

*Bacteroides Fragilis*군의 분리 및 동정에 관하여

영남대학교의과대학 미생물학교실

김 희 선

= Abstract =

Classification of *Bacteroides Fragilis* Group

Hee-Sun Kim

Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Six strains of *Bacteroides fragilis* group were isolated from clinical specimens, and these isolates were classified by the resistance to bile and kanamycin, and by catalase and indole reaction. Of 6 strains, 4 strains were belonged to *B. fragilis* and 2 were *B. uniformis*. Among 6 strains, only 2 of *B. fragilis* harbored plasmids. But these plasmid showed no correlation with phenotypic expression. There were some differences in susceptibility to 23 β -lactam antibiotics, also, marked susceptibility differences were found between 2 species, so these results may be contributed to the treatment of infection due to this micro-organism and the identification of these species.

Key Words: *Bacteroides fragilis*, resistance, plasmid.

서 론

Bacteroides fragilis group(BFG)는 obligate anaerobic bacteria 중 임상적재로 부터 많이 분리되어 지는 그람음성 간균이다. 수술후 감염에 흔하게 관여하는 기회 감염원으로 호기성에 비해 분리, 배양의 조건이 까다로워 일반적으로 소외되고 있다. 인체 장내에 정상균총으로 존재하면서 Penicillin계와 Cephalosporin계에 내성을 잘 형성하며 β -lactamase의 산생과 관련된다고 알려져 있다. BFG의 치료약제로 알려진 Clindamycin, Chloramphenicol에 대해서도 내성을 가지는 균주가 증가하면서 여기에 관련되는 plasmid의 분리 및 특성에 대한 보고도 볼 수 있다. 저자는 임상재료에서의 BFG를 분리하여 각 균종으로 분류하고 β -lactamase 산생여부와 β -lactam계 약제에 대한 감수성상과의 관계를 관찰하였으며 각 균주의 plasmid 유무를 검색하였다. 그리고 확인된 plasmid에 대해서 생화학적 성상과 항생제에 대한 내성과의 관계를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 균의 분리

환자의 병소에서 분리한 BFG 6주를 사용하였다. 균 분리 방법은 채취한 재료를 30분 이내에 Thioglycollate broth (0.001% Hemin 첨가)에 접종후 37°C에서 3일간 배양한 뒤 0.05% L-Cysteine, 0.5% yeast extract 및 0.001% Hemin이 첨가된 Tryptic soy 혈액 한천배지에 접종하였다. 배양은 대기중, 5% CO₂, 그리고 혐기상태 (Gas Pak Jar)하에서 각각 37°C, 3일동안 행하였다.

2. 균의 동정

분리균을 Gas Pak Jar에서 37°C, 2일동안 배양하고 그람음성 간균만을 다시 취하여 Weinberg등¹⁾법에 의한 bile disk (15mg/disk) 감수성 검사와 Catalase 시험법을, 그리고 Drapper등²⁾법에 따라 Kanamycin (1000 μ g/disk), Rifampin (15 μ g/disk), Penicillin (2U/disk)에 대한 감수성을 측정하여 BFG에 비동정을 하였다. BFG로 여겨지는 균은 Schredkenberger와 Blazevic 방법³⁾에 따라 생화학적 방법으로 균종을 동정하였으며 BFG로 동정된 균주는 Subgroup⁴⁾으로 분류하고 Chopped meat액체배지에 보존하였다.

