

구강 화농성 감염에서 혐기성세균의 배양분리*

서울대학교 치과대학

장복실 · 김철위 · 남일우 · 민병일 · 황성명 · 최선진

ISOLATION OF ANAEROBIC BACTERIA FROM ORAL PYOGENIC INFECTIONS-EFFECTS OF STRICT ANAEROBIC PROCEDURE AND CULTURE MEDIA

B.S. Jang; C.W. Kim; I.W. Nam; P.I. Min; S.M. Hwang; S.J. Choe

College of Dentistry, Seoul National University

..... > Abstract <

Strict anaerobic procedures and anaerobic chamber were employed in order to improve the isolation of obligate anaerobes from oral pyogenic infections. Also different culture media were utilized to maximize bacterial recovery. Two blood media: nalidixic acid Tween blood agar(NATB) and plain blood agar(BA), two non-blood media: nalidixic acid Tween agar(NAT) Gifu anaerobic medium(GAM) were used and compared for their isolation efficacy.

Specimens from seven patients were collected with syringe. After collection, the needle was sealed with sterilized silicone rubber and brought to laboratory. The time spent from specimen collection to its processing in anaerobic chamber usually was 15 min. Identification of isolated bacterial strains was done with the API-20A system. Increase in isolation of anaerobic bacteria was achieved. Obligate anaerobic bacteria isolated were 3.3 strains per specimen. This figure falls within the range of 1.9-4.4 strains per specimen reported in other countries. With respect to the media utilized, blood media were superior to non-blood media. NATB medium was effective especially for the isolation of Gram-positive cocci. A total of 15 species of Gram-negative rods was isolated and 12 of them belonged to Bacteroides.

*이 연구는 1984년의 서울대학교병원 병원연구비와 병원임상연구비로 이루어졌음.

I. 서 론

혐기성 세균은 산소가 있는 상태에서는 증식하지 못하는 세균이다(McBee등, 1955). 혐기성 세균은 구강의 상주 세균의 상주 세균의 일부이며, 구강감염을 일으킬 수 있다(최선진, 1980). 혐기성 세균 감염은 대부분 통성 세균과의 혼합감염이다(Chow 등, 1978 ; Sabiston등, 1976 ; Zavistosk등, 1980).

혐기성 세균의 배양을 위한 기술과 방법이 개량되기 이전에는 이러한 세균의 배양과 분리의 어려움때문에 혐기성 감염이 올바르게 진단되지 못한 경우가 많았다. 그후 혐기적 배양법이 점차로 개량되었으며, 임상검체에서의 혐기성세균 분리율이 높아졌다.

혐기성 세균의 배양과 분리에는 검체의 적절한 채취와 운반, 충분한 혐기적 조건, 적절한 선택배지의 사용이 필수적이다(Ieenberg등, 1980). 검체의 채취는 감염의 활성부위부터 상주 세균이 오염되지 않도록 하며, 운반과 보관은 혐기적 조건이 유지된 상태로 이루어져야 한다(정윤섭과 이삼열, 1983 ; Bartlett와 Gorbach, 1976).

우리나라의 작은 실험실에서 소규모로 혐기성 세균을 취급할 때의 애로사항의 하나는 혈액의 확보이다. 외국과는 달리 아직 전문적 혈액 판매상이 없고, 산 동물로부터 혈액을 공급하려면 여러가지 어려움이 따른다. 따라서 혈액이 첨가되지 않은 배지로서 혈액배지에 못지 않게 혐기성 세균의 배양을 지지하는 배지를 구할 수 있다면 바람직 할 것이다. 이와 같은 관점에서 본 연구는 철저한 혐기적 절차와 최신의 혐기적 배양 장비를 사용하여 혈액 배지인 날리딕산 혈액 한천(NATB)과 혈액 한천(BA), 비혈액배지인 날리딕산 한천(NAT)과 GAM 한천이 혐기성 세균의 배양과 분리에서 어떤 차이를 보이는가를 비교하였으며, 검체로서는 구강 화농성 감염에서 채취한 시료를 사용하였다.

