



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2014년

8월
박사학위 논문

8월

박사학위논문

한국인 구강에서 분리된 세균의 동정

한국인 구강에서 분리된 세균의 동정

조선대학교 대학원

치의생명공학과

최 미 화

최
미
화

한국인 구강에서 분리된 세균의 동정

Identification of the bacteria isolated from
oral cavities in a Korean population

2014년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

최 미 화

한국인 구강에서 분리된 세균의 동정

지도교수 국 중 기

이 논문을 이학 박사학위신청 논문으로 제출함

2014년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

최 미 화

최미화의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 흥 중 인

위 원 조선대학교 교 수 장 숙 진 인

위 원 조선대학교 교 수 방 일 수 인

위 원 전남과학대학교 교 수 김 화 숙 인

위 원 조선대학교 교 수 국 중 기 인

2014년 6월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법	4
1. 세균 및 세균배양	4
2. 세균 genomic DNA의 추출	4
3. Multilocus sequence typing (MLST)	5
4. PCR 증폭물의 클로닝 및 플라스미드 DNA 추출	5
5. 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색	6
6. 계통발생 분석(Phylogenetic analysis)	6
7. 항생제 감수성 실험	6
III. 연구 결과	12
1. 구강 병소에서 분리된 세균 동정	12
2. Mitis 균 연쇄구균의 계통발생 분석	13
3. 구강세균들의 수종 항생제에 대한 최소성장억제농도	14
IV. 총괄 및 고안	24
V. 결 론	28
VI. 참 고 문 헌	29

표 목 차

Table 1. Bacteria isolated from each of patient	8
Table 2. PCR primer sequences used in this study	10
Table 3. Interpretive standards for dilution susceptibility testing	11
Table 4. Summary of detection frequency of bacteria from patients	15
Table 5. The strains used in this study and accession numbers for nucleotide sequences of 16S rDNA	16
Table 6. Mitis group streptococci used in this study and accession numbers for nucleotide sequences of <i>rpoB</i> , <i>sodA</i> , and <i>groEL</i>	19
Table 7. Identification of streptococci clinical isolates by the phylogenetic analysis at the species level	20
Table 8. Minimal inhibitory concentration of several antibiotics for gram-positive clinical bacteria	21
Table 9. Minimal inhibitory concentration of several antibiotics for gram-negative clinical bacteria	23

도 목 차

- Fig. 1. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of 16S rDNA (about 1.33 kb) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence. 35
- Fig. 2. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *rpoB* (680 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence. 36
- Fig. 3. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *sodA* (366 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence. 37
- Fig. 4. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *groEL* (756 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence. 38
- Fig. 5. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of MLST (about 3128 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence. 39

ABSTRACT

Identification of the bacteria isolated from oral cavities in a Korean population

Choi, Mi-Hwa

Advisor : Prof. Joong Ki Kook, D.D.S., Ph.D.
Department of Biodental Engineering,
Graduate School of Chosun University

The aim of this study was to identify bacteria isolated from a Korean oral cavity and to determine their antimicrobial susceptibility against eight antibiotics. The bacterial strains were obtained from the Korean Collection for Oral Microbiology (KCOM). The bacteria were identified by comparing 16S rDNA sequences at the species level. The data showed that 77 bacterial strains were predominantly identified as streptococci (49.4%) and staphylococci (14.3%). Among the Mitis group streptococci, the 16S rDNA homogeneity was too high to discriminate between clinical strains at the species level. So, phylogenetic analyses of the Mitis group streptococci were evaluated using the partial gene sequence comparison of 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, and *groEL*. Phylogenetic data based on the nucleotide sequences of the four genes showed that Mitis group streptococci were not discriminated at the species level. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using a broth dilution assay to test the sensitivity of the bacteria isolated from a Korean oral cavity against eight antibiotics. The MIC values of the oral bacterial strains against antibiotics were different. Streptococci showed sensitivity toward clindamycin and vancomycin and were resistant to tetracycline. Staphylococci also showed sensitivity toward clindamycin, cefuroxime axetil and vancomycin and were resistant to penicillin antibiotics. Gram-negative bacterial

strains showed sensitivity toward tetracycline and were resistant to clindamycin. The resulting data regarding the antimicrobial susceptibility test are useful in the decision for antibiotic treatments and needed to prevent the misuse or abuse of antibiotics.

I. 서론

구강은 치아, 치은, 타액선, 협점막 및 혀로 구성된 특이한 환경으로 다양한 세균이 서식하기 좋은 장소이다. 구강 세균의 대다수는 숙주와 조화를 이루면서 생존하지만, 불결한 구강위생 등으로 특정 세균이 증가하고 숙주의 면역력이 저하되어 구강 질환을 유발하게 된다(Paster *et al.*, 2001). 구강에 발생하는 대표적인 질환은 치아우식증과 치주질환으로 구강 내 세균이 주요한 원인 인자로 알려져 있다(Petersen, 2003, 2004). 치은연상 치면세균막에 존재하는 통성 혐기성, 그람 양성 구균과 간균은 치아우식증과 관련이 있고 치은연하 치면세균막에 존재하는 혐기성 그람 음성간균은 치주질환과 관련이 있다(Marsh, 1992). 치아우식증은 mutans 군 연쇄구균의 당질 대사로 분비되는 젖산에 의해 치아표면이 우식되는 질환이다. Mutans 군 연쇄구균은 사람에서 주로 분리되는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*와 동물에서 분리되는 *Streptococcus cristicus* (햄스터), *Streptococcus rattus* (야생 rat), *Streptococcus ferus* (야생 rat), *Streptococcus downei* (원숭이) 및 *Streptococcus macacae* (원숭이) 종으로 분류되고 있다(Whiley and Beighton, 1998). 치주질환은 치아를 지지하는 치은에 염증이 생기는 치은염과 치주인대 및 치조골에 염증이 생기는 치주염으로 나뉘며, 치면세균막에 존재하는 세균들이 만들어 내는 단백질 분해효소와 내독소에 의해 일어난다(Ali *et al.*, 1997, Haffajee *et al.*, 1994). 치주질환의 대표적인 원인 균으로는 *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* 및 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등으로 동맥경화증, 심혈관질환 및 당뇨병과 같은 전신 질환 과도 밀접한 관계가 있다(Moore *et al.*, 1985). 또한, 구강 세균 중 mitis 군 연쇄구균인 *Streptococcus pneumoniae*와 포도구균인 *Staphylococcus aureus*은 이차적으로 혈관이 나 혈액을 통해 각 기관에 전이되어 심내막염(Berbari *et al.*, 1997), 세균성 폐렴(Scannapieco, 1999), 저체중아 조기출산(Buduneli *et al.*, 2005, Offenbacher *et al.*, 1998) 및 골수염(Dodman *et al.*, 2000)과 같은 심각한 질환을 유발하는 중요 병인체로 알려져 있다.

