

# 서울지방에서 분리된 *Corynebacterium diphtheriae* 균주에 관한 연구

서울대학교 의과대학 미생물학교실

<지도 이 승 훈 교수>

신 용 우 · 장 우 현

=Abstract=

## Studies on the Toxigenic Strains of *Corynebacterium diphtheriae* Isolated in Seoul Area

Yong Woo Cinn and Woo Hyun Chang

*Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University*

(Director: Prof. Seung Hoon Lee)

To understand the characteristics of 29 toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Seoul area, type classification, biochemical properties and antibiotic susceptibility pattern to 9 kinds of antibiotics were investigated.

The results obtained were summarized as follows;

I. Among the 29 strains, gravis type was the overwhelming majority (24 strains), followed by intermedius type (3 strains) and mitis type (2 strains).

II. Fermentation of glucose, maltose, lactose, trehalose and mannitol, nitrate reduction and urease were tested.

All strains fermented glucose, but not sucrose, lactose, mannitol and trehalose. 9 strains fermented maltose and 20 strains did not. Nitrate was reduced by 28 strains but not by one strain. In urease test one strain showed positive, 28 strains negative.

III. Antibiotic susceptibility test to penicillin G, chloramphenical, kanamycin, lincomycin, streptomycin, terramycin, erythromycin and gentamycin were carried out.

The MIC of erythromycin (0.025  $\mu\text{g/ml}$  26 strains and 0.05  $\mu\text{g/ml}$  3 strains) was the lowest, followed by ampicillin, lincomycin and penicillin G. Streptomycin showed the highest MIC.

서 론

디프테리아는 *Corynebacterium diphtheriae*가 병원

체로서, 환자 또는 임상증상이 없는 보균자로부터 직접 접촉이나 개달물에 의해 감수성이 있는 환자에게 전염된다<sup>1-4)</sup>. 비록 독소를 생산하지 않는 균주들도 경

미한 인두통을 일으키지만, 심한 임상증상 및 병리적 변화는 독소를 생산하는 균주에 의한 것이다<sup>3,4,5,7)</sup>. 항독소로 환자를 치료한 후에도 수주 내지 수개월동안 균을 보유하고 있는 예가 있으며<sup>1,2,4)</sup>, 실제로 보균자에 의해 발생한 유행이 보고된 바 있다<sup>21)</sup>.

우리나라에서는 매년 수백명의 디프테리아 환자가 발생되고 있어<sup>8,9)</sup> 아직도 중요한 소아전염병의 하나로 남아 있으며, 예방접종 및 환자치료와 아울러 보균자의 철저한 치료도 중요하다<sup>16,21)</sup>.

본 연구에서는 서울지방에서 발생한 디프테리아 환자로부터 분리된 독소생산능력이 있는 균주 29주에 대하여, 형 분류, 생화학적 성상 및 항생제에 대한 감수성 양상을 조사하였다.

### 재료 및 방법

1) **균주**: 서울대학교 의과대학 부속병원, 국립의료원 및 서대문 시립병원에 내원한 디프테리아를 의심하는 환자에서 분리된 *Corynebacterium diphtheriae* 균주중 Elek<sup>10)</sup>의 방법을 개량한 PGT 한천 gel 면역확산법에 준해 독소생산이 확인된 29주를 대상으로 하였다.

2) **생화학적 검사**: 당분해 검사는 48시간 배양후에, urease 검사 및 nitrate 환원검사는 24시간 배양후 판독하였다.

3) **항생제에 대한 감수성 검사**: 한천회석방법에 준하여<sup>15,16)</sup>, 시험균주를 brain heart infusion에 18시간 배양하여(ml 당 대략 10<sup>8</sup>의 생균수를 함유), 10배 희석한 것을 1 loop씩 항생제 함유된 brain heart infusion agar에 식균, 37°C에서 48시간 배양후, colony가 형성되지 않은 항생제의 최저농도를 최저억제농도(minimum inhibitory concentration, 이하 MIC로 약기함)로 하였다.

사용한 항생제

항생제 이름	상품명	제약회사	Lot No.
a) Penicillin G.	프로나펜	Pfizer	233-37002

b) Chloramphenicol	신도마이세린	국제약품	11081
c) Kanamycin	케이마이신	종근당	73001
d) Lincomycin	린코신	한국업존	
e) Streptomycin	스트렙토마이신(유한)	유한양행	001
f) Oxytetracyclin	테라마이신	Pfizer	233-51018
g) Ampicillin	암셀린	종근당	72009
h) Erythromycin	에리스로	종근당	72001
i) Gentamycin	겐타마이신	유한양행	KR3AMK3

### 성 적

#### I) 형 분류

*C. diphtheriae* 29주 가운데 tellurite brain heart infusion agar에서의 colony 모양, starch 분해, 액체배지에서 발육양상등을 종합검토한 결과 gravis가 24주로 가장 많았으며, mitis가 2주, intermedius가 3주였다(표 1).