II. 재료 및 방법

검체의 채취와 배양

서울대학교 병원 치과진료부 구강의과와 소아치과에 내원한 환자중, 농양으로 진단된 환자의 환부를 Merthiolate와 H₂O₂로 소독한 후, 18개이지 일회용 주사침과 주사기로 농즙을 채취하였다. 채취된 검체가 들은 주사침 끝은 실리콘 고무로 밀봉하여 실험실로 즉시 운반하였다.

혐기성 세균의 배양을 위한 배지로는 아래에 기술하는 네 종류의 평판배지를 사용하였다. 이 배지는 혐기적 Chamber에서 12시간 동안 방치하여 미리 환원된 후 사용하였고, 검체의 접종에는 백금이(白金耳)를 사용하였다. 검체의 채취에서 접종까지는 보통 15분이 소요되었다.

한편 검체의 일부는 슬라이드에 도말하여 그람 염색을 행하였고 세포의 그람 염색성, 형태, 크기 등을 관찰, 기록하였다.

배지에 두 백금이(약 4ml) 만큼의 검체를 접종한 후, 48시간 또는 그 이상 배양하여 출현한 군락 개개의 형태, 크기, 색, 용혈성을 관찰, 기록한 후 순수배양을 위하여 대표적 군락을 선택하여 미리 환원된 혈액 한천배지에 옮겨 2차로 접종하였다. 48시간 동안 혐기적 배양을 하였다.

검체에 들어있는 통성 혐기성 세균도 혐기적 환경에서 성장할 수 있는데(McBee등, 1955), 이러한 세균을 검출하기 위하여 위의 2차 증균배양 군락을 새 혈액 한천배지에 이식한 후, 5%의 CO₂ 대기(candle jar)에서 24시간 배양하여 군락이 나타나면 이 세균은 통성 혐기성으로 판정하였고 동정검사에서 제외하였다.

CO₂환경에서 성장하지 않아 편성 혐기성으로 판정된 세균만을 새 혈액 한천배지에서 증균배양하여 동정검사에 사용하였다.

배지의 제작

날리딕산 혈액 한천(Nalidixic Acid-Tween Blood Agar, NATB) Brain Heart Infusion Agar (Difco Lab.)를 준비하고 Tween 80(0.1% (v/v))과 hemin(55 µg/ml), menadione(0.5 µg/ml)을 첨가하여 121C, 15 lb/inch²에서 15분간 멸균하였다. 50°C로 냉각시킨 후 oxalated human blood(5% (v/v))와 10 µg/ml의 날리딕산을 첨가하였다(Wren, 1978).

혈액 한천(Blood Agar, BA)

녹십자사의 제품을 구입하여 사용하였다.

날리딕산 한천(Nalidixic Acid-Tween Agar, NAT) 날리딕산 혈액 한천의 처방에서 oxalated human blood만 제외하여 준비하였다.

GAM 한천(Gifu Anaerobic Medium, GAM)

일본의 日水 제약주식회사의 GAM한천 배지 분말을 구입하여 日水 지시서에 따라 준비하였다.

분리세균의 동정

각 세균의 그람 염색 결과와 API-20A System S (Analytab. Products, Inc)에 의한 검사로 행하였다(Stargel등, 1978).

Ⅲ. 결 과

편성 혐기성 세균과 통성 혐기성 세균의 분리

구강 화농성 감염 환자 7명의 검체로부터 편성 혐기성 세균은 NATB와 BA에서 각각 11주, NAT와 GAM에서 각각 8주씩 분리되었다. 통성 혐기성 세균은 NATB에서 4주, BA에서 9주, NAT와 GAM에서 각각 5주씩 분리되었다(Table 1).

편성 혐기성 그람 음성균

분리된 혐기성 그람 음성균은 모두 16주로서 Bacteroides가 12주, Veillonella가 1주, Fusobacterium이 1주, 미동정 그람 음성간균이 2주였다(Table 2). 배지별로는 BA에서 8주, NATB에서 6주, GAM에서 5주, NAT에서 4주가 검출되었다.