구강 내에는 약 500여 종의 세균이 존재한다고 보고되었다. 구강 세균은 구강상태가 양호하거나 치주질환을 가지고 있는 사람의 치은연하 치면세균막(Paster *et al.*, 2001), 면역력이 결핍된 사람의 괴사궤양성 치주염(Paster *et al.*, 2002), 충치를 가지고 있는

어린이의 치면세균막(Becker *et al.*, 2002), 구내염(Paster *et al.*, 2002), 구취가 있는 혀의 후면 부위(Kazor *et al.*, 2003), 타액(Sakamoto *et al.*, 2000), 치은염을 가지고 있는 치은연하 치면세균막(Kroes *et al.*, 1999) 및 치아치조농양(Dymock *et al.*, 1996, Wade *et al.*, 1997)에서 검출되었다. 검출된 종들 중 현재의 세균 배양법으로는 약 50% 정도의 구강 세균만 배양이 가능하여 구강 감염 병소에서 분리 동정된 균종은 매우 적은 실정이다(Munson *et al.*, 2002, Paster *et al.*, 2001). 구강과 전신 감염 질환의 진단과 합리적인 치료법을 알아내기 위해서 구강에 존재하는 세균을 분리 배양하고 종 수준으로 정확하게 동정하는 것이 아주 중요하다. 구강 내에 존재하는 세균은 인종과 지리학 적 위치에 따라 다르고, 균주에 따라 숙주의 구강 조직 세포에 대한 병원성의 차이가 있다(Park *et al.*, 2013). 그러므로 한국인 구강에 존재하는 임상균주의 구강 내 세균 분포와 다양한 세균 종의 생리학적 특성, 항생제 감수성 검사 및 세균-숙주간의 상호 작용 등의 연구가 필요하다.

구강 내에 세균성 감염 질환이 빈번해지면서 항생제가 임상에서 자주 사용되어지고 있다(Machuca *et al.*, 2000). 항생제는 20세기 중반에 도입된 항미생물 물질로 숙주조직에 안전하고 병원미생물에 대해서만 독성을 나타내는 특성을 가지고 있다(Morcillo *et al.*, 1996). 임상에서는 일반적으로 감염 병소에서 세균을 분리 배양하지 않아 병인체를 정확하게 알지 못하기 때문에 이전에 보고된 항생제 감수성 검사 결과나 감염을 유발하는 세균을 추측하여 항생제를 선택하는 경험적인 치료를 하고 있는 실정이다(Vallano and Izarra, 2006). 결과적으로 임상에서는 광범위한 항생제를 처방하게 되고 이로 인해 항생제에 대한 감수성이 감소하여 *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Staphylococcus aureus* 및 viridans *Streptococcus*와 같은 내성을 갖는 세균이 검출되고 있다(Aracil *et al.*, 2001, Bresco *et al.*, 2006, Groppo *et al.*, 2005). 항생제는 세균의 항생제 감수성 유형에 의해 결정되는 것이므로 항생제를 처방하기 전에 감수성 검사를 항상 시행하는 것이 가장 이상적이다. 구강 세균에 대한 항생제 감수성 결과는 분리된 세균 종 및 서식하고 있는 숙주에 따라 결정된다. 따라서, 질환을 유발하는 세균들에게 효과적으로 작용하면서 내성을 나타내지 않는 농도와 성분의 항생제 처방을 위해서는 한국인 구강에서 분리된 임상균주에 대한 항생제 감수성 검사를 시행하여 보다 많은 자료를 확보하고 항생제 처방 기준을 마련할 필요가 있다.

본 연구에서는 구강 내 세균 감염 병소에서 분리되어 종 수준으로 동정되지 않은 상태로 한국구강미생물자원은행(KCOM, Korean Collections of Oral Microbiology,

Gwangju, Korea)에 기탁된 균주들을 분양받아 16S rDNA 핵산염기서열 비교 분석법을 이용하여 동정하고, mitis 군 연쇄구균으로 동정된 균주들의 housekeeping 유전자들을 이용하여 계통발생 분석을 시행하였다. 또한 유사한 구강질환으로 내원한 환자의 항생제 처방에 대한 자료를 얻고자 임상에서 빈번하게 사용되고 있는 수종 항생제 (penicillin G, amoxicillin, cefuroxime axetil, tetracycline, clindamycin, oxacillin, vancomycin, polymyxin B)에 대한 감수성 검사를 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세균 및 세균배양

본 연구에서 사용된 표준균주 및 참고균주는 *Streptococcus mitis* ATCC 49456^T, *Streptococcus oralis* CCUG 13229^T, *Streptococcus pneumoniae* CCUG 28588^T, *Streptococcus gordonii* CCUG 33482^T, *Streptococcus sanguinis* CCUG 17826^T, *Streptococcus parasanguinis* CCUG 30417^T, *Streptococcus australis* CCUG 45919^T, *Streptococcus cristatus* CCUG 33481^T, *Streptococcus infantis* CCUG 39817^T, *Streptococcus oligofermentans* CCUG 58097^T, *Streptococcus peroris* CCUG 39814^T, *Streptococcus pseudopneumoniae* CCUG 49455^T, *Streptococcus sinensis* CCUG 48363^T, *Streptococcus pneumoniae* KCCM 40410으로 ATCC (American Type Culture Collection, Korea), CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden), 및 KCCM (Korean Culture Center of Microorganism, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 한국인의 구강에서 분리된 임상균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology; KCOM)에서 분양 받아 사용하였다. 임상균주들은 구강 내 세균 감염 병소에서 분리되어 종 수준으로 동정 되지 않은 상태로 한국구강미생물자원은행에 기탁되었다(Tabel 1). 이들 균주들은 3% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl, 1.5% bacto agar, 0.5 mg/ml hemin solution, 0.025% resazurin, 2 µg/ml vitamin K₁ solution 및 5% sheep blood가 포함된 한천배지에 도말하였다. 37°C 정지 배양기에서 1-2일 동안 배양한 후, 자라는 균락을 선택하여 다음 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 모든 균주들은 BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratory, Detroit, MI, U.S.A.)배지에 도말한 다음, 37°C 온도 조건으로 세균 배양기에서 24시간 동안 배양 하였다.