Table 1. Type classification of toxigenic strains

Gravis	24
Mitis	2
Intermedius	3
Total	29

#### I) 생화학적 성상

*C. diphtheriae* 29주에 대한 생화학적 성상을 검사한 결과, glucose는 모두 분해하였으나 maltose는 9주가 분해하고 20주가 분해하지 않았다. Sucrose, lactose, trehalose 및 mannitol은 모두 분해하지 않았다. Urease 검사는 29주 가운데 28주가 음성이었으며 1주가 양성이었다. Nitrate 환원검사는 28주가 양성, 1주가 음성반응을 보였다(표 2).

#### II) 항생제에 대한 감수성양상

*C. diphtheriae* 29주를 각 형 별로 나누어 9종의 항

Table 2. Biochemical properties of toxigenic strains

	Glucose		Maltose		Sucrose		Lactose		Trehalose		Mannitol		Starch		Urease		Nitrate reduction	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Gravis	24		7	17	24		24		24		24		24		24		24	
Mitis	2		1	1	2		2		2		2		2		2		2	
Intermedius	3		1	2	3		3		3		3		3	1	2		2	1
Total	29		9	20	29		29		29		29		24	5	1	28	28	1

**Table 3. Antibiotic sensitivity (minimum inhibitory concentration)**

MIC $\mu\text{gm/ml}$		25.6	12.8	6.40	3.20	1.60	0.80	0.40	0.20	0.10	0.05	0.025	0.013	0.006
Penicillin G.	G.							7	16	1				
	M.								1	1				
	I.							2		1				
	T.							9	17	3				
Chloramphenicol	G.							13	11					
	M.							2						
	I.		1				1	1						
	T.		1				1	16	11					
Kanamycin	G.					2	5	16	1					
	M.						1		1					
	I.								1					
	T.	1	1			2	6	16	3					
Lincomycin	G.									20	4			
	M.									2				
	I.								1	1	1			
	T.								1	23	5			
Streptomycin	G.	3	1	3	16	1								
	M.	2	1		1									
	I.				1									
	T.	5	2	3	18	1								
Tetracycline	G.						1	2	18	3				
	M.								2					
	I.		1					1	1					
	T.		1				1	3	21	3				
Ampicillin	G.								2	17	4	1		
	M.									1	1			
	I.								1	2				
	T.								3	20	5	1		
Erythromycin	G.										1	23		
	M.											2		
	I.										2	1		
	T.										3	26		
Gentamycin	G.							1	9	14				
	M.								1	1				
	I.						1	1		1				
	T.						1	2	10	16				

G : Gravis type    M : Mitis type    I : Intermedius type    T : total

생체에 대한 MIC를 측정된 결과, erythromycin의 MIC(0.025  $\mu\text{g/ml}$  26주, 0.05  $\mu\text{g/ml}$  3주)가 가장 낮았으며, 그 다음이 ampicillin(0.25  $\mu\text{g/ml}$  1주, 0.05  $\mu\text{g/ml}$  5주, 0.10  $\mu\text{g/ml}$  20주, 0.20  $\mu\text{g/ml}$  3주), lincomycin(0.05  $\mu\text{g/ml}$  5주, 0.10  $\mu\text{g/ml}$  23주, 0.20  $\mu\text{g/ml}$  1주) 그리고 penicillin G (0.10  $\mu\text{g/ml}$  3주, 0.20  $\mu\text{g/ml}$  17주, 0.40  $\mu\text{g/ml}$  9주) 등이었다. MIC가 가장 높았던 것은 streptomycin (1.60  $\mu\text{g/ml}$  1주, 3.20  $\mu\text{g/ml}$  18주, 6.40  $\mu\text{g/ml}$  3주, 12.8  $\mu\text{g/ml}$  2주, 25.6  $\mu\text{g/ml}$  5주)이었다(표 3).

## 고 안

*C. diphtheriae*는 조적 침투력이 미약하며, 디프테리아 병인에서 가장 중요한 것은 독소생산능력 여부이다<sup>2,4,5,7</sup>. 이 독소생산능력과 균주 형태의 연관성에 대한 많은 학자들의 연구가 있었다<sup>4,7,18</sup>.

