

어린이 치면세균막에서 치주질환원인균과 항생제 내성유전자의 출현율

김선미¹ · 최남기¹ · 조성훈¹ · 이석우² · 임희정³ · 임희순⁴ · 강미선⁵ · 오종석⁵

전남대학교 치의학전문대학원 ¹소아치과학교실 및 치의학연구소, ²치의학교육학교실 및 치주학교실,
³교정학교실, ⁴치의학교육학교실, ⁵전남대학교 의과대학 미생물학교실

국문초록

항생제 사용에 따라 구강내 세균들이 가지게 되는 내성의 발현이 문제가 될 수 있다. 어린이 치면세균막에서 치주질환의 원인균들과 흔히 사용하고 있는 항생제들에 대한 내성유전자의 출현율을 알아보고자 중합효소연쇄반응을 이용하여 조사하였다.

1. 치주질환 원인균의 출현율은 *F. nucleatum* 95.4%, *T. forsythia* 55.2%이었으며, *P. gingivalis* 40.2%, *A. actinomycetemcomitans* 5.7%, *T. denticola*는 3.4% 순이었다.
2. 항생제 내성유전자의 출현율 조사에서 cephalosporin 분해효소인 *cfxA*는 100%에서 발견되었으며 β -lactam 분해효소인 *bla_{TEM}*과 tetracycline 내성유전자인 *tet(M)*도 100%의 출현율을 보였다. *tet(Q)*는 88.5%, β -lactam 분해효소인 *bla_{SHV}*는 29.9%, macrolide계 내성 *ermF*유전자는 87.4%, vancomycin 내성 *vanA*는 48.5%의 출현율을 보였다. Aminoglycoside에 대한 복합 내성을 보이는 *aacA-aphD*와 meticillin 내성유전자 *mecA*는 9.2%로 가장 낮은 출현율을 보였다.
3. 치주질환 원인균과 항생제 내성유전자와의 관련성 조사에서 *T. forsythia*와 *bla_{SHV}*간에 그리고 *P. gingivalis*와 *vanA*간에 유의한 상관성이 있었다. 항생제 내성유전자 *tet(Q)*와 *ermF* (0.514)간에 중등도의 상관성을 나타내었으며, *mecA*와 *vanA* (0.25)간에 유의한 상관성을 나타내었다.

건강한 어린이들의 치면세균막에 다양한 치주질환 원인균들과 항생제 내성유전자들이 존재하며, 상호 관련성을 가지고 존재함을 보여주었다.

주요어: 치주질환 원인균, 항생제 내성, 항생제 내성유전자, 치면세균막, 중합효소연쇄반응

I. 서론

인간의 구강내 치아를 둘러싸는 생체막(biofilm)인 치면세균막에는 700여종의 세균들이 존재한다¹⁾. 구강의 세균은 직접적으로 치아우식증이나 치주질환과 같은 질환과 관련되어 있다. 치주질환은 구강내에 존재하는 혐기성세균 및 이러한 세균들이 생성하는 독소들에 의해서 야기되며, 이로 인해 치아 주위조직인 치은과 치주인대 및 치조골이 파괴되는 염증성 질환이다. 대부분의 성인에서 나타나는 대중적인 질환이지만, 어린 시기나 젊은 시기에 치은염으로 시작하여 치료하지 않으면 파괴성 치주염으로 진행될 수 있다. 치주질환의 최종 결과는 치아상실로

이어서 치아우식증과 함께 치아상실의 중요 원인이 된다. 치주질환 환자의 구강에는 다양한 세균이 존재한다고 알려져 있으나 이들 모든 세균이 치주질환에 깊이 관여하는 것은 아니다. 국소적 사춘기성 치주염과 관련이 있는 세균은 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*이고²⁾, 치주질환에 중요한 역할을 하는 원인균은 red complex라고 하는 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*B. forsythus*), *Treponema denticola* 등이 있다³⁾.

대부분의 구강세균들은 치아에 붙어있는 복잡한 생체막으로 조직화되어있다. 이러한 치면세균막은 칫솔질과 같은 기계적 방법으로 제거할 수 있으나, 많은 사람에서 만족스러운 수준의

교신저자 : 김 선 미

광주광역시 북구 용봉로 77번지 / 전남대학교병원 소아치과학교실 / 062-530-5668 / smkim1406@hanmail.net

원고접수일: 2011년 04월 13일 / 원고최종수정일: 2011년 05월 09일 / 원고채택일: 2011년 05월 10일

*이 논문은 2008년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

치태제거가 이루어지지 않아 이로 인해 치은염과 치주염이 발생하기도 한다. 치은염 및 치주염 치료법의 일환으로 치근면의 스케일링과 치근단활택술이 빈번하게 사용되는데, 반복적 치료에 의해 이는 실질적인 경조직 손상으로 나타나기도 한다. 더우기 치료 부위에 어떤 특정 미생물의 존재나 재성장이 있으면 만족스럽지 못한 치료결과를 초래하게 된다. 따라서 치주질환의 원인이 일부 세균 중에 의한 것이라면 불특정의 지속적인 물리적이고 기계적인 치태관리가 예방과 치료를 위한 유일한 방법은 아닐 것이다. 이런 경우 치태에서 질병을 유발하는 특별한 병원균만을 제거하거나 감소시키는 것이 효과적인 대안이 될 수 있고, 항균제를 국소적으로 또는 전신적으로 투약하면 기계적 치주치료의 효과를 증진시킬 수 있을 것이다. 따라서 치주질환의 치료를 위해 전신적 항생제 투여를 병용하기도 하였다⁴⁾. 사용되는 항생제 중 tetracycline, aminopenicillins, metronidazole, macrolides, ciprofloxacin과 amoxicillin clavulanic acid 조합이 추천되고 있다⁵⁻⁸⁾.

