong, Gangneung, 210-701, Korea.

Phone: +82-33-649-7462, e-mail: pyskth@kd.ac.kr

resistance level) 유전자 (10) 및 *fnt* 유전자 (11)가 발견되었으며, 이들은 모두 peptidoglycan 대사에 관여하는 유전자로서 이들이 없는 균주에서는 *mecA* 유전자가 존재하더라도 methicillin에 대한 내성이 발현되지 않았다. 그러나 이들은 MRSA에서 뿐만 아니라 methicillin 감수성 황색포도알균 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)에서도 발견되었으며, *mecA* 유전자 없이 단독으로는 내성을 나타내지 못하므로 *aux* (auxiliary) factor라 부른다.

MSSA는 MRSA와 상대적인 의미로 PRP에 대해서 감수성을 보이는 황색포도알균을 지칭한다. 그러나 *mecA*의 존재가 알려진 이후로 엄밀한 의미에서의 MSSA는 *mecA*가 존재하지 않는 황색포도알균을 의미한다. 따라서 MRSA와 MSSA를 구분하는 기준은 *mecA*를 포함하고 있는 SCCmec의 존재 여부이다. 이러한 유전형의 차이로 인해 MRSA는 PRP에 대해서 내성을 보이고, MSSA는 감수성을 보이는 표현형의 차이가 나타난다. 그러나 MRSA는 PRP에 대해서 내성을 나타내고 MSSA는 내성을 나타내지 않는다는 단순한 차이 이외에, PRP 내성과 관련된 표현형에 있어서 두 균주 간의 다른 차이에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 *mecA*를 갖고 있는 MRSA와 *mecA*가 없는 MSSA가 PRP에 대한 반응에 있어서 표현형의 구체적인 차이, 즉 PRP에 대한 반응의 기능적 및 형태적 차이를 알아보고자 했다. 이를 위해 MSSA와 MRSA 균주를 각각의 최소 억제 농도의 oxacillin으로 처리한 다음, MSSA와 MRSA간의 oxacillin에 대한 생존 능력의 차이 및 미세구조 변화의 차이를 조사하여 비교하였다.

재료 및 방법

실험 균주

서울 및 강원도 소재 대학병원의 환자들로부터 분리되어 황색포도알균으로 동정된 총 79주의 균주를 대상으로 *mecA* 유전자를 확인한 결과, 67주에서 *mecA* 유전자가 검출되었으며 나머지 12주에서는 *mecA* 유전자가 음성으로 확인되었다. *mecA*가 양성인 67주의 oxacillin에 대한 최소 억제 농도를 측정하고 그것이 1024 µg/ml인 29주 중에서 5주를 임의로 선택하여 본 실험의 고도 내성 MRSA로 사용하였으며, 마찬가지로 *mecA*가 음성인 12주 중에서 oxacillin에 대한 최소 억제 농도가 0.5 µg/ml인 5

주를 임의 선택하여 MSSA로 사용하였다.

증식 속도의 측정

위에서 선택한 시험 균주들을 TSB (tryptic soy broth)에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양한 뒤, 새로운 TSB (50 ml)에 600 nm에서의 흡광도가 0.02가 되도록 접종하여 배양을 시작하였다. 배양 기간 중 90분마다 균주의 일부를 취하여 UV-spectrophotometer로 흡광도를 측정하였으며, 각 균주 당 2회씩의 실험 후 MSSA와 MRSA에 대한 각각의 증식 곡선 (growth curve)을 작성하였다.

Oxacillin에 대한 생존 능력 측정

성장 곡선에 의해 정해진 대수증식기 (log phase)에 각 균주들의 최소 억제 농도 (MSSA, 0.5 µg/ml; MRSA, 1024 µg/ml)에 해당되도록 oxacillin을 첨가하여 MSSA와 MRSA 균주들을 배양하며, 90분마다 배양중인 균주의 일부를 취하고 희석하여 oxacillin이 포함되지 않은 평판 배지에 각각 도말하였다. 이들을 35°C에서 24시간 배양한 다음, 각각의 평판 배지에 생긴 집락 수를 계수하여 살아 있는 세균의 수 (CFU, colony forming unit)로 나타냈다.

