

카테터 관련 요로감염에서 Quorum Sensing에 의한 자가유도물질 유전자의 발현 분석

The Analysis of the Autoinducer Gene Expression Related Quorum Sensing Mechanism in Catheter Associated Urinary Tract Infection

Jun Sung Koh, Hyo Sin Kim, Sang Seob Lee¹, Hee Tae Jung², Kyong Ran Peck³, Ji Youl Lee

From the Department of Urology, The Catholic University of Korea, Seoul, ¹Department of Biological Engineering, Kyonggi University, Suwon, ²Department of Chemical Engineering, KAIST, Daejeon, ³Department of Internal Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

Purpose: Catheter associated urinary tract infection (CAUTI) frequently occurs in the patients with an indwelling Foley catheter, and it can cause serious morbidity or mortality. However, there have been no reports about quorum sensing mechanisms in indwelling Foley catheter. It's our purpose to find out the quorum sensing mechanisms of isolated bacteria from biofilm in Foley catheters.

Materials and Methods: Silicone Foley catheters were placed in 90 patients with neurogenic bladders. At the 3rd, 5th, 7th, 14th and 30th day after the catheters were placed, the catheters were removed and the biofilm formations were evaluated by routine culture and microscopy. The *ygaG* gene, which was reported to be an autoinducer synthase gene was carried out cloning in *E. coli*. The quantity of the mRNA expression of the *ygaG* gene was analyzed according to the time by competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: 289 different types of bacteria were isolated by cultivation. The most common species were *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* and *Escherichia* species. The autoinducer synthase gene, such as the *ygaG* gene for *Escherichia coli*, was detected by RT-PCR. On competitive RT-PCR of the *ygaG* gene, the mRNA expression was 3.77×10^9 copies/ μ l at the 3rd day, 5.94×10^7 copies/ μ l at the 5th day, 8.07×10^7 copies/ μ l at the 7th day, 2.51×10^6 copies/ μ l at the 14th day and 6.81×10^8 copies/ μ l at the 30th day. Therefore, the expression of the autoinducer synthase gene was observed at the early insertion period and it was then maintained.

Conclusions: This is the first study to document the autoinducer synthase gene expression associated quorum sensing mechanism in CAUTI. The quorum sensing mechanism may be a new target for the management of CAUTI. (Korean J Urol 2006;47:945-952)

Key Words: Biofilms, Catheter, Antibiotics

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 9 호 2006

가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실,
¹경기대학교 생물학과,
²한국과학기술원 생명화학공학과
³성균관대학교 의과대학
삼성서울병원 내과

고준성 · 김호신 · 이상섭¹
정희태² · 백경란³ · 이지열

접수일자 : 2006년 5월 4일
채택일자 : 2006년 6월 1일

교신저자: 이지열
성가병원 비뇨기과
경기도 부천시 원미구 소사동 2
☎ 136-705
TEL: 032-340-2120
FAX: 032-340-2124
E-mail: uroljy@catholic.ac.kr

본 연구는 한국과학재단의 연구활동 지원사업 (과제번호: R01-2002-000-00467-0)에 의해 이루어진 것임.

서 론

요로는 병원감염 중 가장 흔히 감염이 발생하는 부위로 원내감염 중 약 40%를 차지한다. 대부분의 원내 발생 요로

감염은 요로 카테터와 관련이 있다. 입원 환자의 10-15%가 요로 카테터를 사용하고 있으며, 이들 중 10-40%의 환자에서 세균뇨가 발생한다. 세균뇨가 발생한 환자의 10-30%가 요로계 감염이나 전신 감염의 증상이 동반되며, 1-4%의 환자에서 균혈증이 발생한다. 또한 요로감염은 병원 감염의

가장 흔한 원인으로 전체 병원 감염의 40%를 차지하며, 이중 80%가 카테터 관련 요로감염 (catheter associated urinary tract infection; CAUTI)이다.¹ 이를 예방하기 위해서는 요도 카테터와 소변주머니까지 배뇨 장치의 완전 폐쇄 상태를 유지하는 것이 가장 효과적이지만, 실제로는 매우 어려운 일이다. 최근까지 알려진 CAUTI를 예방하는 방법으로 요도카테터를 삽입한 요도와 회음부를 매일 소독하는 방법, 소변주머니 내에 소독액을 첨가하는 방법, 방광 내 세척 및 항생제 주입법, 항생제 도포 카테터의 사용 등²이 있지만 뚜렷한 효과는 없었다.