하지만 항생제 사용에 따라 세균들이 가지게 되는 내성의 발현이 문제가 될 수 있다. 가장 흔하게 처방되는 약물은 β -lactam계의 penicillin 항생제인데, 구강내 세균들의 penicillin에 대한 가장 중요한 저항기전은 β -lactam 분해효소의 생성이다⁹⁾. 세균이 형성하는 β -lactam 분해효소는 penicillin, cephalosporin 등의 β -lactam계의 세포벽 합성억제에 의한 항균효과에 대해 세균을 보호하는 역할을 한다. 한편 치주질환의 치료로 임상에서 tetracycline을 많이 사용하고 있는데, 세균에서 리보솜의 방어기전에 의해 tetracycline에 대한 저항성이 증가하게 되었다^{10,11)}.

이렇듯 여러 임상연구결과 치주세균의 일부가 기계적인 치료와 보조적인 항생제 요법에 의해 성장이 억제되어 치주 치료의 보조역할을 한다고 보고된 바 있지만 이러한 항생제에 대한 내성이 내성 유전자를 통해 증가해서 질환의 예후에 악영향을 줄 수 있다. 특히 한국에서는 항생제 오남용에 따른 문제점들이 많이 제기되고 있는 현실에서 이러한 문제점과 아울러 구강내의 치면세균막이 어떤 항생제 내성을 가지고 있는지 조사하는 것은 의미 있는 일이다. 건강한 정상 어린이에서는 치주질환으로 치주조직이 파괴되는 경우는 드물다¹²⁾. 하지만 많은 어린이들에서 치주질환 원인균이 발견되고 있으며^{13,14)}, 병력이 있던 어린이는 결국 청소년기를 지나 성인이 되어서 다시 치주질환을 가지게 될 가능성이 높다는 사실이 알려져 있다^{15,16)}. 특히 급속진행형 치주염인 경우는 어린 연령에서부터 발병하기도 하여 어린이에서 치주질환 원인균의 평가가 중요하다고 할 수 있다. 따라서 어린이에서 치주질환의 원인이 되는 세균들이 얼마나 분포하는지 조사하고, 또한 건강한 어린이들의 치면세균막에서 전신적으로 흔히 사용하고 있는 항생제들에 대해 어느 정도 내성을 가지고 있는지를 알아보고자 하였다. 또한 각각의 항생제 내성 유전자와 치주질환 원인균과는 어떤 관련성을 가지고 있는지 상관관계를 알아보고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구대상으로는 광주광역시 한 유치원의 전신질환이 없는 건강한 어린이 87명(남자 44명, 여자 43명)을 조사대상으로 하였다. 어린이들의 연령은 4-6세 사이였으며 평균연령은 4.6세였다.

2. 연구 방법

1) 5종의 치주질환 원인균에 대한 검사

(1) 치태 채취

치태시료를 얻기 위해 대상자의 하악 우측 제1대구치 또는 제2유구치의 근심협측부위에서 멸균된 이쑤시게를 사용하여 조심스럽게 치은연하 치태를 채취하였다. 채취한 치태는 멸균된 0.2 ml phosphate-buffered saline (PBS)이 들어있는 1.5 ml tube에 수집한 후 DNA 추출을 위해 실험실로 옮겨 -4°C에 보관하였다.

(2) 치태내 치주세균의 DNA 추출

치태 샘플에 있는 세균은 원심기를 사용하여 4도에서 10분간 6,000 rpm으로 원심분리하였다. 얻어진 세균덩어리는 PBS를 이용하여 부드럽게 3회 세척하였다. 세균덩어리로부터 Wizard Genomic DNA 정제 기구를 이용하여 DNA를 추출하였으며, DNA의 농도는 UV스펙트럼 측정기를 이용하여 측정하였다.

(3) Primer 제작

치은연하 치태 내 치주질환 원인균 *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*의 존재를 확인하기 위해 시행할 polymerase chain reaction (PCR)의 primer를 제작하였다. 치태에서 5종의 세균을 검색하기 위해서 16S rDNA의 염기서열에 기초한 각 세균종-특이 primer를 제작하였다(Table 1).

(4) 표준 균주 배양과 표준균주의 DNA 추출

제작한 primer가 정상적으로 PCR 산물을 만들어 낼 수 있는지 여부와 PCR 조건의 표준화를 위해 사용할 표준균주로서 *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037, *T. denticola* ATCC 35405, *F. nucleatum* ATCC 10953, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384를 선택하였다. *P. gingivalis*는 yeast extract (5 mg/ml), hemin (5 μ g/ml), vitamin K (1 μ g/ml)가 포함된 half-strength brain heart infusion (BHI; Difco) 액체배지에 혐기 배양하였다. *T. forsythia*와 *F. nucleatum*은 yeast extract (10 mg/ml), hemin (5 μ g/ml), vitamin K (1 μ g/ml)가 포함된 BHI 액체배지에 혐기 배양하였다. *T. denticola*는 trypticase-yeast-

Table 1. Primer pairs used for detection of 5 periodontopathic bacteria in the study