3. 항생제 감수성 검사

Kurzynski법⁵⁾에 따라 일정량의 농도의 약제를

함유한 disk를 넣은 Thioglycollate broth disk 법에 의하였다. 항생제는 Chloramphenicol (12 μ g/ml), E-rythromycin (3 μ g/ml), Tetracycline (6 μ g/ml), Clindamycin (1.6 μ g/ml), Metronidazole (16 μ g/ml) 등 5종에 대해 실시하였다. β -lactam 계에 대한 감수성검사는 Ceftizoxime (CZX), Cefotaxime (CTA), Piperacillin (PPC), Cefoperazone (CFP), Amoxicillin (AMC), Talampicillin (TAC), Cefapirin (CPR), Oxacillin (OXC), Ampicillin (AM), Cefradin (CFR), Penicillin G (PC), Cephalixin (CLX), Cephalothin (CPT), Moxalactam (MXL), Cefoxitin (CFX), Cefmetazole (CMZ), Cefazolin (CZL), Carbenicillin (CBC), Methicillin (MTC), Cloxacillin (CXC), Cefatrizine (CFT), Cefotiam (CTM), Cefuroxime (CXM)의 23종을 사용하여 평판회석 배양법으로 0.5 μ g/ml에서 128 μ g/ml 농도까지의 2단계 희석배지를 만들어 실시하였다. 사용된 배지는 Brain heart infusion broth에 0.05% L-cysteine, 0.5% yeast extract 및 0.001% Hemin을 첨가한 것이었다. 접종후 37 $^{\circ}$ C Gas Pak Jar에서 18시간 배양뒤 각 항생제에 대한 MIC를 결정하였다.

4. β -lactamase 측정

β -lactam 고리의 파괴로 인한 Penicilloic acid 생성도를 이용한 rapid acidimetric method¹⁾를 사용하였다. Penicillin G (농도 1×10^6 u)에 0.5% phenol red 용액을 가한후 pH를 8.5로 수정하고 이 용액 0.1ml에 18시간 배양한 균집락을 McFarland

No.4 이상의 농도가 되도록 부유시키고 15분 이내의 색조변화로 판정하였다.

5. Plasmid의 분리

Meyer법을 변형한 Wallace 등²⁾ 방법으로 분리하였다. 18시간동안 배양된 균 집락들을 1.5ml의 25% Sucrose 용액에 부유시켜 2ml lysozyme을 가한 다음 37 $^{\circ}$ C에 작용시킨 후 0.25M EDTA 0.1ml를 넣고 1% Sodium Dodecyl Sulfate를 가한 다음 혼돈뒤에 4 $^{\circ}$ C에 4시간 동안 정치후 NaCl를 농도 1M이 되도록 넣어 주면서 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 정치하였다. 이를 23600 xg로 30분간 원심분리후 부유액에 Ribonuclease (1 mg/ml in 50mM sodium acetate pH 5.0)를 가하고 37 $^{\circ}$ C에 1시간 방치후 Pronase를 농도 0.5 μ g/ml가 되도록 가한후 다시 37 $^{\circ}$ C에 18시간 방치하여 이를 Chloroform-isoamyl alcohol (24:1)로 상청액을 추출, 3M sodium acetate를 0.3

Table 1. Source of isolates

Strain	Lesion	Identification
1	Diabetic foot abscess	<i>Bacteroides fragilis</i>
2	Panperitonitis	<i>Bacteroides fragilis</i>
3	Panperitonitis	<i>Bacteroides fragilis</i>
4	Osteomyelitis	<i>Bacteroides fragilis</i>
5	Osteomyelitis	<i>Bacteroides uniformis</i>
6	Osteomyelitis	<i>Bacteroides uniformis</i>

Table 2. Biochemical characteristics of isolates

Tests	Strains					
	1	2	3	4	5	6
Hemolysis	-	-	-	-	-	6
Bile (15 mg/disk)	Nz	Nz	Nz	Nz	10	10
Catalase	+	+	+	+	-	-
Kanamycin (1000 μ g/disk)	8	9	8	Nz	17	10
Rifampin (15 μ g/disk)	35	35	35	40	24	23
Penicillin (2 U/disk)	Nz	Nz	Nz	Nz	15	17
Nitrate	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-
β -Lactamasee	+	+	+	+	-	-
Plasmid	-	-	+	+	-	-

+ : positive, - : negative, Nz : No. zone

**Carbohydrates : All 6 strains fermented glucose, maltose, sucrose, and fructose but not arabinose, xylose, and trehalose.

