

Nocardia brasiliensis 의 分離 및 生物學的 性狀에 關하여

서울大學校 醫科大學 微生物學 教室 및 同 附屬病院 微生物 檢査室

石 鍾 聲 · 李 再 喆 · 李 承 薰

=Abstract=

Studies on the Biological Properties of Nocardia Brasiliensis Isolated from Pus

Jong-Sung Suk, Jae-Chul Lee and Sung-Hoon Lee

Dept. of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University and Section of Microbiology, Laboratory Medicine, Seoul National University Hospital

The majority of Nocardial infections reported in North America are *N. asteroides* while those in Latin America are *N. brasiliensis* species. Infection with *N. brasiliensis*, to our knowledge, has not previously been reported in Korea.

The author isolated one strain of *Nocardia brasiliensis* from the abscess of right buttock of 23 month old female leukemic patient who was treated with methotrixate for five months at the Seoul National University Hospital.

The morphological characteristics and biological properties were similar with the R.E. Gordon's description.

The results are summarized as follow:

1. After 5 days incubation on Sabouroud's glucose agar, the acid fast character appeared partially.
2. Tyrosine, casein and urea were decomposed by 7 days incubation both at room temperature and at 37°C.
3. Sod, citrate and sod. acetate were utilized at 22°C and 37°C after 28 days incubation while the sod. benzoate utilization was negative.
4. The survival range of temperature was from 10°C to 40°C.
5. Dulcitol, galactose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, sorbitol, trehalose and xylose fermentations were not observed up to 28 days, while the fermentation of glucose and inositol were positive.

I. 緒 論

우리나라의 眞菌 感染症은 皮膚絲狀菌에 依한 表在性 白癬症이 大部分을 點하고 있었으나¹⁾ 眞菌의 感染樣相은 間接的으로 各種의 地理的 條件, 國民의 生活 環境, 外國과의 交易 및 交通等의 여러 要件에 따라 菌의 分布에 地域的 變動이 생겨왔을뿐만 아니라²⁾ 直

接的으로는 steroid 및 抗癌劑의 長期間 投與, 一般의 인 衰弱疾患 感은 免疫學的 防禦能力의 缺乏 또는 弱 化等에 依한 感染症例가 많았다³⁻⁶⁾.

Nocardia 菌屬은 土壤에서 棲息하는 菌種으로서 感染源은 exogenous 하다고 알려지고 이 菌種의 感染에 依한 眞菌腫, 또는 皮下 組織 感染症은 熱帶 또는 亞 熱帶에서 發見되고 全身感染症은 全世界를 通해서 發 生하는 것으로 알려지고 있으나⁷⁾ 局部的 感染症은 地

域的으로 크게 遍在하여 *Nocardia* 菌種中 *N. asteroides* 는 北美州에서 *N. brasiliensis* 는 Latin America 에서 間或 症例 報告가 되고 있을 뿐이며¹⁾ 過去에는 우리나라에서의 *Nocardia* 菌 感染症例를 거의 찾아 볼 수 없을 뿐더러 특히 *N. brasiliensis* 分離例는 처음인 것으로 生覺되어 急性 淋巴球性 白血病 患者에서 分離한 이 菌株의 生物學的 性狀과 함께 報告하는 바이다.

II. 實驗方法 및 成績

1. 分離源

急性 淋巴球性 白血病的 診斷下에 1年 11個月의 少女가 1974年 12月 9日 부터 1974年 12月 31日까지 서울大學校 醫科大學 附屬病院에 入院 加療後 狀態가 良好하여 一旦 退院하여 外來診療所에 通院하면서 繼續 抗癌劑인 Methotrexate를 右側 臀部에 注射하여 治療하던중 偶然히도 注射部位 側面에 膿瘍이 發生하여 外科外來에서 局部的 手術까지 받았으나 잘 治癒되지 않고 惡化되었음으로 1975年 3月 14日 再入院하여 膿을 培養檢査하게 되었다.

2. 直接 塗沫

a. Gram 染色 : Gram 陽性的 球型樣(cocoid), 桿型 및 纖細하고 分枝를 이루는 菌絲型을 나타 내었다(第 4圖).

b. Ziehl-Neelsen 染色 : 不規則하고 部分的으로 抗酸性을 나타 내었다.

c. Hematoxylin-Eosin 染色 : "Sulfur" 顆粒의 觀察을 爲하여 採取된 膿을 3層의 거-즈에 餘過 및 H.E 染色을 하였으나 發見차 못하였다.