본 실험의 결과에 의하면 독소생산균주 29주 가운데 *gravis*가 24주로서 *intermedius* 3주 및 *mitis* 2주보다 압도적으로 많은 것으로 나타났으나, McLaughlin<sup>17</sup>과 Zalma<sup>20</sup>등에 의해 독소생산균주의 형 분포가 미국의 각지역에 따라 큰 차이가 있음이 보고된 것을 감안하면, 본 실험의 결과도 우리나라의 다른 지방에서 분리된 균주들과 상당한 차이가 있을 것으로 추측된다.

본 실험에서 *C. diphtheriae* 29주에 대한 생화학적 성장검사 결과 glucose, maltose, sucrose, lactose, mannitol 및 starch의 분해검사는 대체로 Wilson<sup>14</sup>, Blair<sup>21</sup> 및 Breed<sup>22</sup>의 기술과 일치하였다. Wilson 및 Breed는 nitrate 환원검사가 *C. diphtheriae*에서 모두 양성이라 하였으나 본 실험에서는 양성이 28주, 음성이 1주이었다. Arden은 *mitis*형 *belfanti*주에서는 nitrate가 모두 음성이라 하고, 또 Moore<sup>23</sup>, Gundersen<sup>24</sup> 및 Groman<sup>25</sup>등은  $\beta$ -phage에 의해 전환된 *mitis*형 *belfanti*주가 독소를 형성함이 보고된 바 있으므로, 본 실험에서 nitrate 환원검사에 음성인 균주가 *belfanti*주로 의심되었으나, maltose 분해반응에서 음성을 나타냈으므로 *belfanti*주가 아닌 것으로 생각하였다. 본 실험의 urease 검사 결과 1주가 양성 28주가 음성이었다. Wilson 및 Blair에 의하면 *C. ulcerans*는 diphtheria 독소를 생산하는 일이 있으며 urea를 분해하므로 본 실험에서 urease 검사에 양성인 균주를 *C. ulcerans*로 의심하였으나 nitrate 환원 검사가 음성이었으며, 또 trehalose 분해반응이 음성이었으므로 *C. ulcerans*로 간주하지 않았다.

항독소로 디프테리아환자를 치료한 후에도 수주 또는 수개월동안 균을 배출하는 것은 역학적으로 중요한 문제이며<sup>1,2,4,16,21</sup>, 보균자의 철저한 치료가 긴요하다고 생각된다. 본 실험에서 9종의 항생제에 대해 MIC를 측정된 결과, erythromycin의 MIC가 0.025  $\mu\text{g/ml}$  26주, 0.05  $\mu\text{g/ml}$  3주로서 가장 낮았으며, 이는 Gordon<sup>16</sup>등 및 Jackson<sup>18</sup>등이 실험한 바와 근사한 경향을 보였다.

일반적으로 보균자의 치료에 천거되고 있는 ampicillin 및 penicillin G의 MIC도 다른 항생제에 비해 낮았으며, lincomycin의 MIC도 본 실험에서는 0.05  $\mu\text{g/ml}$  5주, 0.10  $\mu\text{g/ml}$  23주, 0.20  $\mu\text{g/ml}$  1주로서 Gordon<sup>16</sup>등의 실험결과(0.40  $\mu\text{g/ml}$  13주, 0.80  $\mu\text{g/ml}$  1주)와는 차이가 있었다. Gordon 등은 미국에서 디프테리아 균의 항생제에 대한 감수성양상이 1950년대<sup>19</sup>와 1970년대<sup>16</sup>에 있어서 큰 변화가 없음을 보고하였으나, 우리나라에서는 이 부분에 대한 연구조사가 충분치 못해 시간적인 차이에 따른 비교는 할 수 없었다. *Gravis*, *mitis* 및 *intermedius*형 사이의 감수성 양상의 차이는 *intermedius* 및 *mitis*의 균주가 적어 비교할 수 없었다.

## 결 론

서울지방에서 분리된 독소생산력이 있는 *Corynebacterium diphtheriae* 29주에 대해, 형 분류, 생화학적 성장 및 항생제에 대한 감수성 양상을 검사하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 균주의 형 분포는 *gravis* 24주, *mitis* 2주 및 *intermedius*가 3주였다.

2) 생화학적 성장검사에서 glucose는 모두 분해하였으며 sucrose, lactose, mannitol 및 trehalose 등은 모두 분해하지 않았다. Maltose는 9주가 분해하고 20주가 분해하지 않았다. Urease는 1주가 양성, 28주가 음성이었으며, nitrate 환원 검사는 28주가 양성이었고 음성을 보인 것은 1주였다.

3) Penicillin G, chloramphenicol, kanamycin, lincomycin, streptomycin, tetracycline, ampicillin, erythromycin 및 gentamycin에 대한 최저억제농도(minimum inhibitory concentration)를 측정된 결과 erythromycin의 MIC가 0.025  $\mu\text{g/ml}$  26주, 0.05  $\mu\text{g/ml}$  3주로서 가장 낮았으며, ampicillin, penicillin G, lincomycin이 그 다음이었고, streptomycin의 MIC는 가장 높았다.