투과전자현미경을 이용한 관찰

배양 및 고정

시험균을 TSB에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양한 후, 최종 농도가 600 nm에서 0.02의 흡광도가 되게 신선한 TSB에 접종하였다. 각 균주들을 4.5시간 동안 배양하여 대수증식기에 도달했을 때, MSSA 균주들은 0.5 µg/ml의 농도가 되도록 oxacillin을 처리하고 MRSA 균주들은 1024 µg/ml의 농도로 oxacillin을 처리하여 3시간 동안 항균제의 영향을 받도록 배양하였다. 전 고정은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)를 사용하여 만든 2.5% glutaraldehyde를 배지의 양과 동일한 양으로 넣어준 후, 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 다음날 지나친 고정을 막기 위해 phosphate buffer로 30분 (10분, 3회)간 씻어 주고 3000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하여 균주의 pellet을 얻었다. 후 고정에 들어가지 전, 형성된 pellet이 부서지는 것을 막기 위해 2% agar를 이용하여 agar block을 만들었다. 후 고정은 0.1 M phosphate buffer에 1%로 녹여 만든 osmium tetroxide를 사용하여 30분 동안 처리하였고, phosphate buffer를 이용하여 3회 이상 씻어 주었다. 고정의 마지막 단계로 1% uranyl acetate를 이용하여

2시간 동안 Enblock staining을 실시하였다.

탈수 및 포매

고정이 끝난 시료들은 수분을 제거하기 위해 탈수를 시행하였다. 탈수 과정은 50% 에탄올부터 70%, 80%, 90%, 95%의 에탄올 (각각 20분, 1회)을 차례로 처리하였고, 마지막으로 100% 에탄올 (30분, 3회)을 사용하였다. 에탄올 처리 후에는 propylene oxide (20분, 2회)로 처리해 주었다. 포매 과정은 포매제인 epon이 천천히 잘 스며들게 하기 위해서 단계적으로 실시하였다. Propylene oxide와 epon을 1:1의 비율 (1시간)에서 시작하여 epon의 비율을 점차 높여 1:2의 비율로 하룻밤 동안 방치한 후, 다음 날 100% epon mixture에 2시간 정도 두었다가, 마지막으로 탈수가 끝난 시료를 젤라틴 캡슐에 심고 다시 100%의 신선한 epon mixture를 부어 64℃의 건조기에서 24시간 동안 방치하여 굳게 하였다.

절편제작 및 염색

굳힌 epon block을 초박절편기 (EM UC6, Leica Mikrosysteme GmbH, Vienna, Austria)에 유리칼을 부착하여 가로 세로 1 mm 정도의 사각형으로 다듬은 후에, 다이아몬드 나이프를 이용하여 80~90 nm 두께의 절편을 얻고, 완전히 말려서 전자 염색 과정에 들어갔다. 전자 염색은 먼저 5% uranyl acetate로 10분간 염색한 후 70% 에탄올로 깨끗이 씻어주고 다시 lead citrate액으로 5분간 염색하였다. 그리고 CO₂ 제거 증류수로 여러 번 수세한 후 건조시켰다. 염색 후 건조된 그리드를 60~80 kv 상태의 투과전자현미경 (LEO 906, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany)에서 77500배의 배율로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

통계 분석

MSSA와 MRSA 균주들의 oxacillin 처리에 의한 세포 벽과 cross wall 두께의 변화는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였다.

결 과

MSSA와 MRSA의 증식 곡선

실험 대상 균주들의 증식 속도와 대수증식기 및 정지기 (stationary phase)에 이르는 시간을 알아내고 각 균주들에 대한 oxacillin 처리 시기를 결정하기 위해 성장 곡선을 작성하였다 (Fig. 1). MSSA와 MRSA 모두 연속적인

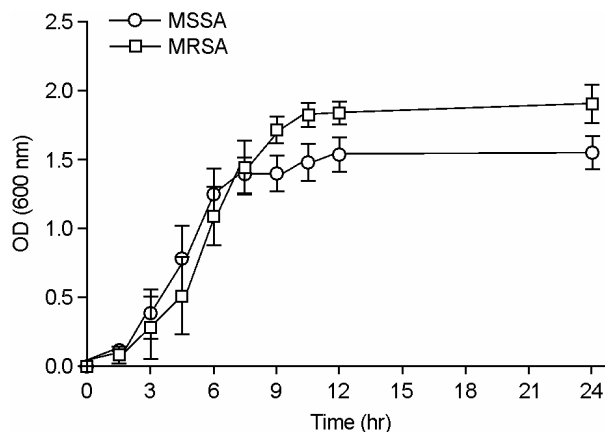


Figure 1. Growth curves of MSSA and MRSA strains.