Primer pairs	Sequences (5' to 3')	Base pos ^a	bp ^b
<i>P. gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG (F) ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT (R)	729-1132	404
<i>T. forsythia</i>	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA (F) TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T (R)	120-760	641
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T (F) TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA (R)	193-508	316
<i>F. nucleatum</i>	GAA GAA ACA AAT GAC GGT AAC AAC (F) GTC ATC CCC ACC TTC CTC CT(R)		705
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC (F) ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT (R)	478-1034	557

^a: the base position in the 16S rDNA to which the primer sequence corresponds, ^b: expected size (bp) of the PCR product.

extract-gelatin-volatile fatty acids-serum 배지에 토끼 혈청을 5% 첨가하여 혐기적으로 배양하였다. *A. actinomycetemcomitans*는 yeast extract (1 mg/ml), tryptic soy broth (30 mg/ml) 배지에서 혐기 배양하였다. 이들 배양한 표준균주들은 12,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 상층액은 버리고 균 pellet을 100 µl PBS buffer에 2회 washing시킨 후 다시 PBS 0.1 ml로 부유하여 위와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

(5) 중합효소 연쇄반응 (PCR)

PCR은 PCR premix (dNTP 250 µM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 40 mM, Taq polymerase 1 U, tris-HCl 10 mM, Accupower™, Bioneer corp, Korea)에 10 pmol 한 쌍의 primer 2 µl, DNA template 4 µl와 증류수 14 µl를 첨가하여 최종 용량을 20 µl로 조절하여 혼합하고 GeneAmp PCR system 2700(Applied Biosystem, USA)을 사용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 이 때 사용한 PCR의 조건은 *P. gingivalis*의 경우, 최초 변성을 위해 95℃에서 2분간, 이후 36번의 PCR cycle은 95℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분간 시행하고, cycle이 끝난 후 72℃에서 최종적으로 2분간 처리하였다. *T. forsythia*의 경우는 변성을 위해 95℃에서 2분간, 이후 36번의 PCR cycle은 95℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분간 시행하고, cycle이 끝난 후 72℃에서 최종적으로 2분간 처리하였다. *T. denticola*의 경우는 변성을 위해 94℃에서 1분간, 이후 30번의 PCR cycle은 94℃에서 1분, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분간 시행하고, cycle이 끝난 후 72℃에서 최종적으로 10분간 처리하였다. *F. nucleatum*의 경우는 변성을 위해 94℃에서 3분간, 이후 33번의 PCR cycle은 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1.5분간 시행하고, cycle이 끝난 후 72℃에서 최종적으로 10분간 처리하였다. *A. actinomycetemcomitans*의 경우는 변성을 위해 95℃에서 2분간, 이후 36번의 PCR cycle은 94℃에서 30초, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분간 시행하고, cycle이 끝난 후 72℃에서 최종적으로

10분간 처리하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동하고, gel은 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색한 후 TFX-20M (Vilber Lourmat, France)에서 사진촬영하여 증폭여부를 확인하였다.

2) 항생제 내성 유전자의 검사

(1) 준비된 치주세균내 DNA의 중합효소 연쇄반응

50 ng의 DNA를 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 시행하였다. 항생제의 내성유전인자로 알려진 9종 *tet(Q)*, *tet(M)*, *ermF*, *aacA-aphD*, *cfxA*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *vanA*, *mecA*에 특정한 10 nM의 각각의 primer를 제작하고 반응 premix에 포함시켰다(Table 2). TaqDNA 중합효소를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR을 마친 후에 각각의 반응 후 튜브에서 0.2 µg의 샘플을 채취하여 PCR산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동하고, gel은 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색한 후 TFX-20M (Vilber Lourmat, France)에서 사진촬영하여 증폭여부를 확인하였다(Fig. 1).

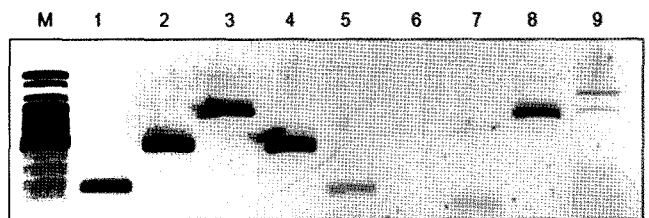


Fig 1. Electrophoresis of PCR amplification for the antibacterial resistance gene.
M: 100 bp DNA ladder,
1: *tet(M)*, 2: *tet(Q)*, 3: *cfxA*, 4: *ermF*, 5: *bla_{SHV}*, 6: *aacA-aphD*, 7: *mecA*, 8: *bla_{TEM}*, 9: *vanA*

Table 2. Target resistance genes and PCR primers used for PCR and amplicon size

Targeted antibiotic resistance genes	antibiotics	Amplicon Size (bp)	Primer Sequence
<i>tet(Q)</i>	tetracycline	465	5' CTG TCC CTA ACG GTA AGG 3' 5' TTA TAC TTC CTC CGG CAT CGG T 3'
<i>tet(M)</i>	tetracycline	158	5' AGT GGA GCG ATT ACA GAA 3' 5' CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA 3'
<i>ermF</i>	macrolides	465	5' CGG GTC AGC ACT TTA CTA TTG 3' 5' GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG 3'
<i>aacA-aphD</i>	aminoglycosides	227	5' TAA TCC AAG AGC AAT AAG GGC 3' 5' GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA 3'
<i>cfxA</i>	beta-lactam antibiotics	934	5' GCA AGT GCA GTT TAA GAT T 3' 5' GCT TTA GTT TGC ATT TTC ATC 3'
<i>bla_{SHV}</i>	beta-lactam antibiotics	867	5'GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC 3' 5' TTA GCG TTG CCA GTG CTC 3'
<i>bla_{TEM}</i>	beta-lactam antibiotics	867	5'ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG 3' 5' CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA 3'
<i>vanA</i>	vancomycin	617	5' GGG AAA ACG ACA ATT GC 3' 5' GTA CAA TGC GGC CGT TA 3'
<i>mecA</i>	meticillin	532	5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C3' 5' AGT TCT GCA GTA CCG GATT TGC 3'