Bacteroides는 BA에서 7주 분리되었으나 NATB에서는 4주 분리되었고 모두 6종이 포함되어 있었다. BA에서는 NATB에서 분리되지 않은 B. fragilis와 B. distasonis가 각각 1주씩 분리되었다. 미동정 그람 음성 간균은 GAM에서 검출되었

Table 1. Recovery of obligate and facultative anaerobes

media org. sample	NATB		BA		NAT		GAM	
	ob. fac.	ob. fac.	ob. fac.	ob. fac.	ob. fac.	ob. fac.	ob. fac.	
1	2	0	2	3	1	1	2	0
2	2	1	1	2	2	3	0	3
3	3	0	2	0	1	0	3	0
4	2	2	2	1	2	0	1	1
5	1	0	1	2	1	0	1	0
6	0	0	2	0	0	1	1	1
7	1	1	1	1	1	0	1	1
Total	11	4	11	9	8	5	8	5

다. GAM에서 분리된 B. ovatus와 F. mortiferum은 다른 세 배지에서는 분리되지 않았다. NAT에서 분리된 B. distasonis, B. ruminicola, V. parvula

Table 2. Recovery of Gram-negative anaerobes

Organisms	Total No. isolated	No. isolated on each medium			
		NATB	BA	NAT	GAM
Bacteroides:					
B. melaninogenicus	4	2	4	0	0
B. oralis	2	2	1	0	0
B. fragilis	1	0	1	0	0
B. distasonis	1	0	1	1	0
B. ruminicola	1	0	0	1	0
B. ovatus	1	0	0	0	1
B. sps	2	0	0	0	2
Fusobacteria:					
F. mortiferum	1	0	0	0	1
Veillonella:					
V. parvula	1	0	1	1	1
unidentified					
G(-) bacilli	2	2	0	1	0
Total	16	6	8	4	5

Table 3. Recovery of Gram-positive anaerobes

Organisms	Total No. isolated	No. isolated on each medium			
		NATB	BA	NAT	GAM
Peptococcus:					
<i>Pc. asaccharolyticus</i>	1	1	1	1	1
<i>Pc. prevotii</i>	1	1	0	0	0
<i>Pc. sps.</i>	2	1	2	2	1
Eubacterium:					
<i>Eu. lentum</i>	1	1	0	1	0
Actinomyces:					
<i>A. israeli</i>	1	0	0	0	1
<i>A. odontolyticus</i>	1	1	0	0	0
Total	7	5	3	4	3

는 NATB에서는 분리되지 않았다.

편성 혐기성 그람 양성균

분리된 혐기성 그람 양성균은 모두 7 주로서 *Peptococci*가 4 주, *Actinomyces*가 2 주, *Eubacterium* um이 1 주였다 (Table 3).

배지별로는 NATB에서 5 주, NAT에서 4 주, BA 와 GAM에서 각각 3 주씩 검출되었다.

NATB와 NAT에서 1 주씩 분리된 *Eubacterium* 은 BA와 GAM에서는 분리되지 않았다. *Pc. prevotii*는 NATB에서만 1 주 분리되었고 *A. israeli* 는 GAM에서만 1 주 *A. odontolyticus*는 NATB 에서만 1 주 분리되었다.

NATB는 그람 음성균의 경우보다 그람 양성균의 경우에 분리효과가 컸다.

IV. 고 찰

편성 혐기성 세균은 유리 산소가 있으면 성장하지 못하는 생물체이다. 병소의 검체에서 이런 세균을 배양하려면, 채취에서부터 모든 취급 단계에 걸쳐 혐기적 방법으로 취급하여야 한다.

본 연구에서는 검체의 채취와 운반시 공기와의 노출을 최소로 하기 위해 주사기만을 채취에 사용하였고 이것으로 농즙을 흡입한 다음, 주사침을 실리콘 고무로 곧 밀봉하여 외부 공기와의 접촉을 차단하였다. 이 검체는 그 후 단시간(15분)에 연구실

로 운반되어 혐기적 Chamber에 넣었다. 이는 혐기적 환경을 제공하는 최선의 기구로서 그 사용이 최근에 급증하고 있다. 이 기구는 Chamber속의 유리 산소의 양을 10ppm이하로 유지하므로 혐기성 세균의 성장을 위한 최적의 환경을 제공한다. 검체를 접종하여 배양에 사용하는 배지도 이 Chamber속에서 미리 환원되게 하여 배지의 Eh(산화환원전위)를 낮게 할 수 있었다. 산소의 농도가 낮다는 것은 즉, Eh가 낮다는 것과 유사한 표현이다.