계대 배양으로 인해 균주 증식을 위한 적응기인 유도기 (lag phase)는 두 그룹 모두에서 짧았으며, 처음 접종 후 세 시간 이전에 대수증식기로 들어갔다. MSSA 균주들은 대수증식기가 접종 후 6시간 정도까지 지속되다가 정지기로 들어갔으나, MRSA 균주들은 MSSA 균주들에 비해서 대수증식기가 3시간 정도 더 유지되었다. 또한 MRSA 균주들은 대수증식기에서의 증식 속도 (growth rate)도 MSSA 그룹에 비해서 더 빠른 경향을 보였으나 오차범위가 일부 겹쳐 통계적인 의미는 없었다 (Fig. 1). 정지기에서의 균주 수도 Fig. 1에서는 MRSA가 MSSA에 비해서 더 많은 것으로 나타났으나, Fig. 2에서는 MSSA와 MRSA간의 균주 수에 차이가 없는 것으로 나타났다.

Oxacillin에 대한 MSSA와 MRSA의 생존 능력의 차이

위의 증식 곡선을 이용하여 각 균주들에 대한 oxacillin의 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 예상되는 시간을 배양 시작 후 4.5시간으로 결정하였다. 각 균주들을 각각의 최소 억제 농도로 처리한 다음 90분마다 균주들을 희석하여 평판 배지에 도말하고 배양하였다. 배양 후 집락 수를 세어 균주의 희석 배수를 곱하고 지수 값을 취하여 결과를 산출하였다 (Fig. 2). MSSA와 MRSA 균주들 모두에서 각각의 최소 억제 농도의 oxacillin에 의해 증식이 억제되는 현상이 관찰되었으나, 각각의 최소 억제 농도에서는 두 그룹 모두에서 살아 있는 균주의 수가 많아 oxacillin이 강력한 살균 효과 (bactericidal effect)를 나타내지는 못하였다. 그러나 각각의 최소 억제 농도의 oxacillin을 처리했음에도 불구하고, MRSA 균주들은 MSSA 균주들과 비교했을 때 살아 있는 균주의 수가

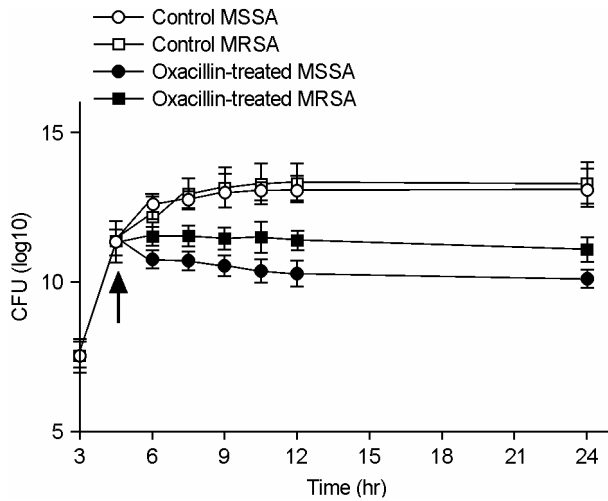


Figure 2. Viability of MSSA and MRSA against oxacillin. Oxacillin of their respective MICs (MSSA, 0.5 $\mu\text{g/ml}$; MRSA, 1024 $\mu\text{g/ml}$) was added at 4.5 h (arrow).

상대적으로 더 많아 최소 억제 농도의 oxacillin에 대해서 더 큰 저항성을 보여주었다.