이러한 요도카테터 감염은 숙주의 단백질과 미생물의 삼출물로 이루어진 기질 안에 많은 감염균들의 바이오필름에 의한 것이며, 카테터에 집락하고 있는 박테리아는 바이오필름 내에서 성장한다. 바이오 필름 내의 균들은 성장이 느려 활발히 성장하는 균들에 효과가 있는 대부분의 현재 사용하는 항균제는 이들에 대해 효과가 적다. 이러한 바이오필름은 'quorum sensing'이라 불리는 세포 사이의 신호기전에 의해 생성되며, 부착된 미생물 간의 기능적 공동체를 구성하고, 구성된 바이오필름은 탐식 세포, 항체, 보체 등의 숙주 방어 기전과 항생제에 대한 저항성을 갖는다고 보고되고 있다.³ 그렇기 때문에 효과적인 항생제 개발에도 불구하고 항생제 투여를 통해서도 임상적으로 CAUTI의 치료에 한계가 있다. 그러므로 바이오필름을 형성하는 박테리아와 quorum sensing 기전 규명에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있으며, 연구가 진행되고 있는 실정이다.⁴⁻¹⁰ CAUTI 발생에 관여하는 quorum sensing의 기전을 밝힘으로써, 치료의 장애 요소 중 하나인 바이오 필름 내의 quorum sensing을 억제하는 방법을 모색하면, 바이오 필름 세균의 효과적인 예방과 치료가 가능할 것으로 생각된다.

이를 위해서 본 연구에서는 quorum sensing 기전을 밝히기 위한 기초 연구로 요도카테터 내 균주를 분리 동정하여 균주들 중 *Escherichia coli* (*E. coli*)를 대상으로 quorum sensing에 관련된 자가유도물질 (autoinducer) 발현에 관여하는 유전자로 알려진 *ygaG* gene 복제하여 이들의 mRNA 발현을 정량 분석함으로써 이들이 실제로 바이오 필름 형성에 관여하였는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 대상

2004년 3월부터 2004년 12월까지 본원에서 신경인성 방광으로 요도카테터를 유치하고 있는 환자 90명을 대상으로 하였다. 대상 환자는 모두 남자였고 카테터 유치 기간 동안 항생제는 복용하지 않았다.

2. 요도카테터 내의 균주 동정

카테터 유치기간이 각각 3, 5, 7, 14, 30일 sample을 이용하였으며, 각각의 카테터 풍선 외부를 1cm 절단한 후, 멸균수에 넣고 희석하였다. 희석 후, 균 분리를 위하여 도말 평판법 (spread plate method)을 사용하여 호기의 경우 공기가 통하도록 하였고, 혐기의 경우 anaerobic jar에서 실험하였다. 이들 배양 후 생균수 측정방법 (viable counting method)을 이용하여 colony forming unit (CFU)를 계수하였다. 계수 후, 미생물의 균집을 액체 배지에 배양하였다. 배지는 nutrient broth, trypticase soy agar, brain heart infusion, trypticase soy agar with 5% sheep blood, *Mycoplasma* medium, King's A medium, YM medium 등 7가지 배지를 사용하였다. 호기 배양 조건의 경우 37°C 배양실에서 배양하였고, 혐기 배양의 경우 anaerobic jar에서 37°C로 배양하였다.

3. 바이오 필름 내 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 복제 및 mRNA 발현 정량 분석

1) 바이오 필름 내 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 cloning 및 염기서열 분석

(1) 사용 균주 및 대상 유전자; 앞선 실험에서 얻은 균주들 중, quorum sensing 관련 균주로 알려진 *E. coli*를 선택하여 그들의 quorum sensing 관련 유전자를 복제하였다. 그 실험 재료로 *E. coli* (4NB호38)를 선택하였으며, 그 균주의 quorum sensing에 관련된 자가유도물질 생성에 관여하는 유전자를 복제하였다.

(2) Quorum sensing mechanism 관련 유전자의 증폭; DNA의 분리는 Gemmil method 등을 응용하여 수행하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for the *ygaG* and the competitor used for polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing

Bacteria related quorum sensing	Related gene	Primer sequences	
		Forward primers	Reverse primers
<i>E. coli</i>	<i>yga G</i>	CACTGACTAGATGTGCAGTTC	GTGGCTAAATGCCGTTGTTAG

분리된 DNA를 주형으로 하여 유전자에 특이적인 primer를 제작하여 PCR을 수행하고 균에서의 표적 유전자에 대한 primer를 제작하였다 (Table 1).

(3) PCR 산물의 정제 및 결찰; PCR 반응액을 GeneClean II kit (Bio 101, USA)를 이용하여 정제한 후 pGEM-T easy vector에 결찰하였다. 결찰의 조성은 elution product 3°C, pGEM-T easy vector 1µl, T4 ligase 1µl, 2xligase buffer 5µl를 넣고 잘 섞어준 뒤 37°C에서 2시간 배양하였다.

(4) Transformation 및 Plasmid DNA 추출; CaCl₂를 이용해 c-cell을 제조하고, heat shock methods를 이용하여 transformation을 수행하였다. Atmanbio plasmid Miniprep kit, 21101을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 EcoRI로 절단하여 복제된 표적 유전자를 확인하였다.

(5) DNA 염기서열 분석; 염기서열 분석은 타 기관에 의뢰하였으며, pGEM-T easy vector에 포함되어 있는 T7 promoter와 sp6 promoter site를 시작점으로 하여 염기서열 분석하였다.