엄격한 혐기성 세균이라도 병소의 환경처럼 충분히 환원된(낮은 Eh)배지에 심어 무산소의 환경에서 배양하면 호기성 세균에 못지않게 빠르게 자랄 수 있다. 물론 배지는 성장을 지지하도록 모든 영양 요구를 포함하여야 한다.

국내의 병원에서 임상 검체의 채취에는 대부분 면봉을 사용하고 이것을 Stuart 운반배지(반유동배지)에 넣어서 운반한다. 이 운반배지는 어느 정도 환원된 것으로서 보관, 운반시 검체의 공기 노출을 억제하지만 몇 가지 불만족스러운 점도 갖고 있다. 첫째 이 배지에서 통성 혐기성 세균은 성장, 증식이 가능하여 수적으로 편성 혐기성 세균보다 우세해질 수 있고, 따라서 배양시 수적으로 열세인 혐기성 세균의 분리가 어려워진다(Isenberg등, 1980). 둘째 면봉에 채취된 검체의 세균 일부가 면봉을 꺼낼 때 배지에 묻혀서 상실될 수 있다(정윤섭과 이삼열, 1983). 그러므로 운반배지의 사용없이, 본

연구에서처럼 주사기로 직접 농즙을 채취, 운반하는 것이 혐기성 세균의 배양에 가장 적절하다(Isenberg 등, 1980).

또 국내 병원에서는 배양기로서 GasPak jar 를 사용하므로 많은 곳에서는 환원된 배지가 아닌 보통 배지에 접종하여 jar에 넣는 것이 통례이다. 비환원배지에 형성되어 존재하는 산화물질이 세균에 극히 해로우므로 철저히 환원된 배지를 사용하지 않고는 특정한 감염성 세균의 배양이 불가능한 경우가 있다.

배양 환경 다음으로 중요한 요소는 배양 배지이다. 혐기성 세균의 영양요구는 다른 세균에 비하여 까다롭기 때문에 요구되는 것들을 기초배지에 첨가하여야 한다. Vitamin K, hemine, yeast extract 또는 혈액의 첨가는 그 예이다.

임상 검체로부터 혐기성 세균의 1차적 분리배양에는 통상 혈액배지를 사용하는데, 서론에서 기술하였듯이 국내에서의 혈액확보가 쉽지 않으므로 비혈액배지를 준비하여 그 성능을 조사하게 되었다.

한편 혐기성 세균은 단독 감염보다는 통성 세균과 함께 혼합 감염을 일으키는 경우가 더 많다. 혐기성 세균만의 단독 감염일때는 그의 배양분리가 용이하지만, 다세균(polymicrobial) 혼합 감염일때는 일반적으로 통성 세균의 성장이 빠르므로 상대적으로 느린 혐기성 세균의 분리는 어렵게 되는 경우가 많다. 혐기성 세균의 이런 단점을 극복하기 위해 수종의 선택배지가 고안되어 사용되고 있다(Finegold, 1970 ; Sutter 등, 1980).

선택배지는 첨가한 특정 화합물의 세균성장 억제력에 의존하기도 하고(Dowell, 1964) 첨가한 항생제의 작용에 의한 것도 있다. 후자의 경우처럼 항생제가 첨가된 선택배지는 특정의 혐기성 세균, 또는 특정 혐기성 세균 속(genus)의 몇몇 종(species)의 성장을 억제하기도 한다(Wren, 1978). 그러므로 모든 혐기성 세균의 성장을 얻을 수 있는 선택배지의 탐색은 계속되고 있고, 본 연구에서 채용한 NATB 배지는 최근에 고안된 우수한 혐기성 세균의 배양을 위한 배지이다. 본 연구에서 사용한 4개의 배지로 배양분리한 편성 혐기성 세균은 모두 23주로서 검체당 평균 3.3주였다. 이는 외국에서 보고한 1.9주~4.4주(Aderhold 등, 1981 ; Bartlett 와 O'Keefe, 1979 ; Brook 등, 1981 ; Kannagara 등, 1980)의 범위에 속하는 것으로서 우리의 배양분리능력을 입증한다. 한편 국내의 김성수(1982)는 구강의 화

농성 감염 검체로부터 검체당 평균 0.8주의 편성 혐기성 세균을 분리하였는데 이와 비교할 때 우리의 배양분리는 4배로 증가한 것이다.