3) 통계 분석

조사 대상자들의 치면세균막으로부터 치주질환 원인균의 출현율과 항생제 내성유전인자의 출현율을 조사하였다. 또한 치주질환 원인균과 내성유전인자의 출현율 간의 상관관계를 얻기 위해, 그리고 치주질환원인균간 및 내성유전인자간의 상관관계 조사를 위해 phi 상관계수(두 개의 이분형 변수들간의 상관성을 측정하는 계수)와 Chi-square 검정을 시행하였다. 또한 5보다 작은 기대빈도를 가지는 cell이 존재할 경우 Fisher's exact 검정을 시행하여 odds ratio를 구하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. 치주질환 원인균의 출현율

모든 대상자의 치태를 PCR로 조사한 결과 한 종류 이상의 치주질환 원인균이 발견되었다(Table 3). *F. nucleatum*은 95.4%의 높은 출현율을 보였으며 그 다음이 *T. forsythia*로 55.2%이었으며, *P. gingivalis*는 40.2%의 출현율을 보였다. *A. actinomycetemcomitans*는 5.7%, *T. denticola*는 3.4%로 가장 낮은 비율이었다.

2. 항생제 내성유전인자의 출현율

Cephalosporin 분해효소에 해당되는 *cfxA*유전자는 100%에서 발견되었으며 β-lactam 분해효소중 하나인 *bla_{TEM}*과 tetracycline에 대한 내성유전자인 *tet(M)*도 100%의 출현율을 보였다. *tet(Q)*는 88.5%, β-lactam 분해효소의 다른 하나

Table 3. Prevalence of periodontopathic bacteria found in subjects

Bacteria	Prevalence (%)
<i>P. gingivalis</i>	40.2
<i>T. forsythia</i>	55.2
<i>T. denticola</i>	3.4
<i>F. nucleatum</i>	95.4
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5.7

Table 4. Prevalence of antibiotic resistance genes in oral bacteria

Antibiotic resistance genes	Prevalence (%)
<i>tet(Q)</i> : tetracycline	88.5
<i>tet(M)</i> : tetracycline	100
<i>ermF</i> : Macrolide	87.4
<i>aacA-aphD</i> : Aminoglycoside	9.2
<i>cfxA</i> : Cephalosporin	100
<i>bla_{SHV}</i> : beta-lactam antibiotics	29.9
<i>bla_{TEM}</i> : beta-lactam antibiotics	100
<i>vanA</i> : Vancomycin	48.5
<i>mecA</i> : Meticillin	9.2

인 *bla_{SHV}*는 29.9%이었으며 macrolide계 항생제에 대한 내성을 나타내는 *ermF*유전자는 87.4%, vancomycin 항생제에 대한 내성을 나타내는 *vanA*는 48.5%의 출현율을 보였다. Aminoglycoside에 대한 복합 내성을 보이는 *aacA-aphD*와 meticillin 내성유전자 *mecA*는 9.2%로 가장 낮은 출현율을 보였다(Table 4).

3. 치주질환 원인균 및 항생제 내성유전인자 간의 상관성

치주질환원인균 사이의 출현에 따른 상관관계 조사에서 *A. actinomycetemcomitans*는 *T. forsythia* (ϕ : 0.223) 및 *T. denticola* (ϕ : 0.224)와 유의한 상관성이 있었으며, 또한 *T. forsythia*는 *F. nucleatum* (ϕ : 0.244)과 유의한 상관성을 보였다.

치주질환 원인균과 항생제 내성유전인자와의 관계를 보면 *T. forsythia*와 *bla_{SHV}* (ϕ : 0.514)간에 중등도의 상관성이 존재하였는데(ϕ : 0.514), odds ratio는 3.0으로 *bla_{SHV}*를 가진 사람은 가지지 않은 사람보다 *T. forsythia*균의 출현비율이 3배 더 많았다. *P. gingivalis*와 *vanA*간에 유의한 상관성이 있었는데(ϕ : 0.250), odds ratio는 3.3으로 *vanA*를 가진 사람은 가지지 않은 사람보다 *P. gingivalis*균의 출현비율이 3.3배 더 많았다.

항생제 내성유전인자간의 상관관계는 *tet(Q)*와 *ermF*간에 중등도의 상관성을 나타내었으며(ϕ : 0.514), odds ratio는 21.6으로 *tet(Q)*가 출현한 대상에서 출현하지 않은 경우보다 *ermF*의 출현비율이 21.6배나 높았다.

또한 *mecA*와 *vanA*간에 유의한 상관성을 나타내었으며(ϕ : 0.25), odds ratio는 8.8로 *mecA*가 출현한 대상에서 출현하지 않은 경우보다 *vanA*의 출현비율이 8.8배 높았다.