Oxacillin에 의한 MSSA와 MRSA의 미세구조 변화의 차이

MSSA와 MRSA 균주들을 각각의 최소 억제 농도에 해당하는 oxacillin으로 처리한 다음 세포의 미세구조 변화를 투과전자현미경으로 관찰하였다. 주로 세포벽과 세포분열 시 형성되는 cross wall의 두께와 특이적 형태에 초점을 맞추어 관찰하였으며, 이 부위들은 oxacillin의 공격 목표가 되는 부위이기 때문에 가장 많은 변화가 나타났다. Oxacillin 처리 시기를 대수증식기와 정지기로 나누어 결과를 비교하였으나 MSSA와 MRSA 균주 모두 처리 시기에 따른 차이는 보이지 않았으므로, 대수증식기에 oxacillin을 처리한 결과를 기준으로 MSSA와 MRSA의 변화의 차이를 비교하였다.

우선 세포벽의 경우 oxacillin 처리 여부와 관계없이 MRSA 균주들의 세포벽이 MSSA 균주들의 세포벽보다 대체적으로 두꺼웠다 (Fig. 3, Fig. 4, Table 1). 세포벽 바깥 표면의 형태에서도 MSSA 균주들은 표면이 매끈하고 세포벽 주변이 깨끗하였으나, MRSA 균주들은 세포벽 표면이 거칠고 주변에 섬유성 물질 (filamentous material)들이 많이 관찰되었다. Oxacillin을 처리한 MSSA 균주들의 세포벽은 oxacillin을 처리하지 않았을 때의 세포벽과 두께의 차이가 거의 없었으며 세포벽 표면의 변화도 나타나

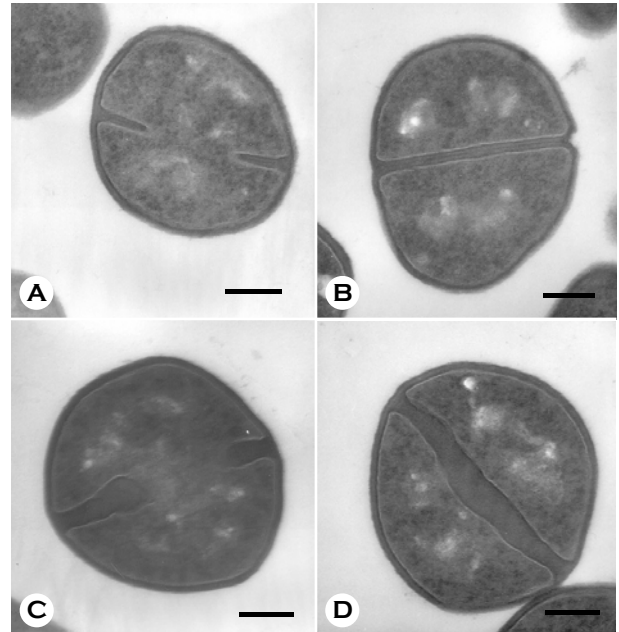


Figure 3. Electron micrographs of MSSA grown in the absence (A, B) or presence (C, D) of oxacillin of its MIC (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 180 min. Bars = 260 nm.

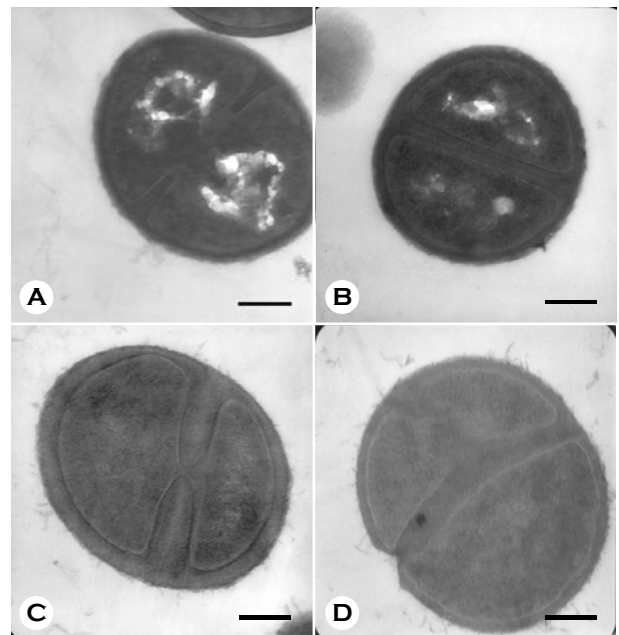


Figure 4. Electron micrographs of MRSA grown in the absence (A, B) or presence (C, D) of oxacillin of its MIC (1024 $\mu\text{g/ml}$) for 180 min. Bars = 260 nm.