2) 바이오 필름내 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 mRNA 발현 정도의 정량 분석

(1) Competitor 제작

① DNA competitor 제작: 대상 유전자를 PCR하고 얻은 elution product를 template로 하고 competitor primer를 이용하여 PCR을 수행함으로써 약 100bp 길이가 줄어든 DNA competitor를 얻었다. 우선 *E. coli*의 *ygaG* gene (530bp)에서 100bp를 줄인 product를 제작하기 위하여 PCR primer 중 forward primer는 원래 target DNA를 증폭할 때 사용하였던 것을 사용하였고, reverse primer는 표적 유전자의 뒷부분을 100bp 정도 결손시켜 431bp size의 competitor를 제작하였다.

② RNA competitor 제작: 앞서 추출한 plasmid DNA를 restriction enzyme *speI*으로 절단하고, 이를 이용하여, competitive RNA transcription kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 in vitro transcription을 수행하였다.

(2) Competitive RT-PCR에 이용할 sample 준비

① RNA의 추출: 균을 배양한 후 RNA를 추출하였다. 3일, 5일, 7일, 14일, 30일 사용된 카테터의 1cm를 잘라내어 끓여낸 후 LB medium에서 3일간 호기 배양하였다. 여기서 얻은 균주 (w/w 200mg)를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA 추출에는 trizol methods를 이용하였다.

② RT-PCR

가. RT-PCR을 이용한 RNA competitor의 증폭; 앞서 제작한 RNA competitor를 이용하여 *ygaG*의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후 target size의 product가 얻어지는지 확인하였다.

나. 추출한 RNA sample의 RT-PCR; 균주에서 추출 후 DNase처리한 RNA의 O.D값을 측정하였으며, 측정 결과를 바탕으로 6µg의 RNA를 이용하고, *ygaG*의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후 목표한 크기의 RT-PCR product가 얻어지는지 확인하였다.

(3) Competitive RT-PCR (RNA sample을 이용한 표적 유전자의 mRNA 발현량 정량 분석); RNA sample을 이용한 RT-PCR을 통하여 표적 유전자가 증폭되는 것이 확인된 후, 표적유전자의 mRNA 발현량을 정량 분석하기 위하여 competitive RT-PCR을 수행하였다. 이 PCR의 결과물을 보고 다음 실험에서는 competitor의 양을 조절하여 target band와 competitor의 band가 같은 두께를 가지는 점을 찾아 이미 알고 있던 competitor의 copy수를 바탕으로 표적 유전자의 mRNA 발현량을 예상하였다.

(4) Elongation factor를 이용한 RT-PCR; 이 실험에서 사용된 각 기간별 카테터의 RNA 양이 같았다는 것을 증명하기 위하여 elongation factor를 이용한 RT-PCR을 수행하였다. O.D값을 측정한 결과만으로 초기 RNA 사용량이 모두 같다는 것을 증명하기에는 부족하다. 그렇기 때문에 elongation factor를 이용하는 방법을 이용하였다.

Table 2. The results of the numbers of isolated bacteria from the biofilm of silicons Foley catheters

Species	Gram	Shape	Size (µm)	Aggregation & re-production	Strain number
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	-	ovoid	0.8-1.0x1.0-1.2	Binary	5
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	-	rod	0.8-1.0x1.0-1.2	Binary	66
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	rod	0.5-1.0x1.0-2.0	Binary	43
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	rod	0.8-1.0x1.0-1.5	Binary	29
<i>Escherichia blatta</i>	-	rod	0.5-1.0x1.0-2.0	Binary	45
<i>Escherichia coli</i>	-	cocci	0.5-1.2	Binary	1
<i>Hafnia alvei</i>	-	rod	0.5-1.0x1.0-3.0	Binary	18
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	rod	0.8-1.0x1.0-1.2	Binary	19
<i>Proteus mirabilis</i>	-	rod	0.5-1.0x0.8-1.2	Binary	21
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	cocci	0.5-1.2	Binary	5
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	rod	1.0x2.0-3.0	Binary	4
<i>Serratia fonticola</i>	-	rod	0.2~0.5x0.5-2.0	Binary	14
<i>Serratia marcescens</i>	-	ovoid	0.8-1.0x1.0-1.2	Binary	9
<i>Serratia plymuthica</i>	-	cocci	0.8-1.0	Binary	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	cocci	1.0-2.0	Binary	2
<i>Yersinia kristensenii</i>	-	cocci	0.5-1.0	Binary	4