Table 3. Sensitivity patterns of isolates against antibiotics

Antibiotics	Strains					
	1	2	3	4	5	6
Chloramphenicol (12 µg/ml)	S	S	S	S	S	S
Erythromycin (3 µg/ml)	R	R	R	S	S	S
Tetracyclin (6 µg/ml)	R	R	R	S	S	S
Clindamycin (1.6 µg/ml)	R	R	R	S	S	S
Metronidazole (16 µg/ml)	S	S	S	S	S	S
Plasmid	-	-	+	+	-	-

Table 4. Sensitivity patterns of isolates against β-Lactam antibiotics (MIC)

β-Lactam	Strain No.	1	2	3	4	5	6
Ceftizoxime	(CZX)	2	2	2	2	64	64
Piperacillin	(PPC)	2	2	1	2	16	16
Cefotaxime	(CAA)	4	4	8	4	64	64
Cefoperazone	(CFP)	16	8	8	32	64	64
Moxalactam	(MXL)	4	4	4	2	8	8
Cefotiam	(CTM)	64	32	32	64	128	128
Cefapirin	(CPR)	16	16	16	32	2	2
Oxacillin	(OXC)	16	16	16	16	2	2
Ampicillin	(AM)	16	8	8	8	2	2
Cefradin	(CFR)	16	16	8	16	4	4
Penicillin G	(PC)	16	16	16	16	4	4
Amoxicillin	(AMC)	32	32	16	32	2	2
Talampicillin	(TAC)	32	32	16	32	2	2
Cephalexin	(CLX)	32	32	32	32	4	4
Cephalothin	(CPT)	64	64	64	64	16	16
Methicillin	(MTC)	32	32	32	32	16	16
Cefoxitin	(CFX)	4	4	4	4	2	2
Cefmetazole	(CMZ)	8	8	4	4	4	8
Cefazolin	(CZL)	8	8	8	16	8	8
Carbenicillin	(CBC)	16	16	16	16	8	16
Cloxacillin	(CXC)	32	32	32	32	16	32
Cefatrizine	(CFT)	64	32	32	64	64	64
Cefuroxime	(CXM)	64	128	128	64	128	64

M의 농도가 되도록 가한 다음 냉각된 95% ethanol을 2배 가하여 -20°C에 방치한후 4시간 뒤 -10°C 12000 xg로 20분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 STE buffer에 부유시켜 10 × Gel-loading buffer (type III)와 함께 0.7% Agarose type II에 25mA, 80V로 4시간동안 수평장치로 전기영동을 시행하여 Plasmid를 분리하고 Polaroid Camera (Mamiya RB67)로 촬영하였다.

성 적

1. 균분리 및 동정

120예의 임상재료에서 분리한 혐기균종중 BFG에 속하는 균종을 예비동정하여 6주를 얻었으며 병소별 분류상은 표1과 같다 (Table 1).

6주중 4주는 *B. fragilis*에 속하고 2주는 *B. uniformis*에 속하였다. BFG 6주의 분리 및 동정 시험과정에서 *B. uniformis* 2주는 다른 4주에 비해서 균집락의 크기가 직경 1~1.5mm 더 크며 Thioglycollate 배지에서 강한 bubble을 형성하고 심한 냄새

내었다. β -lactamase 산생유무에 따른 약제 감수성의 차이도 볼 수 있었다(Table 4).

즉 β -lactamase 양성균주가 음성균주에 비해 감수성이 낮은 예는 AMC, TAC, CPR, OXC, AM, CFR, PC, CLX, CPT, MTC, CFX 등 많은 약제에서 볼 수 있었다. 그러나 반대로 CZX, PPC, CTA, CFP, MXL, CTM에 대해서 β -lactamase 양성균주는 음성균주보다 감수성이 높았다. β -lactamase 양성균주들 상호간과 음성균주 상호간의 감수성에는 차이가 없었다.