## REFERENCES

- 1) Barnet, H.L.: *Pediatrics*, 15th ed., p. 614. Butterworths. 1972.
- 2) Kissane, J.M. and Smith, M.G.: *Pathology of Infancy and Childhood*, The C.V. Mosby Company. p. 48. 1967.
- 3) Beeson, P.B. and Modermott, W.: *Cecil-Loeb Textbook of Medicine*, W.B. Saunders Company. 13th ed., p. 557. 1971.
- 4) Dubos, R.J. and Hirsch, J.G.: *Bacterial and Mycotic Infections of Man*, 5th ed., J.B. Lippincott Company. p. 468. 1965.
- 5) Edward, D.G. and Allison, V.D.: *Diphtheria in immunized persons with observations on a diphtheria-like disease associated with non-toxicogenic C. diphtheriae*. *J. Hyg.*, 49:205, 1951.
- 6) Davis, B.D., et al.: *Microbiology*, Hoeber Medical Division, p. 672. 1970.
- 7) Amies, C.R.: *The pathogenesis of diphtheria*. *J. Path. Bact.*, 67:25, 1954.
- 8) 보건사회통계연보: 보건사회부, 1967-1970.
- 9) 한국통제연감: 경제계획원, 1971.
- 10) Elek, S.D.: *The plate virulence test for C. diphtheriae*. *J. Clin. Path.*, 2:250, 1949.
- 11) Barksdale, W.L. and Pappenheimer, A.M., Jr.: *Phage-host relationship in non-toxicogenic and toxicogenic diphtheria bacilli*. *J. Bacteriol.*, 67: 220, 1954.
- 12) Anderson, J.S., Happold, F.C., McLeod, J.W. and Thompson, J.G.: *On the existence of two forms of diphtheria bacillus-B. diphtheriae gravis and B. diphtheriae mitis-and a new medium for their differentiation and the bacteriological diagnosis of diphtheria*. *J. Path. Bact.* 34:667, 1931.
- 13) McLeod, J.W.: *The types mitis, intermedius and gravis of Corynebacterium diphtheriae*. *Bact. Rev.* 7:1, 1943.
- 14) Wilson, G.S. and Miles, A.A.: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 5th ed., The Williams and Wilkins Company, Vol. 1. p. 583.
- 15) Ericsson, H.M. and Sherris, J.C.: *Antibiotic Sensitivity Testing, Report of an International Collaborative Study. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica section B 1971 supplement No. 217. Munksgaard, Copenhagen.*
- 16) Gordon, R.C., Yow, M.D., Clark, D.J. and Stephenson, W.B.: *In vitro susceptibility of Corynebacterium diphtheriae to thirteen antibiotics*. *Applied Microbiology*, Mar. 1971. p. 548.
- 17) McLaughlin, J.V., Bickham, S.T., Wiggins, G.L., Larsen, S.A., Balows, A. and Jones, W.L.: *Antibiotic susceptibility patterns of recent isolates of Corynebacterium diphtheriae*. *Applied Microbiology*, May 1971. p. 844.
- 18) Clauberg, K.W.: *Zur Frage der Unterschiedlichkeit der Diphtheriebacillentyptoxine*. *Klin. Wschr.*, 18:1490, 1939.
- 19) Jackson, G.G., Chang, S., Place, E.H. and Finland, M.: *Sensitivity of diphtheria bacilli and related organisms to nine antibiotics*. *J. Pediat.* 37:718, 1950.
- 20) Zalma, V.M., Older, J.J. and Brooks, C.F.: *The Austin, Texas diphtheria outbreak*. *J.A.M.A.*, 211:2125, 1970.
- 21) Blair, J.E., et al.: *Manual of Clinical Microbiology*. 1970. American Society for Microbiology. Bethesda Md.
- 22) Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Company, p. 582. 1971.
- 23) Moore, M.S. and E.L. Parsons: *A study of a modified Tinsdale's medium for the primary isolation of Corynebacterium diphtheriae*. *J. Inf. Dis.*, 102:88, 1958.
- 24) Gundersen, W.B.: *Investigation on the serological relationships of Corynebacterium diphtheriae, type mitis, and Corynebacterium belfanti*. *Acta Pathol. et Microbiol. Scand.*, 47:65, 1959.
- 25) Groman, N.B. and K. McCormick: *Relation between adsorption of diphtheria phage and its inactivation by an oleic acid-activated inhibitor*. *J. Bacteriol.*, 81:394, 1961.