Gram: Gram staining, sp: species

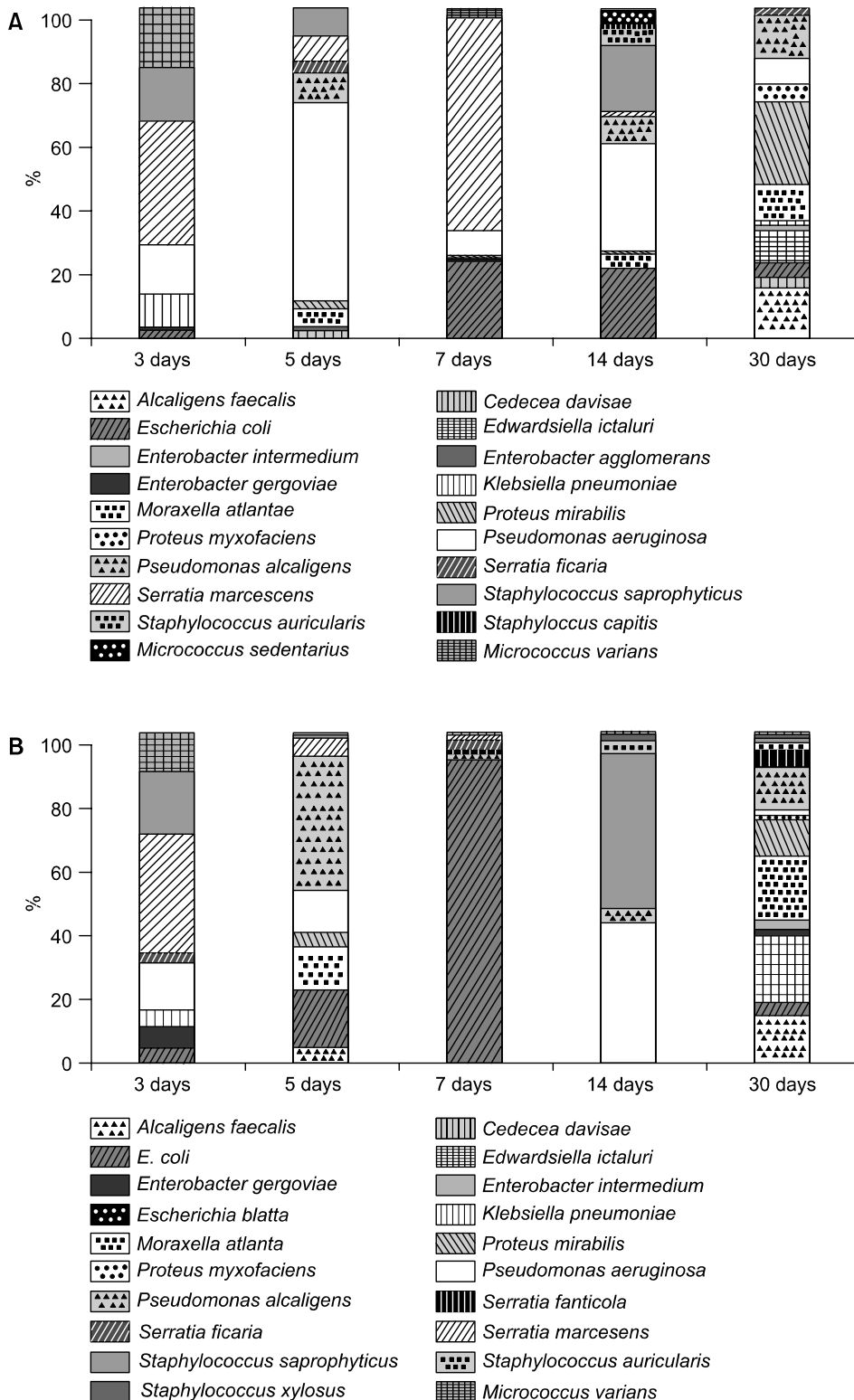


Fig. 1. (A) The profile of bacteria according to time (in an aerobic condition). (B) The profile of bacteria according to time (in an anaerobic condition).

(5) Target gene의 mRNA 발현 정량 결과의 분석

① **Densitometer를 이용한 density 측정:** 전기영동 결과의 정확한 분석을 위해서 densitometer에 의해 band의 밀도

를 측정 분석하였다. Target band (530bp)와 competitor의 band (431bp) 부분의 측정값 중, 가장 높은 수치 5개의 평균을 구하여 상대값으로 환산하였다.

② **Target RNA copy 수의 계산:** 실험 후 결과분석은 전 영동 사진에서 이미 알고 있는 competitor의 RNA copy수를 이용하여 같은 굵기의 band를 보이는 RNA양을 정량하였다.

결 과

1. 요도카테터 내 균주 동정

총 289 strain을 순수 분리하여 동정하였다. *Edwardsiella hoshinae* 5 strains, *Edwardsiella ictaluri* 66 strains, *Enterobacter agglomerans* 43 strains, *Enterobacter sakazakii* 29 strains, *Escherichia blatta* 45 strains, *Escherichia coli* 1 strain, *Hafnia alvei* 18 strains, *Klebsiella oxytoca* 19 strains, *Proteus mirabilis* 21 strains, *Pseudomonas* 종 9 strains, *Serratia fonticola* 14 strains, *Serratia marcescens* 9 strains, *Serratia plymuthica* 5 strains, *Staphylococcus epidermidis* 2 strains, *Yersinia kristensenii* 4 strains로 나타났다 (Table 2).