2. 세균 genomic DNA의 추출

세균배양액 3 ml를 12,000 rpm의 원심력을 이용하여 회수하고, 이를 CTAB method에 따라 세균 genomic DNA를 추출하였다(Wilson, 1990). 회수한 세균 pellet에 다음과 같이 처리하였다. 셀은 560 µl의 TE buffer (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8.0)와 6 µl의 lysozyme solution (30 mg/ml)을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안

반응하였다. 여기에 30 μ l의 10% SDS solution과 3 μ l의 proteinase K (20 mg/ml)을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 2시간 동안 반응시키고, 100 μ l의 5 N NaCl과 80 μ l의 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl solution을 넣고 잘 혼합한 다음 56°C에서 20분간 반응하였다. 동량의 chloroform을 넣고 부드럽게 혼합하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 세포막 다당류 및 단백질 등을 제거한 수용액층만을 취하여 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 RNase solution을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 여기에 다시 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)을 넣어 부드럽게 혼합하여 5분간 원심분리한 후, 순수한 DNA만 들어 있는 수용액층만을 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 동량의 chloroform 추출을 한 번 더 반복한다. 분리된 수용액 층에서 DNA를 침전시키기 위하여 2배 volume의 100% EtOH을 첨가하여 -20°C에서 하룻 밤 반응하고 원심분리 하였다. 보다 순수한 DNA을 얻기 위하여 80% Ethanol을 가한 후, 재 원심분리 하여 침전 시 키고 공기 중에 건조시킨다. 건조된 DNA는 50 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6)로 완전 용해시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하고 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다.

3. Multilocus sequence typing (MLST)

본 연구에서 계통발생 분석에 사용하고자 하는 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, *groEL* 유전자들 PCR법으로 증폭하기 위해 참고 문헌에 보고되었던 프라이머들(Drancourt *et al.*, 2004, Kawamura *et al.*, 1999, Lane *et al.*, 1985, Olga *et al.*, 2009)을 사용하였고, 이들 프라이머는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 본 연구에서 사용된 유전자들을 증폭하기 위한 프라이머와 프라이머 핵산염기서열 그리고 중합효소연쇄 반응 조건을 Table 2에 정리하였다.

4. PCR 증폭물의 클로닝과 플라스미드 DNA 추출

PCR 증폭물은 pGEM-T easy vector (Promega Co., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, *E. coli* DH5a에 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드는 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 즉, 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리(13,000 rpm)하고, 회수한 세균 pellet를 250 μ l의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 2 50 μ l

Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μ l의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞는다. 이것을 10분간 원심분리(13,000 rpm, 4°C)하여 상층액을 Binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리(13,000 rpm)하였다. 여과액은 버리고, Binding column tube에 70% 에탄올이 첨가된 Washing buffer 700 μ l 넣은 후, 1분간 원심분리(13,000 rpm)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위하여 여과액을 버리고, 다시 1분간 원심분리(13,000 rpm)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μ l의 Elution buffer를 넣고 1분간 정치 반응시킨 다음 다시 1분간 원심분리(13,000 rpm)하여 여과액을 -20°C에서 보관하여 핵산 염기서열 결정에 사용하였다.

5. 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 코스모진텍사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 이때, 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F (5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3')와 ChDC-GEM-R (5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')이며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 7.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다. 위에서 결정된 핵산염기서열은 EzTaxon 프로그램 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 상동성 검색을 하였고, 그 결과 98% 이상 상동성을 보이는 표준균주의 종(species)과 같은 종으로 판정하였다.

6. 계통발생 분석(Phylogenetic analysis)

본 연구에서 사용한 균주들의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 및 *groEL* 핵산염기서열은 MEGA version 5(Tamura *et al.*, 2011) 프로그램을 이용하여 Clustal W 법으로 정렬하고 neighbor-joining methods 법으로 계통도(phylogenetic tree)를 작성하였다. 이때 계통도의 신뢰도를 확인할 수 있는 bootstrap 값은 1,000회의 resampled data로부터 계산하였다. 16S rDNA, *rpoB*, *sodA* 및 *groEL* 핵산염기서열들의 세균 종 및 세균 종간 진화적 거리(% distance로 표현함)는 Kimura 2-parameter model을 이용하여 계산하였다.

7. 항생제 감수성 실험

Penicillin G (페니실린 G), amoxicillin (아목시실린), cefuroxime axetil (세프록심),

tetracycline (테트라사이클린), clindamycin (클린다마이신), oxacillin (옥사실린), vancomycin (반코마이신), polymyxin B (폴리마이신 B)은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. Augmentin[®](amoxicillin + clavulanic acid, 5:1)(오그멘틴)은 SmithKline Beecham 사(Brentford, UK)에서 제공받아 사용하였다. 여러 항생제에 대한 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)는 Murray와 Jorgensen의 방법에 따라 액체배지 희석법으로 측정하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 항생제의 농도가 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 0.1 ml의 액체배지에 조절하였다. 여기에 595 nm의 파장에 대한 흡광도가 0.05로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml씩 접종하였다. 그리고, 항생제와 세균을 반응한 96-well plate는 각 세균의 최적 성장 조건에서 24시간 배양한 후, Microplate Autoreader (Model; EL311SX, BIO-TEX Instruments Inc., Cortland, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 음성대조군인 세균이 자라지 않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 세균이 자라지 않은 항생제 농도를 MIC 값으로 결정하였다. 감수성 여부 농도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)에서 권고한 해석 표준에 따랐다(Table 3).