지 않았으나 (Fig. 3, Table 1), MRSA 균주들은 oxacillin 처리에 의해 세포벽의 두께가 2배 정도 두꺼워졌으며 세

Table 1. Comparison of MSSA and MRSA in ultrastructure observed by transmission electron microscope

	MSSA		MRSA	
	Control	Oxacillin-treated	Control	Oxacillin-treated
Thickness of cell wall	32.2±7.3	32.8±8.3	41.9±5.4	85.7±10.4*
Thickness of cross wall	35.2±10.2	133.6±31.4*	62.0±10.2	167.1±20.7*
Surface of cell wall	Smooth surface	Not changed	Rough surface	Rougher surface
Shape of cross wall	Thin and cone-shaped	Thick and club-shaped	Thin and cone-shaped	Thick and cone-shaped
Center of cross wall	Obvious splitting system	Obscure splitting system	Obvious splitting system	Obscure splitting system

* $p < 0.05$ compared with their respective controls

포벽 표면은 더욱 거칠어지고 섬유성 물질이 더 많이 관찰되었다 (Fig. 4, Table 1).

딸세포 (daughter cell)를 만들어 내는 분열 과정에서 나타나는 성장 중인 cross wall의 형태 변화에서도 oxacillin을 처리한 MSSA 균주들과 MRSA 균주들 사이의 차이점이 발견되었다. Oxacillin을 처리하지 않은 MSSA 균주들의 경우 cross wall이 정상적으로 가늘게 형성된 것이 관찰되었고, 딸세포로의 분열 시에 분기점이 되는 splitting system이 까만 색 줄로 뚜렷하게 나타나 정상적인 분열이 일어나고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3A). 반면 oxacillin을 처리한 MSSA 균주들의 cross wall은 두꺼운 곤봉 모양 (club-shaped)의 비정상적인 형태로 자라는 것을 확인하였다 (Fig. 3C). Oxacillin을 처리하지 않은 MSSA 균주들의 cross wall 가운데 부분에서 관찰할 수 있었던 splitting system도 oxacillin 처리 MSSA 균주에서는 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 3C). MRSA 균주들에서도 oxacillin을 처리하지 않았을 때에는 정상적인 cross wall의 성장과 함께 가늘고 치밀하며 잘 발달된 splitting system이 관찰되었으며, MSSA 균주들의 cross wall과 비교해서 별다른 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4A). 그러나 oxacillin 처리 MRSA 균주들의 cross wall은 oxacillin을 처리하지 않았을 때와 비교하여 비정상적으로 두꺼워져 있었으며, 형태에 있어서는 oxacillin 처리 MSSA 균주들에서 관찰되었던 곤봉 모양과는 다른 원추 모양 (cone-shaped)의 형태를 취하고 있었다 (Fig. 4C). 즉 MRSA 균주들에서 oxacillin 처리에 의한 cross wall의 형태적인 변화가 MSSA에 비해서 상대적으로 더 작게 나타났다. 그러나 MRSA 균주들 역시 oxacillin 처리 시에는 splitting system이 관찰되지 않았다 (Fig. 4C). 또한 cross wall이 완전히 융합된 후에도 딸세포들이 분리되지 못하고 다음 분열지점에서

다시 cross wall이 형성되는 형태인 pseudomulticell이 발견되었는데, 이런 형태는 oxacillin 처리 MSSA 균주들에서보다 oxacillin 처리 MRSA 균주들에서 훨씬 더 많은 빈도로 관찰되었다.