호기 균주 동정 결과 삽입 초기에는 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)와 *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*), *Serratia marcescens* 등이 주를 이루는 것으로 나타났고, 후기에는 *P. aeruginosa*, *S. saprophyticus*, *E. coli* 등이 많이 오염되는 것으로 나타났다. 삽입 후 30일이 지난 후의 카테터는 다양한 균주들에 의해 오염되는 것으로 나타났다 (Fig. 1A).

혐기 균주 동정 결과 삽입 초기에는 *P. aeruginosa*와 *P. alcaligenes*, *E. coli* 등이 주를 이루는 것으로 나타났고, 삽입 후기에는 *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa* 등이 많이 오염되는 것으로 나타났다. 호기 균주 동정 결과와 마찬가지로 삽입 후 30일이 지난 후에는 카테터가 다양한 균주들에 의해

오염되는 것으로 나타났다 (Fig. 1B).

2. 바이오 필름 내 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 복제 및 mRNA 발현 정량 분석

1) 바이오 필름 내의 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 복제 및 염기서열 분석 (*E. coli*의 *ygaG* 유전자의 복제): *ygaG* gene은 *E. coli*의 quorum sensing기작에 관여하는 유전자이며, 그 크기는 530bp이다. T7 forward sequencing primer와 SP6 reverse sequencing primer를 이용하여 *E. coli*의 *ygaG* gene의 염기서열 분석 결과 *ygaG* 유전자가 복제된 것을 확인하였다.

2) 바이오 필름 내 균주들의 quorum sensing 관련 유전자의 mRNA 발현 정도 정량 분석

(1) Competitor 제작

① **DNA competitor** 제작; Competitive RT-PCR을 수행하기 위하여 *ygaG* 유전자의 DNA competitor를 제작하고 염기서열을 분석하였다.

② **RNA competitor** 제작; 앞서 제작한 DNA competitor를 이용하여 competitive RT-PCR에 사용할 RNA competitor를 제작하였다. RNA competitor를 제작한 뒤, copy수를 계산한 결과 7.54×10^{11} 였다. 제작된 RNA competitor를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 표적 유전자의 증폭 여부를 확인하였다. 실험 결과 competitor의 size인 431bp의 product를 확인하였다.

(2) Competitive RT-PCR에 이용할 sample 준비

① **RNA의 추출;** 추출된 총 RNA는 3, 5, 7, 14, 30일에 각각 0.73, 3.86, 3.54, 2.48, 1.65 μ g/ μ l였다.

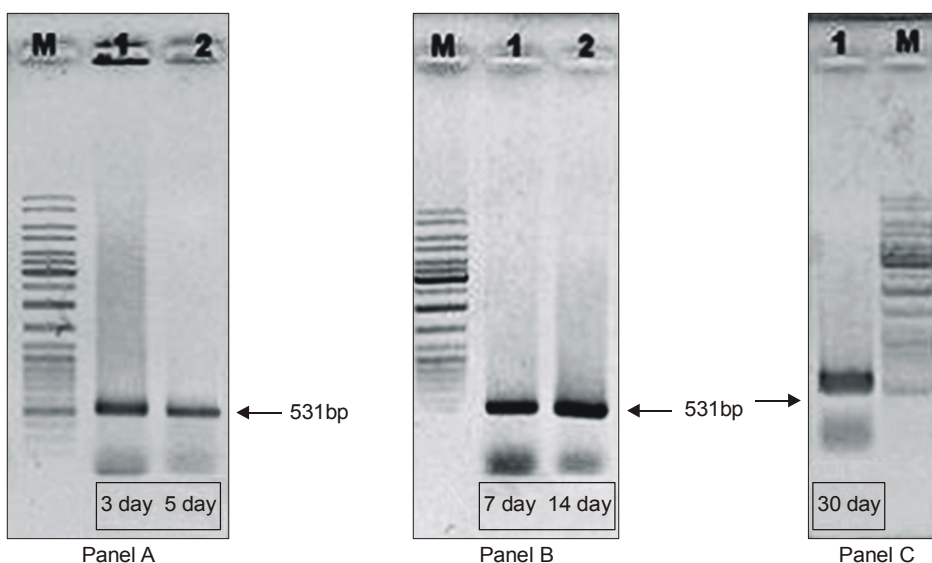


Fig. 2. Amplification of the *ygaG* gene used for RNA sampling by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Lane M is the molecular size marker. Lanes 1 and 2 of panels A and B are products of the *ygaG* gene, which are isolated from bacteria in each of the 3, 5, 7 and 14 days catheters, as the template and *ygaG* primer. Lane 1 of panel C is the products of the *ygaG* gene, which is isolated from bacteria in the 30 days catheter.