Table 1. Bacteria isolated from each of patient

Patients' No.	Sources	Strains
5	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1621 (ChDC B189)
9	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1661 (ChDC B155)
11	Odontogenic keratocyst	KCOM 1663 (ChDC B265), KCOM 1664 (ChDC B266), KCOM 1665 (ChDC B267), KCOM 1666 (ChDC B268)
14	Chronic osteomyelitis	KCOM 1673 (ChDC B314)
18	Pericoronitis	KCOM 1674 (ChDC B320), KCOM 1675 (ChDC B321), KCOM 1679 (ChDC B345)
19	Postoperative maxillary cyst	KCOM 1686 (ChDC B323), KCOM 1687 (ChDC B324), KCOM 1688 (ChDC B325), KCOM 1690 (ChDC B327), KCOM 1691 (ChDC B328), KCOM 1692 (ChDC B346), KCOM 1693 (ChDC B347), KCOM 1694 (ChDC B348), KCOM 1696 (ChDC B350), KCOM 1697 (ChDC B351), KCOM 1698 (ChDC B352), KCOM 1699 (ChDC B353), KCOM 1701 (ChDC B355)
21	Postoperative infection	KCOM 1718 (ChDC B329), KCOM 1719 (ChDC B356), KCOM 1720 (ChDC B357), KCOM 1722 (ChDC B359), KCOM 1723 (ChDC B360)
22	Maxillary chronic osteomyelitis	KCOM 1727 (ChDC B361), KCOM 1728 (ChDC B362)
23	Subgingival plaque	KCOM 1729 (ChDC B363), KCOM 1730 (ChDC B364), KCOM 1731 (ChDC B365), KCOM 1732 (ChDC B366), KCOM 1733 (ChDC B367), KCOM 1734 (ChDC B368), KCOM 1735 (ChDC B369), KCOM 1737 (ChDC B372)

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

(continued on next page)

Table 1. (continued in previous page)

Patients' No.	Sources	Strains
25	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1751 (ChDC B376), KCOM 1752 (ChDC B377), KCOM 1753 (ChDC B378), KCOM 1754 (ChDC B379), KCOM 1755 (ChDC B380), KCOM 1756 (ChDC B381), KCOM 1757 (ChDC B382), KCOM 1758 (ChDC B383), KCOM 1759 (ChDC B384), KCOM 1760 (ChDC B385), KCOM 1761 (ChDC B386), KCOM 1762 (ChDC B387), KCOM 1763 (ChDC B388)
26	Maxillary chronic osteomyelitis	KCOM 1791 (ChDC B391)
27	Dentigerous cyst	KCOM 1796 (ChDC B392), KCOM 1797 (ChDC B393), KCOM 1798 (ChDC B394)
28	Chronic osteomyelitis	KCOM 1813 (ChDC B519)
29	Subcutaneous actinomycosis	KCOM 1816 (ChDC B517)
30	Infected radicular cyst	KCOM 1820 (ChDC B518), KCOM 1823 (ChDC B522), KCOM 1825 (ChDC B524)
31	Rt.cheek&submandibular space abscess	KCOM 1826 (ChDC B542)
35	Osteomyelitis	KCOM 1860 (ChDC B576)
36	Osteomyelitis	KCOM 1866 (ChDC B577)
37	Cementoblastoma	KCOM 1869 (ChDC B579), KCOM 1870 (ChDC B580), KCOM 1871 (ChDC B581), KCOM 1873 (ChDC B583), KCOM 1874 (ChDC B584), KCOM 1875 (ChDC B585), KCOM 1876 (ChDC B586), KCOM 1877 (ChDC B587), KCOM 1879 (ChDC B589),
38	-	KCOM 1884 (ChDC B590), KCOM 1885 (ChDC B591), KCOM 1886 (ChDC B592), KCOM 1887 (ChDC B593)
39	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1907 (ChDC B623)

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Table 2. PCR primer sequences used in this study

Gene	Primer name; oligonucleotide sequences (5' → 3')	PCR condition* ID temp, time D temp, time A temp, time E temp, time FE temp, time	Amplification size (bp)
16S rDNA	27F; AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG 1492R; TACGGYTACCTTGTTACGACTT	94°C, 2min 94°C, 1min 55°C, 30sec 72°C, 1min 72°C, 10min	1502
<i>rpoB</i>	Strepto F: AARYTNGGMCCTGAAGAAAT Strepto R: TGNARTTTRTCATCAACCATGTG	95°C, 2min 94°C, 10sec 51°C, 10sec 60°C, 2min 72°C, 5min	740
<i>sodA</i>	SOD-UP; TRCAYCATGAYAARCACCAT SOD-DOWN; ARRTARTAMGCRTGYTCCCARACRTC	95°C, 10min 94°C, 1min 51°C, 1min 72°C, 90sec 72°C, 10min	435
<i>groEL</i>	Strep-groEL-d; GAHGTNGTNGAAGGNATGCA Strep-groEL-r; ATTTGRCGNAYWGGYTCTTC	94°C, 2min 94°C, 1min 50°C, 30sec 72°C, 1min 72°C, 10min	757

* The number of PCR cycle was 30; ID, initial denaturation; D, denaturation; A, annealing; E, extension; FE, final extension.

Table 3. Interpretive standards for dilution susceptibility testing

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin G			
staphylococci	≤ 0.12	-	≥ 0.25
streptococci	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Amoxicillin			
staphylococci	≤ 0.25	-	≥ 0.5
streptococci	≤ 0.25	0.5-4	≥ 8
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Amoxicillin+clavulanic acid			
staphylococci	≤ 4	-	≥ 8
streptococci	≤ 0.25	0.5-4	≥ 8
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Tetracycline			
staphylococci	≤ 4	8	≥ 16
streptococci	≤ 2	4	≥ 8
Enterococci	≤ 4	8	≥ 16
Cefuroxime axetil			
staphylococci	≤ 4	8-16	≥ 32
streptococci	≤ 1	2	≥ 4
Clindamycin			
staphylococci	≤ 0.5	1-2	≥ 4
streptococci	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Oxacillin			
staphylococci	≤ 2	-	≥ 4
Vancomycin			
staphylococci	≤ 2	4-8	≥ 16
streptococci	≤ 1	-	-
Enterococci	≤ 4	8-16	≥ 32
Polymyxin B			
	≤ 2	-	≥ 4