완전히 융합이 이루어진 cross wall의 형태를 비교해 보면, oxacillin을 처리하지 않은 MSSA 균주의 경우 cross wall이 가늘게 하나로 융합되어 있었고 내부에 일렬로 늘어선 검은 직선 형태의 splitting system이 관찰되었다 (Fig. 3B). Oxacillin 처리 MSSA 균주의 곤봉 모양 cross wall은 곧게 자라지 못하고 굴곡을 형성하면서 융합되는 모습이었으며, cross wall의 두께는 oxacillin을 처리하지 않은 대조군 균주에 비해서 3배 이상 두꺼워져 있었고, 세포분열 시 필요한 splitting system은 관찰되지 않았다 (Fig. 3D). MRSA 균주에서도 oxacillin 처리에 의해 cross wall의 두께가 2배 이상 두꺼워졌으며, splitting system 역시 뚜렷하게 관찰되지 않았다 (Fig. 4D). 그러나 oxacillin 처리 MRSA 균주들의 cross wall의 융합은 oxacillin 처리 MSSA 균주들에 비해 굴곡이 거의 없이 완만하게 형성되었다 (Fig. 4D). 이상의 결과를 바탕으로, 투과전자현미경 하에서 관찰된 MSSA와 MRSA의 oxacillin 처리에 의한 형태적인 변화를 간략하게 도식화하여 나타냈다 (Fig. 5).

고 찰

MSSA 균주의 세포막에는 다섯 종류의 페니실린 결합 단백질 (PBP1, PBP2, PBP3, PBP3' 및 PBP4)이 존재하며 (12), 이들 PBP들은 peptidoglycan 합성 과정에서 transpeptidase, endopeptidase, 및 carboxypeptidase로서의 기능을 수행한다 (13, 14). 이들 중 PBP1, PBP2, 및 PBP3은 조건 치사 돌연변이주 (conditional lethal mutants)를 이용한

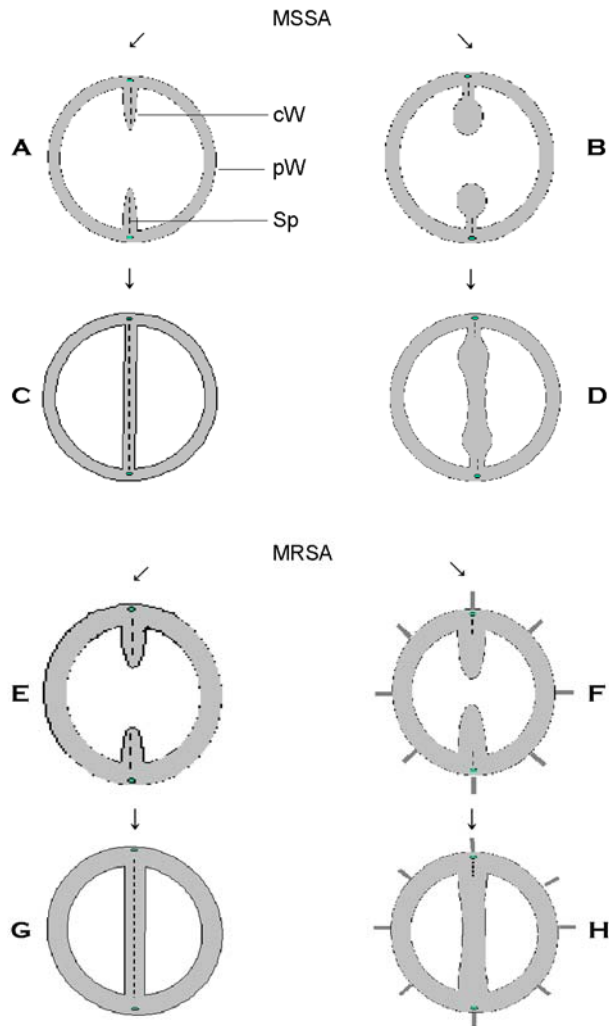


Figure 5. Schematic diagram of alteration in cell wall and cross wall of MSSA and MRSA treated with oxacillin of their respective MICs. A, C, E, and G are control cells, and B, D, F and H are oxacillin-treated cells. cW, cross wall; pW, peripheral cell wall; Sp, splitting system.

연구에서 황색포도알균의 증식과 생존을 위해 필수적인 효소로 밝혀졌으나, 나머지 PBP들은 위의 PBP들과 동일한 기능을 수행함에도 불구하고 황색포도알균의 생존에 반드시 필요하지는 않은 것으로 알려져 있다 (15). MRSA의 세포막에는 위의 페니실린 결합 단백질 외에도 *mecA* 유전자에 의해 발현되는 PBP2a라는 효소가 존재하는데, 이 PBP2a의 발현이 본 실험에서 MSSA와 MRSA 간의 oxacillin에 대한 반응의 차이에 영향을 미친 가장 중요한 요인일 것으로 생각된다.