3. 培地

a. Tyrosine 및 Xanthine 의 分解 : 培地는 Nutrient agar 23g, Tyrosine 5g (Xanthine 4g). 蒸溜水 1,000 ml의 處方으로 滅菌 製造하여 植菌後 37°C에서 7日間 分解能力을 觀察하였다.

b. 澱粉의 加水分解 : 培地는 peptone 5g, beef extract 3g, agar 15g, 蒸溜水 1,000ml의 處方으로 干先 高壓蒸氣滅菌시키고 冷蒸溜水 40ml에 potato starch 10g를 浮遊시킨 다음 即時 上記 培地에 混合시킨다. 平板培地에 植菌하여 28°C에서 5日間 培養하여 平板培地上에 95%의 ethanol 8ml를 붓고 菌集落 周圍의 透明帶의 有無를 觀察하였다.

c. Gelatin 의 加水分解 : 培地는 peptone 5g, beef

extract 3g, agar 15g, 蒸溜水 1,000ml의 處方으로 pH 7로 하고 即時 冷蒸溜水 40ml에 gelatin 4g의 溶解液을 添加하였다. 植菌後 28°C에서 5日間 培養하고 conc HCl 20ml에 HgCl₂ 15g의 溶解液을 平板培地上에 붓고 菌集落 周圍의 透明帶의 有無를 觀察하였다.

d. 炭素源으로서의 有機酸 利用 : 培地는 NaCl 1g, MgSO₄ 0.2g, (NH₄)₂HPO₄ 1g, KH₂PO₄ 0.5g, agar 15g, 蒸溜水 1,000ml에 Sod. acetate, Sod. benzoate 및 Sod. citrate를 各各 2g式 添加하고 다시 0.04%의 phenol red 20ml를 加하고 pH 6.8로 調整하여 製造하였다.

e. Lysozyme 에 對한 抵抗力 : 蒸溜水 100 ml內에 0.01N-HCl이 包含되도록 稀釋하고 다시 lysozyme 0.1g를 添加하여 20分間 끓인 다음 室溫에서 冷却시키고 다시 滅菌된 0.01N-HCl液을 加하여 100ml되도록 한다.

Glycerol broth (peptone 5g, beef extract 3g, glycerol 70ml, distilled water 1,000ml, pH 7.0) 95ml에 上記液 5ml를 添加한 다음 試驗管에 2.5ml式 分注하여 使用하였고 lysozyme이 包含되지 않은 培地를 對照群으로 하여 植菌後 28°C에서 20日間 培養하여 觀察하였다.

f. 糖分解 : 培地는 (NH₄)₂PO₄ 1g, KCl 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.2g를 蒸溜水 1,000ml에 溶解시키고 0.04% brom cresol purple 15ml를 添加하여 pH 7.0으로 調整하여 滅菌하였으며 各種 糖類는 各各 10%가 含有되게 하여 植菌後 28日間 觀察하였다.

4. 培 養

膿을 血液寒天 및 Sabouroud's glucose agar 培地 各各 4枚에 植菌하여 呼吸性 및 嫌氣性(steel wool method)으로 培養하고 同時에 thioglycollate broth에서도 22°C와 37°C에서 各各 培養하였다.

5. 形態學의 特徵

呼吸性으로 培養된 平板培地上에서 22°C와 37°C에서 各各 2日에 이르러 濕性, 灰白色, 平滑하고 粘稠한 菌集落이 1mm 以內의 크기로 形成 되었으며 培養時間이 經過함에 따라 漸次커져서 10日에는 直徑이 8mm에 이르렀으며 顆粒狀의 菌集落이 表面이 不規則하게 주름이 잡히고 乾燥하고 皮殼의 形態였고 菌集落 自體의 周圍에는 粉筆의 灰白色이 었으나 中央에는 若干의 黃色으로 着色 되었으며 非溶血性이 었고 特有的 嗅味를 띄었다. 肉眼으로는 皮膚絲狀菌과 같은 菌絲狀芽

Table 1. Key to the species of genus Nocardia

- I. Extensive mycelium produced because fragmentation does not begin until after 5 days incubation. Colonial texture, Leathery, dry crusty or flaky. Thin aerial mycelium commonly present. Long, branched filaments persist in old cultures.
- A. Acid-fast or partially acid-fast.
1. Substrate mycelium white, gray or buff.
 1. *Nocardia farcinica*
 2. Substrate mycelium some shade of yellow, orange or red.
 - a. Pathogenic
 - b. Nitrates reduced to nitrites
 - c. Xanthine hydrolyzed
 2. *Nocardia otitidis-caviarum*
 - cc. Xanthine not hydrolyzed
 - d. Gelatin hydrolyzed
 3. *Nocardia brasiliensis*
 - dd. Gelatin not hydrolyzed
 4. *Nocardia asteroides*
 - bb. Nitrates not reduced to nitrites
 5. *Nocardia transvalensis*
 - aa. Non-pathogenic