Ⅲ. 연구 결과

1. 구강 병소에서 분리된 세균 동정

한국구강미생물자원은행에서 분양받아 혈액한천배지에 접종한 후 호기성 조건에서 37°C, 24시간 배양하였다. 자라난 균락을 선택하여 배양한 결과 총 77개의 임상균주를 얻을 수 있었다. 배양된 세균을 동정한 결과 그람 양성 세균은 55균주(71.4%), 그람 음성 세균은 22균주(28.6%)로 확인되었다(Table 4). 임상균주의 16S rDNA는 PCR 법으로 핵산염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하였다(Table 5). 16S rDNA 핵산염기서열 비교법을 이용하여 그람 양성 세균을 동정한 결과, *Actinomyces odontolyticus* (1), *Actinomyces oris* (1), *Micrococcus yunnanensis* (2), *Rothia mucilaginosa* (2), *Staphylococcus aureus* (4), *Staphylococcus epidermidis* (3), *Staphylococcus hominis* (1), *Staphylococcus warneri* (3), *Streptococcus anginosus* (7), *Streptococcus australis* (1), *Streptococcus constellatus* (4), *Streptococcus gordonii* (1), *Streptococcus infantis* (1), *Streptococcus intermedius* (3), *Streptococcus mitis* (3), *Streptococcus oralis* (3), *Streptococcus parasanguinis* (3), *Streptococcus pseudopneumoniae* (3), *Streptococcus rubneri* (1), *Streptococcus sanguinis* (1), *Streptococcus sinensis* (3), *Streptococcus* sp. (4) 순으로 연쇄구균(49.4%)과 포도구균(14.3%)이 주로 검출되었다(Table 4). 그람 음성 세균을 동정결과는 *Burkholderia anthina* (2), *Citrobacter braakii* (2), *Citrobacter freundii* (5), *Gemella haemolysans* (3), *Klebsiella* sp. (1), *Neisseria oralis* (1), *Neisseria subflava* (1), *Neisseria* sp. (6), *Proteus vulgaris* (1) 순으로 *Citrobacter* 속 균주와 *Neisseria* 속 균주가 주로 검출되었다(Table 4). 동정한 구강세균 중 *salivarius* 군 연쇄구균, *Klebsiella* 속 균주, 및 *Neisseria* 속 균주는 16S rDNA 핵산염기서열로는 종 수준으로 동정할 수 없었다. *Salivarius* 군 연쇄구균의 경우 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, 및 *Streptococcus vestibularis*간 구별이 어려웠고, *Klebsiella* 속 균주의 경우는 *Klebsiella oxytoca* 와 *Klebsiella michiganensis*간 구별이 어려웠으며, *Neisseria* 속 균주의 경우는 *Neisseria sicca*, *Neisseria flava*, *Neisseria macacae*, 및 *Morococcus cerebrosus*간에 구별이 어려워 종 수준으로 동정이 되지 않았다. 21개 병소부위에서 연쇄구균이 주로 검출되었는데, *mitis* 군 연쇄구균(26%), *anginosus* 군 연쇄구균(18%) *salivarius* 군 연쇄구균(5%) 순으로 나타났다(Table 4와 5).

2. Mitis 군 연쇄구균의 계통발생 분석

본 연구에서 16S rDNA 핵산염기서열 비교법으로 mitis 군 연쇄구균임이 확인된 18개 임상균주를 가지고 중 수준의 동정을 하기 위해 housekeeping 유전자를 이용하여 계통발생 분석(phylogenetic analysis)을 하였다. 임상균주의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, 및 *groEL* 유전자는 PCR 법으로 증폭하여 각각 약 1502 bp, 740 bp, 435 bp 그리고 757 bp 크기의 산물을 얻었고 핵산염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하였다(Tabel 6). Mitis 군 연쇄구균에 속하는 13종 표준균주의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, *groEL* 핵산염기서열은 GenBank의 데이터베이스에서 다운받아 사용하였다. 유전자의 계통발생 분석에는 프라이머 핵산염기서열 부분을 제외한 1,328 bp, 680 bp, 366 bp, 756 bp를 이용하였다. 임상에서 분리된 mitis 군 연쇄구균 균주는 13종 표준균주들의 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, 및 *groEL* 핵산염기서열을 기준으로 형성된 계통도를 분석하여 중 수준으로 동정하였다(Fig. 1-4). 또한, 더 정확한 결과를 얻기 위해 4가지 유전자의 핵산염기서열을 multilocus sequence typing (MLST) 법으로 계통발생 분석도 시행하였다(Fig. 5). 16S rDNA는 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis*의 핵산염기서열의 상이성이 낮아 분류가 어려웠고, *sodA*의 경우 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*의 핵산염기서열이 거의 일치하여 균주 간 분류가 어려운 것으로 분석되었다. 16S rDNA를 기준으로 13종 표준균주에 속하지 않은 6균주 중 ChDC B353을 제외하고 5균주는 다른 유전자의 계통도에 의해서 분류되었다. 임상균주 ChDC B189는 *rpoB*, *groEL*, MLST 핵산염기서열 기준으로 모두 *Streptococcus australis*로 동정되었고, ChDC B345는 *rpoB* 핵산염기서열 기준으로 *Streptococcus mitis*로 동정되었으며, ChDC B348 균주는 *rpoB*, *sodA* 핵산염기서열 기준으로 각각 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*로 동정되었다. *RpoB* 핵산염기서열 기준으로 동정되지 않은 임상균주 ChDC B363은 *sodA*를 기준으로 *Streptococcus australis*로 *groEL*과 MLST 기준으로 *Streptococcus infantis*로 동정되었다. 임상균주 ChDC B388은 *groEL* 핵산염기서열을 기준으로 *Streptococcus pneumoniae*인 것으로 분석되었다. 계통발생 분석에 사용한 18개 임상균주 중 7개의 임상균주가 16S rDNA, *rpoB*, *sodA*, *groEL*, MLST 핵산염기서열 모두에서 동일한 균주로 동정되었다. 임상균주 ChDC B356, ChDC B368, ChDC B585은 *Streptococcus parasanguinis*, ChDC B357은 *Streptococcus sanguinis*, ChDC B359은 *Streptococcus gordonii*, ChDC B384는 *Streptococcus sinensis*, ChDC B329는 *Streptococcus oralis*로

네 가지 유전자 뿐만 아니라 MLST법, EzTaxon database의 핵산염기서열 비교 분석 결과 모두에서 동일하게 동정되었다(Table 7). 그러나, mitis 군 연쇄구균 대부분이 각 유전자의 계통도에 따라 다른 군으로 동정되었음을 확인할 수 있었다.