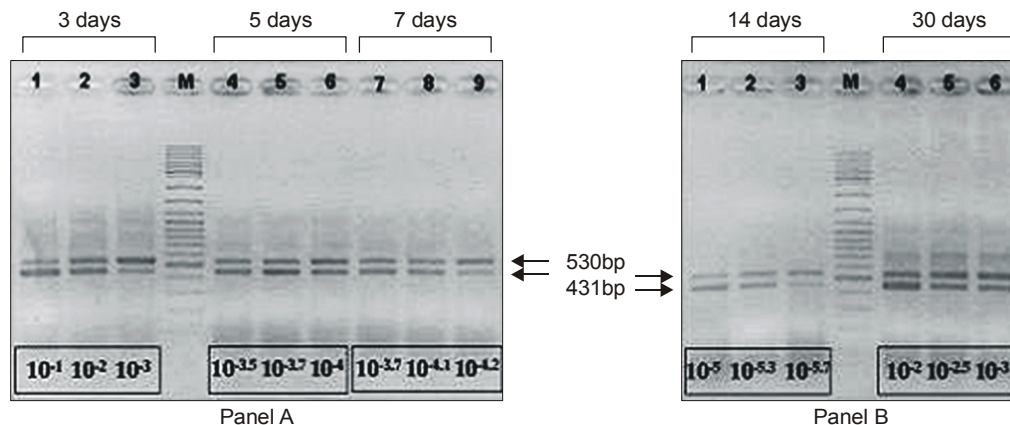


Fig. 3. Ethidium bromide stained gel used to generate the equation for quantitative competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for quantitative analysis of the RNA sample according to the insertion time of the catheter. Lane M is a 1kb DNA ladder. The cDNA of the total RNA from bacteria isolated from a catheter, according to the insertion time, is used as template, and the PCR reactions of lanes 1-9 of panel A contained 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , $10^{-3.5}$, $10^{-3.7}$, 10^{-4} , $10^{-3.7}$, $10^{-4.1}$, $10^{-4.2}$, respectively, of the competitor cDNA. The PCR reactions of lane 1-6 of panel B contained 10^{-5} , $10^{-5.3}$, $10^{-5.7}$, 10^{-2} , $10^{-2.5}$, 10^{-3} , respectively, of the competitor cDNA.

② RT-PCR

가. RT-PCR을 이용한 RNA competitor의 증폭; PCR 결과, *ygaG* gene의 competitor는 10^9 까지 증폭되는 것을 확인하였다.

나. 추출한 RNA sample의 RT-PCR; 각 sample에서 *ygaG* gene이 발현되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

(3) Competitive RT-PCR (RNA sample을 이용한 표적 유전자의 mRNA 발현 정량 분석)

실험 결과를 바탕으로 competitor의 농도를 더 세분화하여 희석한 뒤, competitive RT-PCR을 수행한 결과 3일, 5일, 7일, 14일, 30일 RNA sample은 각각 competitor의 10^{-2} , $10^{-3.5}$, $10^{-4.1}$, $10^{-5.3}$, $10^{-2.5}$ 와 같은 양이 있는 것으로 보였다 (Fig. 3).

(4) 표적 유전자의 mRNA 발현 정량 결과의 분석

① RNA sample를 elongation factor primer를 이용하여 증폭한 결과를 densitometer를 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 3일, 5일, 7일, 14일, 30일에 각각 213.13, 188.11, 148.21, 105.11, 233.70이었다.

② Target RNA copy수의 계산; 이미 알고 있던 RNA competitor의 copy수 (7.54×10^{11} copies/ μ l)와 비교하여 목표 유전자의 RNA copy수를 계산한 뒤, elongation factor primer를 이용한 RT-PCR 결과를 densitometer로 측정한 값으로 나누어 RNA copy수를 계산한 결과 3, 5, 7, 14, 30일에 각각 3.77×10^9 , 5.94×10^7 , 8.07×10^7 , 2.51×10^6 , 6.81×10^8 copies/ μ l이었다 (Table 3).

Table 3. Quantitative analysis of mRNA expression rate of the *ygaG* gene according to the insertion time

Day	No. of RNA copy (copies/ μ l)
3rd day	3.77×10^9
5th day	5.94×10^7
7th day	8.07×10^7
14th day	2.51×10^6
30th day	6.81×10^8

고 찰

요로감염의 주원인은 요로 유치 카테터와 관련된 감염으로, 주요 감염 경로는 다음의 몇 가지 경우이다. 카테터 삽입 시 정상적으로 요도의 앞부분에 있는 균이 카테터를 삽입할 때 기계적으로 상부 요도로 들어갈 수 있다. 또한 카테터 유치 후 카테터 주변을 통해 요도를 따라 균이 감염될 수도 있다. 여성에서 생긴 병원 요로감염증의 2/3에서 요도 주변에서 배양한 균과 요로감염증의 원인균이 같아서 카테터 주위로 요도를 따라 감염되었으리라 생각된다. 또 다른 기전은 카테터 내강을 통한 상행성 감염이다. 오염된 drainage bag에서 균이 올라가 요로감염을 일으키게 된다.¹¹