(Bergey's Manual of determinative bacteriology, 8th ed. The William and Wilkin's company 1974)

Table 2. Biological characteristics of *Nocardia brasiliensis*

Acid-Fastness	+	Resistance to lysozyme	+
Decomposition of		Utilization of	
Casein	+	Citrate	+
Xanthine	-	Benzoate	-
Tyrosine	-	Acetate	+
Gelatin	+	Acid from	
Urea	+	Adonitol	-
Hydrolysis of		Arabinose	-
Starch	+	Dulcitol	-
Aesulin	+	Galactose	-
Nitrite from nitrate	+	Glucose	±
Growth at		Glycerol	-
10°C	+	Inositol	±
15°C	+	Lactose	-
20°C	+	Maltose	-
25°C	+	Mannitol	-
30°C	+	Raffinose	-
35°C	+	Rhamnose	-
40°C	+	Sorbitol	-
45°C	-	Trehalose	-
50°C	-	Xylose	-

No. 1)

b. 生物學的 性狀

分離培養된 *Nocardia brasiliensis* 는 5日內에 pot. nitrate 를 nitite 로 環元시켰고 gelatin 을 加水分解시켰으나 xanthin 은 分解되지 못하였다. Urea 分解 酵素가 陽性이고 tyrosine, casein, starch 및 aesculin 이 加水分解되었다.

培養溫度에 對한 生長態度는 10°C 以上 5°C 間隔으로 50°C 까지 사이에 生長을 觀察한 結果 10°C 에서 40°C 까지는 培養되었으나 45°C 以上에서는 全く 生長이 없었다.

菌의 溶解酵素인 lysozyme 에 對해서는 抵抗力이 있었다.

有機酸 則 Sod. citrate, Sod. benzoate 및 Sod. acetate 를 利用하여 發育되었다.

15種의 含水炭素에 對한 醱酵能力은 거의 없는데 反해서 glucose 와 inositol 에 對해서는 28日間 培養結果에서도 確實한 醱酵能力을 認定할 수 없었다(Table No. 2).

III. 考 接

Nocardia brasiliensis 는 1909年 Lindenberg¹⁰⁾ 氏가 發見한 以來 Brazil, Mexico 와 Latin America 에 遍在되어 局部的 또는 全身感染症이 發生되어 왔고 間或

成長은 볼 수 없었으나 다만 velvety 한 菌絲體樣 集落을 形成하였다(第1~3圖 參照).

Sabouroud's glucoes 培地の 菌集落 後面에는 灰白色이 若干 쉬인 거의 黃色을 程하였다.

Thioglycollate broth 에서는 2日內에서 灰白色(거의 粉筆色)의 얇은 顆粒狀의 集落이 적게나마 生기기 始作하여 10日後에는 直徑이 3mm 의 크기로 液體培地上層에 形成되었다.

a. 菌集落에서의 塗沫 染色: 培地上에서 植菌後 3日 間 培養한 菌集落에서 塗沫染色하여 觀察한 結果 gram 染色에서는 gram 陽性이 었으나 coccoid 또는 桿菌狀의 形態는 드물었고 反面에 纖細하고 分枝를 이루는 絲狀菌이 大部分이 었으나 10日 以後에는 菌集落 自體의 周邊에는 不規則하게 分枝를 이룬 纖細한 絲狀型이 많았던 反面에 菌集落 中央에서는 coccoid 및 復雜多型的 桿菌이 絲狀型과 混合되어 觀察되었다.

Ziehl-Neelsen 染色에서는 3日間 培養된 菌集落에서 의 抗酸菌을 發見치 못하였으나 5日이 經過된 菌集落에서 部分的 抗酸性을 나타내었다.

5. 菌의 同定

菌의 分類는 Bergey⁹⁾ 氏의 方法에 依據하였다(Table

美國에서도 症例가 報告되어 왔을뿐 아니라, 1964년에 California에서 고양이에서도 感染症例를 報告한바 있다¹²⁾. 英國에서는 1964년에 이르러 처음으로 M.S. Gordon氏¹¹⁾에 의하여 足部位의 膿創에서 分離報告된 바 있으나 著者들은 우리나라에서 分離報告된 記錄을 찾아 볼 수 없어 처음인 것으로 生覺되었다.