IV. 고 찰

치주질환은 치면세균막이 야기하기 때문에 치주염 예방을 위해 가장 우선해야 할 것은 치태의 조절이다. 많은 어린이들에서 치주질환의 원인균들이 높은 비율에서 발견되고 있음을 본 실험에서 알 수 있었다. 국소 유전형 치주염의 원인인 *A. actinomycetemcomitans*도 5.7%에서 발견되었으며 치주질환의 주 원인균으로 꼽히는 *P. gingivalis* 40.2%, *T. forsythia*도 55.2%로 상당히 높은 출현율을 보이고 있었다.

치주질환의 치료에 스케일링과 치주수술 등 여러 가지 물리적 치료도 필요하지만 병인이 되는 세균의 조절이 없으면 장기적인 성공을 가져올 수는 없다. 세균의 조절을 위해 화학적 치태조절제품이나 항생제를 사용할 수 있으며, 임상연구결과 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*가 적절한 기계적인 치료와 보조적인 항생제 요법에 의해 치료됨이 보고되었다⁴⁾.

Penicillin과 cephalosporin은 세포벽 합성을 방해하는 좁은 범위의 스펙트럼을 갖는 살균제이다. Penicillin 중 amoxicillin이 치주질환에 상용되는데 그 이유는 치은열구액에서 일정한 농도를 유지하여 여러 병원균에 작용하기 때문이다. Tetracycline, erythromycin, clindamycin은 단백질 합성을 방해하며, 광범위한 항균성을 갖는다. 이러한 효능에 더해 tetracycline은 collagenase를 방해하는 기능도 있다¹⁷⁾. 이러한 효능은 치주질환시 조직의 파괴를 막는데, 치아와 결합해서 천천히 방출하게 된다¹⁸⁾. 또한 성인형 치주염환자 특히 난치성 치주염 환자에서 전신적으로 사용한 결과 탐침낭 깊이를 감소시

켰다고 보고되고 있다¹⁹⁻²¹⁾. 급속진행형 치주염에서 metronidazole은 스케일링 단독치보다 임상적 결과가 개선되는 결과를 보였다^{22,23)}. 진행형 성인형 치주염이 있는 환자를 clindamycin만으로 치료한 경우에서 6개월 후 임상적, 미생물학적 면이 개선되었으며 *P. gingivalis*가 발견되지 않았음이 보고되었다²⁴⁾. 한편 *A. actinomycetemcomitans*와 관련된 진행형 치주염은 metronidazole과 amoxicillin을 혼합하여 사용한 경우 치료에 성공적이었음이 보고되었다^{6,25,26)}.

그러나 항생제의 사용은 독성이나 고유의 부작용, 또는 세균 내성의 발달을 가져올 수 있다. 더욱이 치은연하의 미생물은 biofilm을 형성하여 광범위한 세균성장과 함께 항균제로부터 세균을 효과적으로 보호하는 역할을 하기도 하여 저항을 나타내므로 완전한 치료를 할 수는 없다^{27,28)}. 구강 세균은 항생제에 대한 내성을 획득할 수 있을 뿐 아니라, 신체 내 다른 부위나 다른 개체로 쉽게 전염이 되기 때문에 다른 세균종에 항균제 저항성을 쉽게 전파시킬 수 있게 된다. 감염질환의 치료에 널리 이용되는 penicillin과 cephalosporin에 대한 저항기전은 β -lactam 분해효소의 생성이다. 가장 흔한 β -lactam 분해효소는 플라스미드로부터 생긴 *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*유전자가 해당된다⁹⁾. 대부분의 *Bacteriodes fragilis*는 염색체의 *cfxA*유전자에 의해 β -lactam 분해효소를 생성함으로써 β -lactam에 저항성을 보이게 된다^{29,30)}.

Penicillin 분해효소의 성질을 가진 *cfxA*유전자는 cephalosporin 분해효소에 작용한다. 아미노페니실린 저항성의 *Prevotella*종은 *cfxA*에 해당되는 β -lactam 분해효소 생산을 많이 하는 종인데, 치주낭에서 β -lactam 분해효소를 만들어 내는 종으로 알려져 있다³¹⁾. 이러한 저항성은 *Fusobacterium* 종, *Capnocytophaga*종 등 다른 치주세균들에서, 그리고 구강의 *Enterobacteriaceae*와 *staphylococci* 등에서도 발견되고 있다. β -lactam 저항성은 종종 tetracycline 저항성과 연관되어 있고, erythromycin과도 관련되어 있다³²⁾.

Tetracycline은 스케일링 후 치주질환 원인균을 억제시키기 위해 흔히 상용되어온 광범위 항생제이다. 난치성 치주염이 있는 성인형 치주염환자에게 전신적으로 tetracycline을 사용한 결과 치주낭 깊이가 매우 감소하였음을 보고하기도 하였다^{19,20)}. 하지만 Hawley 등은 치주질환치료를 받는 성인 25명중 24명에서 치은연하 치태내에 tetracycline에 내성이 있는 연쇄상구균이 발견되었다고 보고하였다³³⁾. 더욱이 전신적 tetracycline 치료는 기회감염을 일으키는 세균의 군집을 야기할 수도 있다³⁴⁾. Tetracycline 저항성은 리보솜의 방어기체나 약물의 방류에 의해서 일어나게 된다³⁵⁾. *tet(Q)*, *tet(M)*유전자는 tetracycline에 대한 리보솜 방어단백질에 작용하는 유전자이다³⁶⁾. 비슷한 연구에서 Williams 등³⁷⁾도 tetracycline 치료 후 모든 환자에서 tetracycline에 내성이 있는 연쇄상구균을 발견하였을 뿐 아니라 *Fusobacterium nucleatum*을 비롯한 여러 종의 세균에서 tetracycline에 내성을 가지고 있었다고 보고하였다. 본 연구에서도 *tet(M)*유전자는 100%에서 발견되었고, *tet(Q)*도 88.5%에서 발견되어 많은 어린이에서 이미 tetracycline에 대