3. 구강세균들의 수종 항생제에 대한 최소성장억제농도

본 연구에서 동정된 균주들의 8종 항생제에 대한 MIC 값은 Table 8과 Table 9에 정리하였다. 동정된 77 균주 중 14균주는 동일한 균주로 생각되어지거나, 한천배지에서는 자라지만 액체배지에서는 배양이 되지 않아 항생제 감수성 검사 대상에서 제외되었다. 동일한 균주로 생각되어지는 균주는 다음과 같다. ChDC B265은 ChDC B266과 ChCD B365는 ChDC B367, ChDC B369, ChDC B372와 ChDC B381은 ChDC B383과 ChDC B384는 ChDC B386, ChDC B387과 ChCD B583은 ChDC B584, ChDC B589과 같았다. 그 외 5균주인 ChDC B361, ChDC B362, ChDC B518, ChDC B522, ChDC B524는 한천배지에서 자라나지만 액체배지에서는 배양이 되지 않았다. 항생제 감수성 검사에는 그람 양성 세균 46 균주와 그람 음성 세균 18 균주가 사용되었다. 구강에서 분리된 그람 양성 세균 중 연쇄구균은 반코마이신에 100%, 세프록심 아세틸에 89.7%, 클린다마이신에 79.3%의 감수성을 보였다. 테트라사이클린은 62.1%로 내성이 가장 높은 항생제로 나타났다(Table 8). 그람 양성 세균 중 4균주의 *Staphylococcus aureus*가 분리되었는데 4균주 중 1균주가 옥사실린에 내성을 나타냄으로써 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)로 판정되었다(Table 8). 또한 포도구균은 페니실린에 100% 내성을 보였으며, 아목사실린에는 81.8%의 내성을 보였고, 오그멘틴에는 72.7%의 내성을 보여 페니실린 계 항생제에 높은 내성을 나타냈다. 그리고 반코마이신, 클린다마이신, 세프록심 아세틸에는 90.9%의 높은 감수성을 나타내었으며, 테트라사이클린에는 63.6%의 감수성을, 36.4%의 내성을 보였다(Table 8). 그람 음성 세균은 테트라사이클린에 94%, 폴리마이신 B에 67%, 세프록심 아세틸에 61%의 감수성을 보였고, 클린다마이신에 94%, 페니실린에 67%, 아목사실린과 오그멘틴에 각 각 56%의 내성을 보였다. *Neisseria oralis*인 ChDC B360 균주는 폴리마이신 B를 제외한 항생제에 감수성을 보였고 *Proteus vulgaris*인 ChDC B155는 모든 항생제에 대해 내성을 보였다(Table 9).

Table 4. Summary of detection frequency of bacteria from patients

Patient' No. Species	5	9	11	14	18	19	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	35	36	37	38	39	Total n = %		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>						1																1	1.3	
<i>Actinomyces oris</i>											1												1	1.3
<i>Burkholderia anthina</i>								2															2	2.6
<i>Citrobacter braakii</i>						2																	2	2.6
<i>Citrobacter freundii</i>						5																	5	6.5
<i>Gemella haemolysans</i>																3							3	3.9
<i>Klebsiella sp.</i>			1																				1	1.3
<i>Micrococcus yunnanensis</i>										1								1					2	2.6
<i>Neisseria oralis</i>							1																1	1.3
<i>Neisseria sp.</i>					2	1				2										1			6	7.8
<i>Neisseria subflava</i>																				1			1	1.3
<i>Proteus vulgaris</i>		1																					1	1.3
<i>Rothia mucilaginosa</i>						1															1		2	2.6
<i>Staphylococcus aureus</i>																						4	4	5.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>										2				1									3	3.9
<i>Staphylococcus hominis</i>			1																				1	1.3
<i>Staphylococcus warneri</i>										1		2											3	3.9
<i>Streptococcus anginosus</i>									4	2								1					7	9.1
<i>Streptococcus australis</i>									1														2	1.3
<i>Streptococcus constellatus</i>			2											1								1	4	5.2
<i>Streptococcus gordonii</i>									1														1	1.3
<i>Streptococcus infantis</i>						1																	1	1.3
<i>Streptococcus intermedius</i>																					3		3	3.9
<i>Streptococcus mitis</i>						1				1				1									3	3.9
<i>Streptococcus oralis</i>				1			1			1													3	3.9
<i>Streptococcus parasanguinis</i>							1		1												1		3	3.9
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>					1	1				1													3	3.9
<i>Streptococcus rubneri</i>	1																						1	1.3
<i>Streptococcus sanguinis</i>							1																1	1.3
<i>Streptococcus sinensis</i>										3													3	3.9
<i>Streptococcus sp.</i>									1									1	2				4	5.2
Total	1	1	4	1	3	13	5	2	8	13	1	3	1	1	3	1	1	1	1	9	4	1	77	100

Table 5. The strains used in this study and accession numbers for nucleotide sequences of 16S rDNA

Strains	Spices	GeneBank accession no.
		16S rDNA
KCOM 1621 (ChDC B189)	<i>Streptococcus rubneri</i>	KF733658
KCOM 1661 (ChDC B155)	<i>Proteus vulgaris</i>	KF733657
KCOM 1663 (ChDC B265)	<i>Streptococcus constellatus</i>	KF733659
KCOM 1664 (ChDC B266)	<i>Streptococcus constellatus</i>	KF733660
KCOM 1665 (ChDC B267)	<i>Staphylococcus hominis</i>	KF733661
KCOM 1666 (ChDC B268)	<i>Klebsiella</i> sp.	KF733662
KCOM 1673 (ChDC B314)	<i>Streptococcus oralis</i>	KF733663
KCOM 1674 (ChDC B320)	<i>Neisseria</i> sp.	KF733664
KCOM 1675 (ChDC B321)	<i>Neisseria</i> sp.	KF733665
KCOM 1679 (ChDC B345)	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KF733672
KCOM 1686 (ChDC B323)	<i>Citrobacter braakii</i>	KF733666
KCOM 1687 (ChDC B324)	<i>Citrobacter freundii</i>	KF733667
KCOM 1688 (ChDC B325)	<i>Citrobacter freundii</i>	KF733668
KCOM 1690 (ChDC B327)	<i>Citrobacter freundii</i>	KF733669
KCOM 1691 (ChDC B328)	<i>Neisseria</i> sp.	KF733670
KCOM 1692 (ChDC B346)	<i>Citrobacter braakii</i>	KF733673
KCOM 1693 (ChDC B347)	<i>Streptococcus infantis</i>	KF733674
KCOM 1694 (ChDC B348)	<i>Streptococcus mitis</i>	KF733675
KCOM 1696 (ChDC B350)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	KF733676
KCOM 1697 (ChDC B351)	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	KF733677
KCOM 1698 (ChDC B352)	<i>Citrobacter freundii</i>	KF733678
KCOM 1699 (ChDC B353)	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KF733679
KCOM 1701 (ChDC B355)	<i>Citrobacter freundii</i>	KF733680
KCOM 1718 (ChDC B329)	<i>Streptococcus oralis</i>	KF733671
KCOM 1719 (ChDC B356)	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	KF733681
KCOM 1720 (ChDC B357)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	KF733682

(continued on next page)

Table 5. (continued in previous page)