呼氣性 放射線菌, 即 *N. asteroides*, *N. madure*, *N. pelletieri* 등과 *Streptomyces* 및 *Mycobacterium* 屬間의 菌의 培養, 顯微鏡의 形態 및 其他 生物學的 性質이 類似한 點이 많아 分離 同定過程에서 混沌을 갖어 올 수도 있었다.

그러한 類似한 菌의 性質은 上記의 菌種間의 免疫學的 即 凝集反應, 沈降反應 補體結合反應 및 皮膚反應 등의 非特異性을 超來하고 있다¹³⁾.

Bergey¹⁰⁾氏의 分類方法에 의한 *N. brasiliensis*의 生物學的 同定の 重要한 根據는 抗酸性을 갖으면서 nitrate를 nitrite로 還元을 시키고 xanthine을 分解시키지 못하나 gelatin을 加水分解시키는데 있다고 할 수 있겠으나 R.E. Gordon氏¹⁴⁻¹⁶⁾ 등은 *Nocardia*의 여러 菌種間 및 *streptomyces*의 生物學的 差異를 xanthin과 gelatin의 分解能力以外에 casein, tyrosine 및 urea의 分解與否를 同定過程에서 補充하고 있다.

即 casein에 對해서는 *N. asteroides*와 *N. caviae*가 分解能力이 없었으나 *N. brasiliensis*, *N. madure*, *N. pelletieri*와 *streptomyces*가 分解시켰다. Tyrosine에 對해서는 *N. caviae*가 전혀 反應이 없었던 반면에 *N. asteroides* 2%, *N. madure* 86%, *N. brasiliensis*, *N. pelletieri*와 *streptomyces*가 各各 100%의 分解能力이 있다. Urea에 對하여서는 *N. asteroides* 97%, *N. caviae*와 *N. brasiliensis*가 各各 100%로 分解시켰으나 *N. madure*, *N. pelletieri* 및 *streptomyces*가 전혀 分解能力이 없었다.

이러한 性質은 이번 分離된 *N. brasiliensis*의 性質과 거의 一置되었으며 菌同定過程에 있어서도 滿足한 成績이었다.

溫度에 對한 生長能力은 R.E. Gordon等¹⁴⁻¹⁶⁾은 10°C, 30%, 28°C에서 37°C사이에 100%, 40°C에서 56%, 45°C에서 2%, 및 50°C에서는 전혀 生長할 수 없었던 成績은 이번 分離株에서도 同一視되었다.

Lysozyme에 對한 抵抗性이 있었던 點과 Sod. acetate, Sod. benzoate 및 Sod. citrate를 炭素源으로 利用度는 各各 100%, 0%, 및 98%의 成績도 類似하였다.

15種의 糖類에 對한 醱酵能力은 22°C와 37°C에서 各各 28日間 培養하였으나 酸을 形成치 못하였으며

glucose와 inositol에 對해서는 酸의 形成與否가 確實치 않았고 R.E. Gordon¹⁴⁻¹⁶⁾氏에 依하면 glucose 97%, mannitol 94% 및 inositol 100%의 酸을 形成하였던바 이런 性質의 差異는 地域的 變動에서 오는 變異株의 出現이라고도 解釋된다.

真菌種의 感染은 網狀內皮 細胞系를 包含하는 疾患. 糖尿 및 痛 疾患과 같은 一般의 免疫體의 防禦能力이 弱화되는 衰弱疾患에서 真菌에 依한 合併症이 많을 뿐만 아니라¹⁷⁾ 特히 steroid 또는 抗癌劑의 長期 投與時에 發生頻度가 높다고 알려져 있다³⁻⁶⁾.

그러나 *N. asteroides*의 感染은 特히 急性 白血病, 慢性 骨髓性 白血病, 慢性 淋巴球性 白血病과 其他 腫瘍性 疾患에 있어서의 合併症 發生率이 높다고 알려진바¹⁸⁾ *N. brasiliensis* 菌의 境遇에는 世界的으로 比較的 分離된 症例가 드물므로 統計數值에 依한 不正確으로 말미아마 *N. asteroides*에와 반듯이 一置하리라고는 考慮되지 않으나 우리나라에서 처음으로 分離된 이번 예도 急性 淋巴球性 白血病의 患者에 抗癌劑인 methorexate를 繼續 使用되어 왔으므로 *N. brasiliensis*도 *N. asteroides*에서와 같이 白血病 및 抗癌劑 投與時에 合併症으로 發生頻度가 높을 것으로 思慮된다.