일반적으로 검체의 통성 혐기성 세균의 배양분리 빈도에 상응하는 빈도로 편성 혐기성 세균을 분리하지 못하는 절차와 방법은 혐기성 세균을 취급하는데 적절하지 못하다(Holdeman 등, 1977). 편성 및 통성 혐기성 세균의 배양분리에 관한 우리의 성적에서 비선택 BA와 보강배지 GAM으로부터 배양분리된 편성 혐기성 세균은 통성 세균을 수적으로 능가하였다. 이것은 이 연구에서 우리가 채용한 혐기적 절차와 방법이 올바르다는 것을 보여준다.

NATB와 NAT 배지에서 통성 혐기성 세균이 적은 수로 분리된 것은 이들이 선택배지인 때문이다. 선택제인 날리딕산은 통성 세균의 성장을 억제하며 그 효과는 NATB에서 보다 뚜렷하였다. 날리딕산과 Tween 80이 첨가된 NATB와 NAT 배지에서 성장한 세균 군락은 Wren(1978)의 보고처럼 다른 배지에 비하여 크게 형성되었다. 군락이 크면 첫째 군락 형태의 관찰이 용이하고, 둘째 취급할 세균의 양이 증대한다.

혈액 첨가 배지인 NATB와 BA배지에서는 그람 음성 혐기성 세균이 비혈액배지인 NAT와 GAM에서 보다 많이 분리되었고, 그람 양성 세균의 분리에 있어서는 두 균의 배지사이에 큰 차이가 없었다. 관찰된 이러한 차이의 유무에 의의가 있는지는 취급한 시료가 적기때문에 단언할 수는 없다. 앞으로 보다 많은 시료를 사용한 연구가 뒤따라야 좋을 것이다.

구강의 여러 화농성 감염에서 배양한 편성 혐기성 세균 중, 그람 음성 간균의 분리범위는 30%~53%(Aderhold 등, 1981 ; Bartlett 와 O'Keefe, 1979 ; Brook 등, 1981 ; Kannagara 등, 1980)이다. 우리가 배양분리한 간균은 15주(65%)로서 다른 연구자의 것보다 높은 값이다. 우리의 수치가 높은 것이 어디에 기인하는지 지적하기는 어려우나, 취급하는 검체 또는 처리 방법의 차이에 연유하리라고 생각된다. 또한 우리의 검체수가 적은 때문일 수도 있을 것이다. 그람 음성 간균중에서 최대수를 차지한 균종은 Bacteroides로 모두 12주를 얻었다. 김성수(1982)는 그의 연구에서 그람 음성 간균으로서 B. oralis 1주를 분리하였는데, 이에 비하면 우리의 12주는 상당히 많은 것으로 이러한 사실은 본 연구에서 검체의 채취 및 운반에서는 물론 배양분리 절차

차에서도 철저히 혐기적으로 취급한 때문이라고 생각한다.

V. 결 론

1. 철저한 혐기적 방법으로 배양분리한 결과 편성 혐기성 세균의 분리율이 높아졌다. 검체당 평균 3.3주가 분리되었다.
2. 혈액배지인 NATB와 BA에서 비혈액배지인 NAT와 GAM에서 보다 세균 분리 효과가 우수했다.
3. NATB는 혐기성 그람 양성 구균에 좋은 분리 효과를 나타내었다.
4. 그람 음성 간균은 15주 분리되었고, 이 중 *Bacteroides*가 12주로서 최다 균종을 이루었다.

참 고 문 헌

1. 김성수: 구강 화농성 감염증에 관한 세균학적 연구. 대한치과의사협회지, 20: 37~48, 1982.
2. 정윤섭, 이삼열: 혐기성 세균 검사법. 연대 출판부, 1983.
3. 최선진: 치계성 감염의 미생물과 항미생물제. 대한치과의사협회지, 19: 835~837, 1981.
4. The bacteriology of dentogenous pyogenic infections, *Oral Surg.* 52:583-587, 1981.
5. Bartlett, J.G., and S.L. Gorbach: Anaerobic infections of the head and neck, *Otolaryngologic clinics of North America*, Vol. 9, No. 3, Oct. 1976.
6. Bartlett, J.G., and P. O'Keefe: The bacteriology of perimandibular space infections, *J. Oral Surg.* 37:407-409, 1979.
7. Brook, I., S. Grimm and R.B. Kielich: Bacteriology of acute periapical abscess in children, *J. Endodontics.* 7:378-380, 1981.
8. Chow, A.W., S.M. Roser and F.A. Brady: Orofacial odontogenic infections, *Annals of Internal Medicine*, 88:392-402, 1978.
9. Dowell, V.R., JR. E.O. Hill and W.A. Altemeier: Use of phenylethyl alcohol in