5. Plasmid DNA의 분리

6주에서 추출한 DNA를 PBR 322와 함께 전기영동을 한바 *B. fargilis* 2주에서 plasmid를 분리할 수 있었다. 균주 3에서 Chromosomal DNA보다 mobility가 느린 band 1개 그리고 균주4는 Chromosomal DNA보다 느린것 1개와 빠른것 1개가 관찰되었으며 Chromosomal DNA보다 느린 2개는 mobility가 근사하였다. Plasmid의 Molecular weight는 정확히 알수 없으나 standard와 비교할때 mobility가 빠른 band는 6.3Kb의 크기를 가지고 있었다(Fig. 1).

생화학적 성상을 균주 3,4와 *B. fragilis*인 균주 1, 2와 비교하면 명백한 차이를 볼 수 없었으며 β -lactamase에 대한 감수성상도 균주 3,4간에 그리고 균주 1,2 상호간의 차이를 볼 수 없었다. 그러므로 분리한 Plasmid는 저자가 검사한 실험에서 볼수있는 marker를 code 하는 Plasmid로는 연관시킬수 없었다.

고 찰

BFG의 동정기준으로 Kanamycin 및 bile에 대한 내성을¹⁾ 주로하고 있으며 Weinberg 등²⁾은 bile 저항성에서 disk법으로 억제대가 10mm 이내로 하였으며 Catalase 양성을 들고있다. 그리고 BFG의 균종분류는 indole 산생, arabinose 등 당분해등을 이용하고 있다. 저자가 분리한 6주는 상기한 기준에 맞는 것이었으나 균주 5,6은 다소 의문이 가며 이 2균주는 타 4주에 비해서도 Table 2에서와 같이 성장의 차이가 많았다. 그리고 분리주를 4주는 *B. fragilis*로 2주는 *B. uniformis*로 동정하였으나 BFG의 동정 및 분류에는 앞으로 더 명백한 방법이 개발되어야 할 것으로 사료된다. 분리주에서 plasmid는 6주중 2주에서 볼 수 있었으며 plasmid의 존재와 각 균주의 여러 성상을 비교하였으나 plasmid와 특정 성장상을 연관시킬수는 없었다.

Fig. 1. Plasmid profiles of isolates

새를 풍겼다. 그람염색에서도 형태가 더 길게 나타났으며 생화학성상 및 항생제 감수성상에도 *B. uniformis*는 차이가 있었다. 즉 bile에 감수성이고 Penicillin에 감수성이며 β -lactamase음성, Catalase음성, indole 양성이었다. 이상 성적을 종합하여 4주는 *B. fragilis*로 2주는 *B. uniformis*로 동정하였다(Table 2).

2. 항생제 감수성상

Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyclin, Clindamycin, Metronidazole에 대한 감수성 양상은 2가지형으로 나타났다(Table 3). *B. fragilis* 3주(s-train 1,2,3)는 Chloramphenicol 및 Metronidazole에 대해서는 내성이며 *B. fragilis* 1종과 *B. uniformis* 2종(Strain 4,5,6)은 전 약제에 대해서 감수성이었다.

3. β -lactamase의 산생

Rapid acidimetric method에 의한 반응 양상은 Table. 2에서와 같이 균주 1,2,3,4는 양성균주, 균주 5,6은 음성이었다.

4. β -lactamase 산생과 β -lactam 항생제에 대한 감수성상과의 관계

β -lactamase 23종에 대하여 감수성상을 검사한결과 6균주 모두에 높은 감수성을 나타내는 약제는 MXL, CFX, CMZ였고 MIC가 1-8 μ g/ml였다. 반대로 전 균주에 대해 감수성이 낮은 약제는 CTM, CXC, CFT, CXM 였으며 MIC가 32-128 μ g/mg였다. 이외의 나머지 약제는 중등도의 감수성을 나타

더우기 plasmid의 분석, curing 혹은 genetic transfer의 실험은 하지 않았으므로 그 관계는 추측할 수 없었다. Wallace등도 BFG에서 plasmid를 분리하였는바 공시균주 1/4에서 plasmid를 볼수 있었으며 plasmid size도 2.0~5.0 Md의 다양한 Molecular weight를 가졌으며 Curing, genetic transfer로서 β -lactamase, zinc, cadmium 및 mercury 내성과 관계를 지을 수 있었다 하였다.