카테터와 연관된 감염은 매일 3-10%씩 증가한다. 따라서 유치 2주 정도면 도뇨 환자의 약 50%에서 세균뇨가 발생하고, 4주가 넘으면 아무리 예방을 잘 한다 해도 거의 대부분 환자에서 세균뇨가 발생한다. 카테터 관련 요로감염 치료

의 문제점은 카테터가 있는 상태에서 세균뇨를 치료하기 위해 항균제를 사용하게 되면 세균뇨를 일시적으로는 없애지만 근절시킬 수는 없으며 내성을 조장할 가능성이 있다는 점이다. 또한 요로 카테터는 일종의 개방 창상이므로 이런 내성균을 다른 환자에게 전파시키는 원인이 된다.

카테터에 집락하고 있는 박테리아는 바이오 필름 내에서 성장한다. 바이오 필름 내의 균수가 늘어나면 바이오 필름에서 벗어나는 균들이 있고 이들에 의해 세균뇨나 요로감염의 증상이 나타난다.

바이오 필름에서 떨어진 균들은 매우 활발히 대사가 이루어지며, 통상 사용하는 항균제에 의해 억제 또는 죽게 된다. 다시 말해서, 항균제를 사용하면 바이오 필름 내의 균들에 대해서는 항균력이 거의 없으며 박테리아의 대사가 거의 없어 항균제에 의해 죽지 않는다. 바이오 필름 밖으로 나온 균에 대해서만 항균력을 나타내어 감염의 임상 소견이 호전된다. 또 생각해야 할 점은 항균제가 요에서의 농도는 높아 박테리아를 죽이기에 충분하나, 바이오 필름으로는 침투가 잘 되지 않아 바이오 필름 속에 있는 박테리아를 죽이기에 충분하지 않다. 카테터 내강으로부터 바이오 필름 속으로 들어갈수록 항균제의 농도가 점차 낮아져 카테터에 붙어 있는 박테리아까지 도달할 때에는 항균제가 거의 없는 셈이다. 이런 이유로 항균제를 사용하면 당시에는 감염의 증상이 없어지고 세균뇨도 없어지나, 바로 재발하며 이 과정이 반복되면서 점차 내성균으로 대체된다.

Quorum sensing은 바이오 필름 내에서 세포 간에 정보를 전달하고 교환하는 방식으로 호르몬과 유사한 자가 유도물질을 분비함으로써 이루어진다. 자가 유도 물질이 일정 농도에 이르게 되면 세균의 전사 조절물질(transcriptional regulators)과 상호 작용하여 유전자 발현을 조절한다. 세균의 quorum sensing은 바이오 필름 형성 및 유지에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 일부 병독성 인자(virulence factor)의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있으나 아직 카테터 관련 요로감염에서는 그 기전이 밝혀진 바 없다.

항생제를 처리하지 않은 실리콘 카테터에서 주요 출현 균주에 대한 연구는 *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Protease*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Edwardsiella*, *Morganella* 중 등이 있다고 알려져 있다.¹²⁻¹⁴ 이 중 가장 많이 출현하는 균주로 그람 음성 균주는 *E. coli*와 *P. aeruginosa*, 그람 양성 균주는 *Staphylococcus*, *Enterococcus* 중 등이 보고되고 있다.^{15,16} 이러한 출현 균주 양상은 본 연구 결과에서도 비슷하였으며, 카테터 유치 초기에는 *P. aeruginosa*, *P. alcaligenese*, *Serratia marcescens* 등이 많은 부분을 차지하고 있었고, 유치 후기에는 *E. coli*, *Staphylococcus* 중, *P. aeruginosa*로 이전에 보고된

연구 결과와 비슷하였다.^{9,17} 유치 기간이 긴 카테터의 경우, 카테터의 오염 정도에 따라 20여종 이상의 많은 균으로 오염되어 있었으며, 이는 유치 후기에 카테터 외부로부터의 다른 균주들의 오염으로 인하여 종수가 늘어난 것으로 생각한다.

기간별 실리콘 카테터 내의 일반적으로 알려진 장내세균 및 바이오 필름을 형성하는 균주, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus* 중 등이 분포하였으며, 특히, quorum sensing 기전을 통해 바이오 필름을 형성하는 균들은 카테터 유치 초기부터 지속적으로 분포하는 것으로 나타났다.

분리 동정한 균 중 바이오 필름 형성에 관여한다고 알려진 균인 *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* 중 *E. coli* 선택하여 그들의 quorum sensing 기작에 관여하는 *ygaG* 유전자를 복제 및 염기서열을 분석한 결과, 기존에 알려진 유전자와 상동성이 98% 이상으로 나타났다. 또한 복제한 *E. coli*의 *ygaG* 유전자의 mRNA 발현을 정량 분석함으로써 이들이 바이오 필름 형성에 실제로 관여하였는지에 대한 확인 실험 결과 *ygaG* 유전자의 mRNA가 지속적으로 발현되어 바이오 필름 형성에 영향을 주는 것으로 생각한다.