MSSA와 MRSA를 각각의 최소 억제 농도의 oxacillin으로 처리했을 때, MRSA가 MSSA에 비해 더 많은 수의

세포가 살아남은 결과 (Fig. 2)는 MRSA에만 존재하는 PBP2a의 역할 때문일 것으로 추측된다. 최소 억제 농도의 oxacillin에 노출된 MSSA는 세포막에 존재하는 모든 PBP들이 oxacillin과 결합함으로써 peptidoglycan의 합성이 이루어지지 않는 동시에 자가분해효소 (autolytic enzyme)인 murein hydrolase가 활성화되어 peptidoglycan의 분해가 이루어지는데 반해, MRSA의 경우에는 PBP2a가 발현되어 있는 여러 세포들 중에서 oxacillin이 결합되지 않은 세포도 상당수 존재할 것으로 추측된다. 물론 본 실험에 사용된 MRSA들의 최소 억제 농도가 매우 고농도 (1024 $\mu\text{g/ml}$)이므로 많은 수의 MRSA 세포들에서 PBP2a가 oxacillin에 결합됨으로써 peptidoglycan의 합성이 억제되고 자가분해효소가 활성화되었을 것이다. 그러나 MSSA에서는 PBP2a가 전혀 발현되지 않는다는 사실을 고려할 때, 살아남은 세포의 비율이 MSSA에서 보다 MRSA에서 더 높게 나온 실험 결과는 PBP2a의 존재로 설명이 가능할 것으로 생각된다.

이러한 설명은 oxacillin에 노출된 MSSA와 MRSA의 투과전자현미경 사진에도 적용시킬 수 있다. Oxacillin 처리 MSSA는 oxacillin을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 세포벽의 두께와 모양은 거의 변하지 않았으나 세포 분열의 필수적 단계인 cross wall의 형성 과정에서 현저한 형태적 변화를 보였다 (Fig. 3, Table 1). 즉, 성장중인 cross wall의 모양이 oxacillin 처리에 의해 곤봉 모양으로 변했으며, cross wall의 두께가 대조군에 비해 현저하게 두꺼워지고 splitting system이 관찰되지 않았다. 반면 oxacillin 처리 MRSA는 대조군에 비해 세포벽의 두께가 현저하게 두꺼워졌으나, 대조군과 비교한 cross wall의 형태 변화는 MSSA에서의 변화와 비교하여 상대적으로 작은 변화를 나타냈다 (Fig. 4, Table 1). 즉, oxacillin 처리 MRSA의 성장중인 cross wall의 모양은 두꺼운 원추 모양으로서, 가느다란 원추 모양인 대조군 MRSA의 cross wall의 형태와 비교했을 때 두께의 차이 외에는 크게 다르지 않은 모습이 관찰되었다. Oxacillin 처리 MRSA에서 대조군에 비해 세포벽의 두께는 현저하게 두꺼워지고 cross wall의 모양은 거의 변형되지 않은 결과에도 PBP2a가 기여했을 것으로 추측된다. Oxacillin에 노출되지 않은 MRSA에서는 활성이 거의 없던 PBP2a가 oxacillin에 노출된 후 활성화되어 세포벽의 두께를 증가시키고, 세포분열 시 cross wall의 합성도 어느 정도 진행시킴으로써 정상에 가까운 형태를 보이는 것으로 생각된다. 물론 이

경우에도 PBP2a가 최소 억제 농도의 oxacillin 존재 하에서 질적 및 양적으로 정상적인 기능을 수행하지는 못했을 것이며, oxacillin에 결합되지 않은 일부 PBP2a의 기능 유지로 인해 위와 같은 형태를 보였을 것으로 추측된다. MSSA의 경우에는 PBP2a가 존재하지 않으므로 oxacillin의 처리가 세포벽의 두께에 영향을 미치지 못했으며, 세포분열 시에도 cross wall에서 정상적이고 치밀한 구조의 peptidoglycan이 합성되지 못하고 느슨한 섬유질의 물질들이 합성되어, 중심을 향해 자라고 있는 cross wall의 옆에 축적됨으로써 cross wall이 두꺼운 곤봉 모양으로 자라는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 MSSA 균주에 penicillin을 처리했을 때 나타난 미세구조의 변화와 일치한다 (16). 사멸하지 않은 상태에서 분열이 완벽하게 일어나지 못한 형태인 pseudomulticell이 MSSA 균주들에서 보다 MRSA 균주들에서 더 많은 빈도로 관찰된 현상도, oxacillin에 저항을 보인 일부 PBP2a의 활성화에 기인했을 것으로 추정된다.