분리주의에 대한 β -lactamase의 산생과 β -lactam 항생제에 대한 감수성상을 관찰한 바 다양한 상을 나타내었다. *B. fragilis* 4주는 β -lactamase 양성주이며 *B. uniformis*는 음성주으로써 균종간의 차이를 볼 수 있었으며 균종 동정에 참고가 될지도 모른다. β -lactamase 양성주가 대부분의 항생제에 대해서 고도의 내성을 나타내었으나 어떤 약제에 대해서는 반대였으며 Paradoxical phenomenon을 볼 수 있었다. 이는 β -lactamase의 다양성, 그의 인자가 관여하는 까닭인지 모른다. Sato 등¹¹⁾도 BFG가 수종의 Penicillinase를 산생하며 β -lactam 항생제를 hydrolysis 시키는 성상이 상이함을 보고하였다. 그러나 Yotsuji 등¹⁰⁾은 β -lactamase의 성상 및 이 물질의 생산이 β -lactam 항생제에 고도의 내성상을 나타낼을 보고하고 있다. 약제별 감수성상이 다양하며 앞으로 치료에 좋은 지침이 될뿐만 아니라 *B. fragilis*와 *B. uniformis*간에 약제에 대한 감수성의 차이가 있었으며 이 점도 양 균종 감별에 이용 가치가 있을지 모른다. 또 β -lactamase에 저항성인 약제도 β -lactamase 양성균주에 대해서 반드시 감수성상에 명백한 차이를 나타내지 않았다.

결 론

환자에서 *Bacteroides fragilis group*에 속하는 6주를 분리하고 bile 저항성, Kanamycin 내성 및 Catalase, indole 시험을 하여 *B. fragilis* 및 *B. uniformis*로 분류하였다. 6주중 2주에서 균종에 관계없이 Plasmid를 분리하였으나 phenotypic expression과 관계지을 수 없었다. 23종의 β -lactam 항생제에 대한 감수성에 있어 약제별, 균종별 차이가 있었으며 이 성상은 치료 및 균종 동정에 참고가 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Wallace BL, Bradley JE and Rogolsky M: Plasmid analysis in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and other *Bacteroides* Species. *J. Clin. Microbiol.* **14**:383-388, 1981.
- 2) Weinberg LS, Smith LL and McTighe AH: Rapid identification of the *Bacteroides fragilis* group by bile disk and catalase tests. *Lab. Med.* **14**:785-788, 1983.
- 3) Draper DL and Barry AL: Rapid identification of *Bacteroides fragilis* with bile and antibiotic disks. *J. Clin. Microbiol.* **5**:439-443, 1977.
- 4) Schreckenberger PC and Blazevic DJ: Rapid methods for biochemical testing of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* **28**:759-762, 1974.
- 5) Schreckenberger PC and Blazevic DJ: Rapid fermentation testing of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **3**:313-317, 1976.
- 6) Finegold SM and Edelstein MAC: Gram negative, nonsporeforming anaerobic bacilli Manual of Clinical Microbiology. 4ed. American Society for Microbiology pp456, 1985.
- 7) Kurzynski TA, Yrios JW, Helstad AC and Field CR Aerobically incubated thioglycolate broth disk method for antibiotic susceptibility testing of anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**:727-732, 1976.
- 8) Schoenknecht FD, Sabath LD and Thornsberry C: Susceptibility tests: special tests Manual of Clinical Microbiology. 4ed. American Society for Microbiology pp.1005-1007, 1985.
- 9) Sato K, Matsuura Y, Inoue M and Mitsuhashi S: Properties of a new penicillinase type produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**:579-584, 1982.
- 10) Yotsuji A, Minami S, Inoue M and Mitsuhashi S: Properties of novel β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:925-929, 1983.
- 11) Vargo V, Korzeniowski M and Spaulding EH: Tryptic soy bile-kanamycin test for the identification of *Bacteroides fragilis*. *Appl. Microbiol.* **27**:480-483, 1974.