한 내성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Macrolide계 항생제에 대한 저항성은 *ermF* 유전자에 암호화되어있다³⁸⁾. *ermF* 유전자는 23sRNA 아데닌에 특정한 N-메틸기 전이효소를 암호화하는데, 이 메틸기 전이효소는 세균의 23S rRNA에 메틸기를 붙인다. 이러한 메틸화는 모든 macrolide계 항생제가 세균의 리보솜에 결합하는 친화력을 떨어뜨리고 결과적으로는 모든 macrolide계 항생제에 저항성을 갖게 된다. Macrolide계 항생제에 대한 가장 흔한 항균저항 유전자인 *ermF*는 많은 다른 세균에서 발견된다. 게다가 *ermF*는 호기성 세균에서 발견되는 macrolide계 항생제에 저항성을 가지는 유일한 유전자이다^{39,40)}. 본 연구에서 어린이에서 이미 *ermF* 유전자가 87.4%로 높게 나타났다. 관련성의 조사에서 erythromycin 저항유전자 *ermF*와 tetracycline 저항유전자인 *tet(Q)*간에 관련성이 나타났는데, Odds ratio가 21.6으로 *tet(Q)*가 있는 대상에서는 없는 경우보다 *ermF*의 출현비율이 21.6배나 높아 높은 상관성을 보임을 알 수 있었다.

포도상구균종에서 보이는 gentamicin, tobramycin, kanamycin 등의 aminoglycoside에 대한 복합 내성은 *aacA-aphD* 유전자에 의해 유도된다^{41,42)}. 유전자 *aacA-aphD*는 아미노기 말단에서 아세틸기 전이효소의 역할을 함으로서 aminoglycoside의 활동을 억제한다. 본 연구의 어린이들의 9.2%에서 내성유전자를 가지고 있었다.

Meticillin에 저항성을 보이는 *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 발견되었고, 임상에서 meticcillin 사용 때문에 전 세계에 널리 퍼지게 되었다. MRSA는 심각한 문제를 일으켰는데, 왜냐하면 meticcillin 이외에도 다른 많은 항균제에 대한 저항성을 보인다는 것을 의미하기 때문이다. MRSA가 meticcillin에 내성을 가지게 된 기전은 결합 단백질인 PBP2를 발현하기 때문이다⁴³⁾. PBP2는 *mecA*가 암호화하고 meticcillin의 결합 친화력을 저하시키는 단백질이다. 글리코펩티드 항생제인 vancomycin은 MRSA를 포함하여 주요 그람-양성 병원균을 치료하기 위해 사용되어왔다. 내성 유전자 *vanA*는 펩티도글리칸에 결합하여 박테리아 세포벽의 전구체에 결합하는 것을 억제한다. 글리코펩티드의 과도한 사용은 vancomycin 저항성의 *S. aureus*의 출현을 유발시킬 수 있다. 본 연구에서 *vanA*는 48.5%에서 그리고 *mecA*는 9.2%에서 발견되었으며, 두 유전자간에 유의한 관련성이 있었으며 *mecA*가 있는 대상에서 *vanA* 출현비율이 8.8배 높게 나타났다.

Gaetti-Jardim 등⁴⁴⁾은 lactam에 대한 저항을 갖는 호기성 및 혐기성 세균의 출현율이 건강한 사람에게서 10%, 치은염 환자에서 32.6%, 치주염 환자에서 78.6%를 보였으며, aminoglycoside에 대한 저항률은 건강한 사람에게서 0%, 치은염 환자에서 23.6%, 치주염 환자에서 44.3%를 보였으며, tetracycline에 대한 저항률은 건강한 사람에게서 22%, 치은염 환자에서 22.5%, 치주염 환자에서 40%였다고 보고하였다. 이와 비교해볼 때 본 연구의 한국의 건강한 어린이에서 발견되는 항생제 내성유전자의 발현율이 매우 높음을 알 수 있었으며 특히 β -lactam 분해효소중 하나인 *bla_{TEM}*, cephalosporin 분해

효소에 해당되는 *cfxA* 유전자, 그리고 tetracycline에 대한 내성유전자인 *tet(M)*은 100%의 출현율을 보여 어릴 때부터 구강내 치면세균막에 흔히 사용하는 항생제에 대한 내성유전자를 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

치주질환의 치료에서 기계적 치주치료만으로도 임상적 조건을 상당히 개선시킬 수 있지만, 일부의 경우에는 여러 임상연구결과 치주세균의 일부가 기계적 치료와 보조적인 국소 및 전신적 항생제가 병용 사용될 때 치료의 효과를 증대시킬 수 있음이 보고된 바 있다. 하지만 이러한 항생제에 대한 내성 또한 내성 유전자를 통해 증가해서 질환의 예후에 악영향을 줄 수 있다. 이러한 항균제에 대한 저항성은 다른 종류의 세균이나 모세균으로부터 수평적 또는 수직적으로 획득할 수 있게 된다. 구강세균은 신체 내 다른 부위나 다른 개체로 쉽게 전염이 되기 때문에 다른 세균종으로 항균제 저항성을 쉽게 전파시킬 수 있게 된다. 특히 한국에서는 항생제 오남용에 따른 문제점들이 많이 제기되고 있는 현실이어서 이러한 문제점과 아울러 구강내의 세균들이 어떤 항생제 내성을 가지고 있는지 조사하는 것은 의미 있는 일이다. 구강내 세균이 항생제 내성을 가지고 있다면 치료는 복잡해질 수 있다. 따라서 기계적 치료를 완료한 후 치주병원균의 미생물학적 조사를 토대로 그 특징을 고려하여 항생제의 사용을 고려해야 할 것이다. 또한 치주감염을 해결한 후에는 각 개인에게 적합한 구강관리 유지 프로그램을 수행해서 이상적인 치태조절이 이루어지도록 해야겠다.