Strains	Spices	GeneBank accession no.
		16S rDNA
KCOM 1722 (ChDC B359)	<i>Streptococcus gordonii</i>	KF733683
KCOM 1723 (ChDC B360)	<i>Neisseria oralis</i>	KF733684
KCOM 1727 (ChDC B361)	<i>Burkholderia anthina</i>	KF733685
KCOM 1728 (ChDC B362)	<i>Burkholderia anthina</i>	KF733686
KCOM 1729 (ChDC B363)	<i>Streptococcus mitis</i>	KF733687
KCOM 1730 (ChDC B364)	<i>Streptococcus</i> sp. (salivarius group)	KF733688
KCOM 1731 (ChDC B365)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733689
KCOM 1732 (ChDC B366)	<i>Streptococcus australis</i>	KF733690
KCOM 1733 (ChDC B367)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733691
KCOM 1734 (ChDC B368)	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	KF733692
KCOM 1735 (ChDC B369)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733693
KCOM 1737 (ChDC B372)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733694
KCOM 1751 (ChDC B376)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KF733695
KCOM 1752 (ChDC B377)	<i>Staphylococcus warneri</i>	KF733696
KCOM 1753 (ChDC B378)	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	KF733697
KCOM 1754 (ChDC B379)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KF733698
KCOM 1755 (ChDC B380)	<i>Streptococcus oralis</i>	KF733699
KCOM 1756 (ChDC B381)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733700
KCOM 1757 (ChDC B382)	<i>Neisseria</i> sp.	KF733701
KCOM 1758 (ChDC B383)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733702
KCOM 1759 (ChDC B384)	<i>Streptococcus sinensis</i>	KF733703
KCOM 1760 (ChDC B385)	<i>Neisseria</i> sp	KF733704
KCOM 1761 (ChDC B386)	<i>Streptococcus sinensis</i>	KF733705
KCOM 1762 (ChDC B387)	<i>Streptococcus sinensis</i>	KF733706
KCOM 1763 (ChDC B388)	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KF733707
KCOM 1791 (ChDC B391)	<i>Actinomyces oris</i>	KF733708

(continued on next page)

Table 5. (continued in previous page)

Strains	Spices	GeneBank accession no.
		16S rDNA
KCOM 1796 (ChDC B392)	<i>Staphylococcus warneri</i>	KF733709
KCOM 1797 (ChDC B393)	<i>Staphylococcus warneri</i>	KF733710
KCOM 1798 (ChDC B394)	<i>Streptococcus constellatus</i>	KF733711
KCOM 1813 (ChDC B519)	<i>Streptococcus mitis</i>	KF733714
KCOM 1816 (ChDC B517)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KF733712
KCOM 1820 (ChDC B518)	<i>Gemella haemolysans</i>	KF733713
KCOM 1823 (ChDC B522)	<i>Gemella haemolysans</i>	KF733715
KCOM 1825 (ChDC B524)	<i>Gemella haemolysans</i>	KF733716
KCOM 1826 (ChDC B542)	<i>Streptococcus anginosus</i>	KF733717
KCOM 1860 (ChDC B576)	<i>Streptococcus</i> sp. (salivarius group)	KF733718
KCOM 1866 (ChDC B577)	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	KF733719
KCOM 1869 (ChDC B579)	<i>Neisseria</i> sp.	KF733720
KCOM 1870 (ChDC B580)	<i>Neisseria subflava</i>	KF733721
KCOM 1871 (ChDC B581)	<i>Streptococcus</i> sp. (salivarius group)	KF733722
KCOM 1873 (ChDC B583)	<i>Streptococcus intermedius</i>	KF733723
KCOM 1874 (ChDC B584)	<i>Streptococcus intermedius</i>	KF733724
KCOM 1875 (ChDC B585)	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	KF733725
KCOM 1876 (ChDC B586)	<i>Streptococcus</i> sp. (salivarius group)	KF733726
KCOM 1877 (ChDC B587)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	KF733727
KCOM 1879 (ChDC B589)	<i>Streptococcus intermedius</i>	KF733728
KCOM 1884 (ChDC B590)	<i>Staphylococcus aureus</i>	KF733729
KCOM 1885 (ChDC B591)	<i>Staphylococcus aureus</i>	KF733730
KCOM 1886 (ChDC B592)	<i>Staphylococcus aureus</i>	KF733731
KCOM 1887 (ChDC B593)	<i>Staphylococcus aureus</i>	KF733732
KCOM 1907 (ChDC B623)	<i>Streptococcus constellatus</i>	KF733733

Table 6. The strains used in this study and accession numbers for nucleotide sequences of *rpoB*, *sodA*, and *groEL*

Strains	GeneBank accession no.		
	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>	<i>groEL</i>
KCOM 1621 (ChDC B189)	KF733735	KF933812	KJ406684
KCOM 1673 (ChDC B314)	KF733736	KF933813	KJ406685
KCOM 1679 (ChDC B345)	KF733738	KF933815	KJ406687
KCOM 1693 (ChDC B347)	KF733739	KF933816	KJ406688
KCOM 1694 (ChDC B348)	KF733740	KF933817	KJ406689
KCOM 1699 (ChDC B353)	KF733741	KF933818	KJ406690
KCOM 1718 (ChDC B329)	KF733737	KF933814	KJ406686
KCOM 1719 (ChDC B356)	KF733742	KF933819	KJ406691
KCOM 1720 (ChDC B357)	KF733743	KF933820	KJ406692
KCOM 1722 (ChDC B359)	KF733744	KF933821	KJ406693
KCOM 1729 (ChDC B363)	KF733745	KF933822	KJ406694
KCOM 1732 (ChDC B366)	KF733746	KF933823	KJ406695
KCOM 1734 (ChDC B368)	KF733747	KF933824	KJ406696
KCOM 1755 (ChDC B380)	KF733748	KF933825	KJ406697
KCOM 1759 (ChDC B384)	KF733749	KF933826	KJ406698
KCOM 1763 (ChDC B388)	KF733750	KF933827	KJ406699
KCOM 1813 (ChDC B519)	KF733751	KF933828	KJ406700
KCOM 1875 (ChDC B585)	KF733752	KF933829	KJ406701

Table 7. Identification of streptococci clinical isolates by the phylogenetic analysis at the species level