본 실험의 결과 중 oxacillin을 처리하지 않은 MSSA와 MRSA가 보인 차이점은 세포벽과 cross wall 두께의 차이, 세포벽 표면의 차이 등이다. 이러한 차이는 PBP2a에 의해 나타날 수도 있으나, 다른 병독 인자들 (virulence factors)에 의한 차이일 가능성도 있다. 임상 검체에서 분리된 MRSA 균주들이 MSSA 균주들보다 더 병독성 (virulence)이 더 높을 것이라는 의문을 해결하기 위한 여러 연구에서, MSSA 균주들과 MRSA의 균주들의 adhesins (17~19), enterotoxins (20, 21) 및 Panton-Valentine leukocidin (22, 23) 등과 같은 병독 인자들이 비교되었으나, MSSA와 MRSA간에 병독 인자의 종류와 보유 비율에 있어 일관성 있는 차이를 나타내지는 못하였다. Oxacillin을 처리하지 않은 MSSA와 MRSA에서 발견된 차이에 대한 원인을 명확히 밝히기 위해서는 MSSA와 MRSA의 congeneric strain을 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Brummfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1989;320:1188-96.
- 2) Jevons MP, Rolinson GN, Knox R. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J 1961;1:124-6.
- 3) Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 1961;14:385-93.
- 4) Dowling HF. The newer penicillins. Clin Pharmacol Ther 1961;2:572-80.
- 5) Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984;158:513-6.
- 6) Fontana R. Penicillin-binding proteins and the intrinsic resistance to β -lactams in gram-positive cocci. J Antimicrob Chemother 1985;16:412-6.
- 7) Reynolds PE, Fuller C. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding proteins in all strains examined. FEMS Microbiol Lett 1986;33:251-4.
- 8) Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Yonsei Med J 1998;39:526-33.
- 9) Berger-Bächi B, Strässle A, Gustafson JE, Kayser FH. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1367-73.
- 10) Maki H, Yamaguchi T, Murakami K. Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1994; 176:4993-5000.
- 11) Komatsuzawa H, Sugai M, Ohta K, Fujiwara T, Nakashima S, Suzuki J, Lee CY, Suganaka H. Cloning and characterization of the *fnt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of Triton X-100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2355-61.
- 12) Wyke AW. Isolation of five penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1984;22:133-8.
- 13) Georgopapadakou NH, Liu FY. Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother 1980;18:834-6.
- 14) Georgopapadakou NH, Dix BA, Mauriz YR. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29:333-6.
- 15) Curtis NAC, Hayes MV, Wyke AW, Ward JB. A mutant of *Staphylococcus aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity *in vitro*. FEMS Microbiol Lett 1980;9:263-6.
- 16) Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Weche J. Staphylococcal

- cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1371-414.
- 17) Duckworth GJ, Jordens JZ. Adherence and survival properties of an epidemic methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* compared with those of methicillin-sensitive strains. *J Med Microbiol* 1990;32:195-200.
- 18) Cree RG, Aleljung P, Paulsson M, Witte W, Noble WC, Ljungh A, Wadström T. Cell surface hydrophobicity and adherence to extra-cellular matrix proteins in two collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect* 1994;112:307-14.
- 19) Vaudaux PE, Monzillo V, Francois P, Lew DP, Foster TJ, Berger-Bächi B. Introduction of the *mec* element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters *in vitro* functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:564-70.
- 20) Coia JE, Browning L, Haines L, Birkbeck TH, Platt DJ. Comparison of enterotoxins and haemolysins produced by methicillin-resistant (MRSA) and sensitive (MSSA) *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1992;36:164-71.
- 21) Schmitz FJ, Mackenzie CR, Geisel R, Wagner S, Idel H, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Epidemiol* 1997;13:699-708.
- 22) Robert J, Etienne J, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantone-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:585-7.
- 23) Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:29-34.
-