V. 결 론

항생제 사용에 따라 구강내 세균들이 가지게 되는 내성의 발현이 문제가 될 수 있다. 건강한 어린이에서 치주질환의 원인이 되는 세균들이 얼마나 분포하는지 조사하고, 또한 어린이들의 치면세균막에서 전신적으로 흔히 사용하고 있는 항생제들에 대한 내성유전자를 얼마나 가지고 있는지를 알아보고자 하였다. 어린이 87명(남자 44명, 여자 43명)의 치은연하 치태를 수집하여 5종의 치주질환 원인균 *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*의 출현율과 항생제의 내성유전자로 알려진 9종 *tet(Q)*, *tet(M)*, *ermF*, *aacA-aphD*, *cfxA*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *vanA*, *mecA*의 출현율을 PCR을 이용하여 조사하였다.

1. 치주질환 원인균으로 *F. nucleatum*은 95.4%, *T. forsythia*는 55.2%, *P. gingivalis*는 40.2%, *A. actinomycetemcomitans*는 5.7%, *T. denticola*는 3.4%이었다.
2. 항생제 내성유전자의 출현율 조사에서 cephalosporin 분해효소에 해당되는 *cfxA* 유전자는 100%에서 발견되었으며 β -lactam 분해효소 *bla_{TEM}*과 tetracycline 내성유전자인 *tet(M)*도 100%의 출현율을 보였다. *tet(Q)*는 88.5%, *bla_{SHV}*는 29.9%이었으며 macrolide계 *ermF* 유전자는 87.4%, vancomycin 내성 *vanA*는 48.5%의 출현율을 보였다. Aminoglycoside에 대한 복합 내성을 보이는 *aacA-aphD* 유전자와 meticcillin 내성유전자 *mecA*는

9.2%로 가장 낮은 출현율을 보였다.

3. 치주질환 원인균과 항생제 내성유전자와의 관계를 보면 *T. forsythia*와 *bla_{SHV}*간에 그리고 *P. gingivalis*와 *vanA*간에 유의한 상관성이 있었다. 항생제 내성유전자간의 상관관계는 *tet(Q)*와 *ermF* (0.514)간에 중등도의 상관성을 나타내었으며, *mecA*와 *vanA* (0.25)간에 유의한 상관성을 나타내었다.

참고문헌

1. Kolenbrander PE : Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*, 54: 413-37, 2000.
2. Mandell RL : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun*, 45:778-780, 1984.
3. Haffajee AD and Socransky SS : Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol*, 5:78-111, 1994.
4. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J : Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol*, 10:45-78, 1996.
5. Clark WB and Loe H : Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontol*, 2:72-82, 1993.
6. Christersson CE, Dunford RG, Glantz PO, et al. : Effect of critical surface tension on retention of oral microorganisms. *Scand J Dent Res*, 97(3):247-56, 1989.
7. Aitken S, Birek P, Kulkarni GV, et al. : Serial doxycycline and metronidazole in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients. *J Periodontol*, 63(2): 87-92, 1992.
8. Haffajee AD, Dibart S, Kent RL Jr, et al. : Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol*, 22(8):618-27, 1995.
9. Medeiros AA : Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*, Suppl 1:19-45, 1997.
10. Chopra I and Roberts M : Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2):232-60, 2001.
11. Roberts MC : Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends Microbiol*, 2(10):353-7, 1994.
12. Könönen E : Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med*, 32(2):107-12, 2000.
13. 이해송, 김선미, 최남기 등. : 정상인과 정신지체인, 다운증후군 환자에서 치주질환 원인균의 출현율. *대한소아치과학회지*, 33(3):457-468, 2006.
14. 김선미, 양규호, 최남기 등. : Real-time PCR을 이용한 치주질환 원인균의 정량적 분석. *대한소아치과학회지*, 35(3):494-503, 2008.
15. Sweeney EA, Alcoforado GA, Nyman S, et al. : Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 2(2):65-70, 1987.
16. Sjödin B, Crossner CG, Unell L, et al. : A retrospective radiographic study of alveolar bone loss in the primary dentition in patients with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, 16(2):124-7, 1989.
17. Golub LM, Wolff M, Lee HM, et al. : Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontal Res*, 20(1):12-23, 1985.
18. Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, et al. : Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. *J Clin Periodontol*, 20(8):557-62, 1993.
19. Rams TE and Keyes PH : A rationale for the management of periodontal diseases: effects of tetracycline on subgingival bacteria. *J Am Dent Assoc*, 107(1): 37-41, 1983.
20. McCulloch CA, Birek P, Aitken S, et al. : Efficacy of doxycycline in prevention of recurrent periodontitis. *J Dent Res*, 68:916, 1989.
21. McCulloch CA, Birek P, Overall C, et al. : Randomized controlled trial of doxycycline in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients: antimicrobial activity and collagenase inhibition. *J Clin Periodontol*, 17(9):616-22, 1990.
22. Söder PO, Frithiof L, Wikner S, et al. : The effects of metronidazole in treatment of young adults with severe periodontitis. *J Dent Res*, 68:710, 1989.
23. Söder PO, Frithiof L, Wikner S, et al. : The effect of systemic metronidazole after non-surgical treatment in moderate and advanced periodontitis in young adults. *J Periodontol*, 61(5):281-88, 1990.
24. Ohta Y, Okuda K, Takazoe I : Microbiological and clinical effects of systemic antibiotic administration in advanced periodontitis. *Bulletin of the Tokyo Dental College* 27:139-148, 1986.