연구 결과에서 흥미로운 점으로, 저자들은 카테터 유치 기간이 길수록 자가유도물질과 관련된 유전자의 발현이 증가할 것으로 예상하였으나 카테터 유치 초기에는 유전자의 발현이 증가되었다가 시간이 지날수록 다시 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 원인의 첫 번째로 고려할 수 있는 것은 본 실험에서는 바이오 필름을 형성하는 균 중 *E. coli*만을 대상으로 유전자의 발현을 측정하였으므로 시간이 지나면서 다른 바이오 필름 형성균의 자가유도물질 발현과 관련된 유전자의 양이 상대적으로 증가하였기 때문으로 생각한다. 두 번째로 환자와 환경조건의 차이에 따라 여러 가지의 스트레스가 작용하여 유치 기간별 quorum sensing 기전에 영향을 주는 것으로 생각한다. Reissbrodt 등¹⁸에 따르면 quorum sensing 기작을 하는 박테리아는 영양 조건, 산소의 농도, 열, 낮은 온도, pH, UV 등의 다양한 stress에 따라 자가유도물질의 발현의 양이 좌우된다고 보고하고 있으며, 또한 DeLisa 등⁵은 배지 내의 Fe III, NaCl, DTT, sodium acetate, ethanol, serine hydroxamate, hydrogen peroxide의 영향, 산소의 공급을 중단한 것, 가열 등의 스트레스를 주어 연구하였는데, 자가유도물질의 발현량이 스트레스를 주었을 때 증가되었다가 감소하는 것이 반복되는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 카테터 관련 요로감염에서 quorum sensing 기작에 의한 자가유도물질의 발현이 처음으로 증명되었으며, 추가적 연구를 통해 이러한 기전을 억제할 수 있는 방법이 모색된다면 추후 카테터 관련 요로감염 예방에 큰 기여

를 할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

요도카테터 내에서 바이오필름을 형성하는 균주는 일반적으로 알려진 장내세균인 *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus* 종 등이었으며, 특히 quorum sensing 기전을 통해 바이오필름을 형성하는 균들이 카테터 유치 초기부터 나타나 지속적으로 분포하는 것으로 나타났다. 자가유도물질 생성에 관여하는 유치 기간별 카테터 바이오 필름 내 *ygaG* 유전자의 mRNA 발현량을 정량 분석한 결과, 자가유도물질 생성 유전자는 카테터 유치 초기부터 지속적으로 발현되는 것으로 나타났으며, 자가유도물질 생성 유전자의 발현이 카테터의 바이오 필름 형성을 유도하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 연구 결과를 바탕으로 quorum sensing 기전을 밝히기 위한 연구를 추가적으로 수행하여야 할 것이며, 이러한 quorum sensing은 카테터 관련 요로감염 치료를 위한 새로운 목표가 될 것이다.

REFERENCES

1. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect* 2000;2:1721-31
2. Nickel JC, Grant SK, Costerton JW. Catheter-associated bacteriuria. An experimental study. *Urology* 1985;26:369-75
3. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8789-93
4. Bauer WD, Robinson JB. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:234-7
5. DeLisa MP, Valdes JJ, Bentley WE. Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 2001;183:2918-28
6. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003;46:207-14
7. Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1425-43
8. Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* 2002;5:254-8
9. Tenke P, Jackel M, Nagy E. Prevention and treatment of catheter-associated infections: myth or reality. *EAU update Series* 2004;2:106-15
10. Thompson LS, Webb JS, Rice SA, Kjelleberg S. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;220:187-95
11. Kim DI, Lee SJ, Cho YH. Norfloxacin hydrogel coated urethral catheters for prevention of catheter associated urinary tract infection in the rabbit. *Korean J Urol* 2002;43:980-6
12. Kumon H, Hashimoto H, Nishimura M, Monden K, Ono N. Catheter-associated urinary tract infections: impact of catheter materials on their management. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:311-6
13. Merle V, Germain JM, Bugel H, Nouvellon M, Lemeland JF, Czernichow P, et al. Nosocomial urinary tract infections in urologic patients: assessment of a prospective surveillance program including 10,000 patients. *Eur Urol* 2002;41:483-9
14. Tambyah PA. Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24(Suppl 1):S44-8
15. Lee JH, Ju YM, Kim DM. Platelet adhesion onto segmented polyurethane film surfaces modified by addition and crosslinking of PEO-containing block copolymers. *Biomaterials* 2000;21:683-91
16. Tal S, Guller V, Levi S, Bardenstein R, Berger D, Gurevich I, et al. Profile and prognosis of febrile elderly patients with bacteremic urinary tract infection. *J Infect* 2005;50:296-305
17. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93
18. Reissbrodt R, Rienecker I, Romanova JM, Freestone PP, Haigh RD, Lyte M, et al. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4788-94