- media for isolation of anaerobic bacteria, *J. Bact.* 88:1811-1813, 1964.
10. Dowell, V.R., G.L. Lombard., F.S. Thompson and A.Y. Armfield: Media for isolation characterization and identification of obligately anaerobic bacteria, USPHS, Atlanta, 1980.
11. Feldman, G., and O. Large: The bacterial flora of submucous abscesses originating from chronic exacerbating osteitis, *Acta Odontol. Scand.* 24:129-145, 1966.
12. Finegold, S.M.: Isolation of anaerobic bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, Amer. Soc. Microbiol. 265-279, 1970.
13. Goldberg, M.H.: The changing biologic nature of acute dental infection, *J. Am. Dent. Assoc.* 80:1048-1051, 1970.
14. Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore: *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Anaerobe Lab. V.P.I. and State University. 1977.
15. Isenberg, H.D., J.A. Washington II., A. Balows and A.C. Sonnenwirth: Collection, handling, and processing of specimens, In *Manual of Clinical Microbiology*, Amer. Soc. Microbiol. 52-81, 1980.
16. Kannangara, D.W., H. Thadepalli and J.L. McQuirter: Bacteriology and treatment of dental infections, *Oral Surg.* 50:103-109, 1980.
17. McBee, B.H., C. Lamanna and O.B. Weeks: Definition of bacterial oxygen relationships, *Bacterial. Rev.* 19:45-47, 1955.
18. Sabiston, C.B., Jr., W.R., Grigsby and N. Segerstgrom: Bacterial study of pyogenic infections of dental origin, *Oral Surg.* 41:430-435, 1976.
19. Stargel, M.D., G.L. Lombard, and V.R. Dowell, Jr.: Alternative procedures for

identification of anaerobic bacteria, Am. J. Med. Technol. 44:709-722, 1978.

20. Sutter, V.L., D.M. Citron, and S.M. Finegold.: Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 3rd ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Mo. 1980.

21. Wren, M.W.D.: A new selective medium

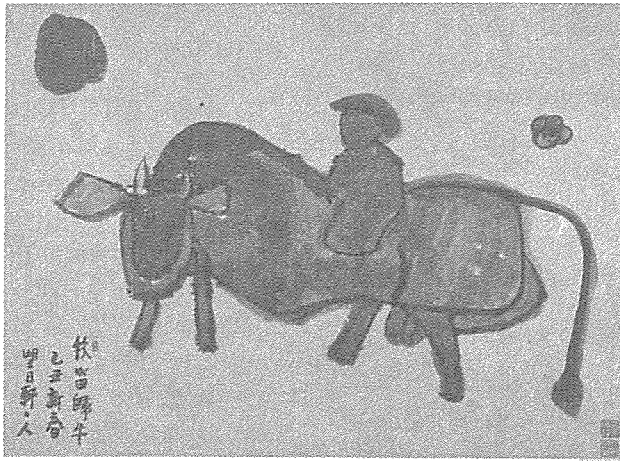
for the isolation of non-sporing anaerobic bacteria from clinical specimens, Medical Laboratory Sciences, 35:371-378, 1978.

22. Zavistoski, J., J. Dzink., A. Onderdonk, and J. Bartlett.: Quantitative bacteriology of endodontic infections, Oral Surg. 49: 171-174, 1980.

朴性圭 · 李恒星

로드레 · 金守經 畫展

— Paris平和藝術委員會 委員 서울展 —



● 일시 : 1985년 3월 6일 ~ 11일 (월)

● 장소 : 롯데쇼핑 미술관 (7층)

Park Sung Kyoo, Lee Hang Sung.

Claude Roederer, Kim Soo Kyung.

Exhibition: March 6-11, 1985.

Lotte Gallery. Seoul, Korea.