25. Kornman KS, Newman MG, Flemming T, et al. : Treatment of refractory periodontitis with metronidazole plus amoxicillin or Augmentin. *J Dent Res*, 68:917, 1989.
26. Pavičić MJ, van Winkelhoff AJ, Douqué NH, et al. : Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol*, 21(2):107-12, 1994.
27. Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW : Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(11):2043-6, 1990.
28. Anwar H, Strap JL, Costerton JW : Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(7):1347-51, 1992.
29. Hedberg M, Lindqvist L, Bergman T, et al. : Purification and characterization of a new beta-lactamase from *Bacteroides uniformis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(7):1458-61, 1995.
30. Parker AC and Smith CJ : Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5):1028-36, 1993.
31. Fosse T, Madinier I, Hannoun L, et al. : High prevalence of *cfxA* beta-lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol*, 17(2):85-8, 2002.
32. Lacroix JM and Walker CB : Detection and prevalence of the tetracycline resistance determinant Tet Q in the microbiota associated with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 11(4):282-8, 1996.
33. Hawley RJ, Lee LN, LeBlanc DJ : Effects of tetracycline on the streptococcal flora of periodontal pockets. *Antimicrob Agents Chemother*, 17(3):372-8, 1980.
34. Bragd L, Wikstrom M, Slots J : Clinical and microbiological study of "refractory" adult periodontitis. *J Dent Res*, 64:234, 1985.
35. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA : Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev*, 5(4):387-99, 1992.
36. Roberts MC : Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*, 19(1):1-24, 1996.
37. Williams BL, Osterberg SK, Jorgensen J : Subgingival microflora of periodontal patients on tetracycline therapy. *J Clin Periodontol*, 6(4):210-221, 1979.
38. Jost BH, Field AC, Trinh HT, et al. : Tylosin resistance in *Arcanobacterium pyogenes* is encoded by an *Erm X* determinant. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(11):3519-24, 2003.
39. Roberts MC : Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe*, 9(2):63-9, 2003.
40. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, et al. : Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(12):2823-30, 1999.
41. Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA : Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene*, 81(2):361-367, 1989.
42. Rouch DA, Byrne ME, Kong YC, et al. : The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol*, 133(11):3039-52, 1987.
43. Utsui Y and Yokota T : Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 28(3):397-403, 1985.
44. Gaetti-Jardim EC, Marqueti AC, Faverani LP, et al. : Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. *J Appl Oral Sci*, 18(6):551-559, 2010.

Abstract

PERIODONTOPATHIC BACTERIA AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES OF
ORAL BIOFILMS IN CHILDREN

Seon-mi Kim¹, Nam-ki Choi¹, Seong-hoon Cho¹, Seok-woo Lee²,
Hoi-jeong Lim³, Hoi-soon Lim⁴, Mi-sun Kang⁵, Jong-suk Oh⁵

¹Department of Pediatric Dentistry and Dental Research Institute, ²Department of Periodontics and Dental education,
³Department of Orthodontics, ⁴Department of Dental education, School of Dentistry, Chonnam National University,
⁵Department of Microbiology, College of Medicine, Chonnam National University

The purpose of this study was to assess the prevalence of periodontopathic bacteria and antibiotic resistance determinants from oral biofilm of children. Subgingival dental plaque was isolated from 87 healthy children, and PCR was performed to determine the presence of 5 periodontal pathogens including *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, and nine resistance genes including *tet(Q)*, *tet(M)*, *ermF*, *aacA-aphD*, *cfxA*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *vanA*, *mecA*.

1. The prevalence of *F. nucleatum*, *T. forsythia*, and *P. gingivalis* was 95.4%, 55.2%, and 40.2%, respectively. In addition, the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* was 5.7%, while *T. denticola* was 3.4%.
2. In analysis of antibiotic resistance determinants, *cfxA*, *bla_{TEM}* and *tet(M)* were detected in all the samples tested. It was also found that the prevalence of *tet(Q)* showing tetracycline resistance, *bla_{SHV}* associated with resistance to β -lactams, *ermF* exhibiting erythromycin resistance, and, *vanA* resulting vancomycin resistance was 88.5%, 29.9%, 87.4%, and 48.5%, respectively. The *aacA-aphD* gene showing resistance to aminoglycosides and *mecA* gene harboring methicillin resistance exhibited the lowest prevalence with 9.2%.
3. In a correlation analysis between periodontopathic pathogens and antibiotic resistance determinants, it was found that there was a significant correlation between *T. forsythia* and *bla_{SHV}*. Also, *P. gingivalis* and *vanA* showed a correlation. Finally, *tet(Q)* and *ermF* showed a significant correlation (ϕ : 0.514) while *mecA* and *vanA* also showed a correlation (ϕ : 0.25).

Key words : Periodontopathic bacteria, Antibiotic resistance, Antibiotic resistance determinants, Oral biofilm, Polymerase chain reaction