IV. 結 論

1975年 3月 14日 서울大學校 醫科大學 附屬病院에서 1年 11個月의 少女가 急性 淋巴球性 白血病으로 因하여 methotrexate를 右側 臀部에 注射하여 治療하던중 注射部位 側面에 膿瘍이 發生하여 그 部位에서 *Nocardia brasiliensis*를 分離 同定하였다.

N. brasiliensis 菌株의 生物學的 性狀은 R.E. Gordon¹⁴⁻¹⁶⁾氏의 成績과 거의 一置함을 보았으나 糖類 分解 結果에서 多少 差異點을 發見하였다.

참 고 문 헌

- 1) Hong, sik, Kim: *Mycologic studies on dermatophytosis in Korea, Medical digest, 3:485, 1961.*
- 2) Hong sik, Kim: *The statistical and Mycological survey on superficial dermatomycoses, The Korean Journal of dermatology, Volume 9, Number, 1, 1970.*
- 3) Geller, W.A.: *A study of antibody formation in patients with malignant lymphomas, J. Lab.*

- Clin. Med.*, 42:232, 1958.
- 4) Torack, R.M.: *Fungus infections associated with antibiotic and steroid therapy*, *Amer. J. Med.*, 22:872, 1957.
 - 5) Hutter, R.V.: *Phycomycetous infection in cancer patient with complication of therapy*, *Cancer*, 12:330, 1959.
 - 6) Frenckel, J.K.: *Role of corticosteroids as predisposing factors in fungal diseases*, *Lab. Invest.* 11:1192, 1962.
 - 7) Conant, F.C., et al.: *Manual of clinical mycology*, 2nd ed., W.B. Saunders company, Philadelphia and London, 1968.
 - 8) Bates, R.R. and R. David: *Nocardia brasiliensis lymphocutaneous syndrome*, *Amer. J. Dis. Child*, Vol. 121, March, 1971.
 - 9) Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins company/Baltimore, p. 731, 1974.
 - 10) Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed., p. 731, 1974.
 - 11) Gordon, M.A.: *Brief recording Nocardia brasiliensis in New England*, *The New England Journal of Medicine*, Jan. 2, 1964.
 - 12) Ajello, L., Walker, W.W., Dungworth, D.L. and Brunfield, G.L.: *Isolation of Nocardia brasiliensis from cat with review of its prevalence and geographic distribution*, *J. Am. Vet. M.A.*, 138:370, 1961.
 - 13) Bohalil, L.F. and A. Zamora: *Precipitin and skin tests in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113:40, 1963.
 - 14) Gordon, R.E. and J.M. Mihm: *The type species of the Genus Nocardia*, *J. Gen. Microbiolo.* 27:1, 1962.
 - 15) Gordon, R.E. and J.M. Mihm: *A comparison of Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis*, *J. Gen. Microbiol.*, 20:129, 1959.
 - 16) Gordon, R.E. and J.M. Mihm: *A comparative study of some strains received as Nocardiae*, *J. Bact.* 73:239, 1958.
 - 17) Baker, R.D., Seabury, J.H. and Schneidaou, J. D.: *Subcutaneous and cutaneous Mucormycosis and subcutaneous Phycomycosis*, *Lab. Invest.* 11:1091, 1962.
 - 18) Thomas, A.M.: *Disseminated Nocardiosis caused by Nocardia brasiliensis*, *Arch. Derm.*, 89:426, 1964.

■ 石鍾聲 外 2 人 寫真附圖 ■

第 1 圖：血液寒天上의 菌集落. 37°C, 5 日間 培養.

第 2 圖：Sabouraud's glucose 培地上的의 菌集落,
37°C, 10 日間 培養.

第 3 圖：Sabouraud's glucose 培地上的의 菌集落,
37°C, 20 日間 培養 × 20.

第 4 圖：Gram 染色, × 1000.

第 5 圖：Ziehl Neelson 染色, × 1000.

第 6 圖：Casein 分解, 5 日間 培養, 37°C.

第 7 圖：Tyrosin 分解，7 日間 培養。

第 8 圖：Gelatin 分解，28℃，5 日間 培養。

第 9 圖：Xanthin 培地，37℃에서 20日間 培養，