Strains	Species				
	16S rDNA	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>	<i>groEL</i>	MLST
	Mega(NJ/Kimura 2-parameter)	Mega(NJ/Kimura 2-parameter)	Mega(NJ/Kimura 2-parameter)	Mega(NJ/Kimura 2-parameter)	Mega(NJ/Kimura 2-parameter)
KCOM 1621 (ChDC B189)	N	<i>S. australis</i>	N	<i>S. australis</i>	<i>S. australis</i>
KCOM 1673 (ChDC B314)	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	N	<i>S. oligofermentans</i>	<i>S. oralis</i>
KCOM 1679 (ChDC B345)	N	<i>S. mitis</i>	N	N	N
KCOM 1693 (ChDC B347)	<i>S. infantis</i>	<i>S. infantis</i>	N	<i>S. infantis</i>	<i>S. infantis</i>
KCOM 1694 (ChDC B348)	N	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mitis</i>	N	N
KCOM 1699 (ChDC B353)	N	N	N	N	N
KCOM 1718 (ChDC B329)	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>
KCOM 1719 (ChDC B356)	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>
KCOM 1720 (ChDC B357)	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>
KCOM 1722 (ChDC B359)	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i>
KCOM 1729 (ChDC B363)	N	N	<i>S. australis</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. infantis</i>
KCOM 1732 (ChDC B366)	<i>S. australis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>
KCOM 1734 (ChDC B368)	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>
KCOM 1755 (ChDC B380)	<i>S. infantis</i>	<i>S. peroris</i>	<i>S. peroris</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. infantis</i>
KCOM 1759 (ChDC B384)	<i>S. sinensis</i>	<i>S. sinensis</i>	<i>S. sinensis</i>	<i>S. sinensis</i>	<i>S. sinensis</i>
KCOM 1763 (ChDC B388)	N	N	N	<i>S. pneumoniae</i>	N
KCOM 1813 (ChDC B519)	<i>S. infantis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. oligofermentans</i>	<i>S. oralis</i>
KCOM 1875 (ChDC B585)	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>

Table 8. Minimal inhibitory concentration of several antibiotics for gram-positive clinical bacteria

Species (Gram Positive)	Strain name	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
		PEN	AMX	AUG	TET	CMX	CLI	OXA	VAN
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	ChDC B351	1	1	4	16	1	>32	4	0.5
<i>Actinomyces oris</i>	ChDC B391	0.125	<0.125	0.5	<0.125	<0.125	0.125	1	0.5
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	ChDC B378	<0.0625	<0.125	0.25	<0.125	0.25	0.125	1	0.25
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	ChDC B577	<0.0625	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.125	1	0.125
<i>Rothia mucilaginosa</i>	ChDC B350	<0.0625	<0.125	<0.125	0.25	<0.125	<0.0625	1	0.5
<i>Rothia mucilaginosa</i>	ChDC B587	<0.0625	<0.125	<0.125	2	<0.125	>32	0.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ChDC B590	>32	>64	>64	0.25	2	<0.0625	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ChDC B591	>32	>64	>64	0.25	2	<0.0625	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ChDC B592	>32	>64	>64	0.25	2	<0.0625	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ChDC B593	1	<0.125	1	2	>64	>32	>32	0.125
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ChDC B376	>32	32	64	64	0.5	0.125	0.25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ChDC B379	32	8	16	64	0.5	0.125	0.5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ChDC B517	1	0.5	8	1	0.5	<0.0625	0.25	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	ChDC B267	1	2	8	32	1	<0.0625	0.5	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	ChDC B377	0.5	0.5	2	64	0.5	<0.0625	0.5	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	ChDC B392	1	1	8	0.25	0.5	<0.0625	0.5	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	ChDC B393	0.25	<0.125	0.5	4	0.5	0.125	2	32
<i>Streptococcus anginosus</i>	ChDC B365	<0.0625	<0.125	0.5	0.25	0.25	<0.0625	0.5	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	ChDC B381	<0.0625	0.25	1	64	0.25	<0.0625	1	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	ChDC B542	0.125	0.5	2	>64	0.5	<0.0625	1	0.5
<i>Streptococcus australis</i>	ChDC B366	0.125	0.5	4	32	<0.125	<0.0625	0.25	0.5
<i>Streptococcus australis</i>	ChDC B368	0.125	0.5	2	32	<0.125	0.5	0.5	0.5
<i>Streptococcus constellatus</i>	ChDC B265	<0.0625	0.25	0.5	0.5	0.25	<0.0625	1	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	ChDC B394	<0.0625	<0.125	1	0.5	0.25	<0.0625	1	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	ChDC B623	0.125	0.5	2	0.25	0.5	<0.0625	2	1
<i>Streptococcus gordonii</i>	ChDC B359	<0.0625	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.0625	0.125	0.5
<i>Streptococcus infantis</i>	ChDC B347	0.5	0.5	1	8	2	>32	4	0.5

(continued on next page)

Table 8. (continued in previous page)

Species (Gram Positive)	Strain name	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)							
		PEN	AMX	AUG	TET	CMX	CLI	OXA	VAN
<i>Streptococcus intermedius</i>	ChDC B583	<0.0625	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.0625	0.25	1
<i>Streptococcus mitis</i>	ChDC B348	0.25	0.5	4	64	0.25	<0.0625	1	0.5
<i>Streptococcus mitis</i>	ChDC B329	0.25	<0.125	0.25	0.25	1	<0.0625	2	0.5
<i>Streptococcus mitis</i>	ChDC B363	0.25	0.5	2	32	0.5	<0.0625	4	1
<i>Streptococcus mitis</i>	ChDC B519	2	4	16	32	8	<0.0625	8	0.5
<i>Streptococcus oralis</i>	ChDC B314	4	8	16	32	8	>32	8	0.5
<i>Streptococcus oralis</i>	ChDC B380	0.5	0.5	2	16	1	>32	8	0.5
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ChDC B356	0.5	1	4	64	0.5	<0.0625	2	0.5
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	ChDC B585	0.25	1	4	64	0.25	<0.0625	1	0.5
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	ChDC B345	<0.0625	0.25	0.5	>64	0.25	0.25	1	0.5
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	ChDC B353	0.25	0.5	4	0.25	0.25	<0.0625	1	0.25
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	ChDC B388	0.5	1	8	32	1	>32	8	0.25
<i>Streptococcus rubneri</i>	ChDC B189	0.25	0.5	2	32	0.5	<0.0625	2	0.5
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ChDC B357	1	1	4	32	1	<0.0625	8	0.5
<i>Streptococcus sinensis</i>	ChDC B384	<0.0625	<0.125	0.25	0.5	<0.125	<0.0625	<0.0625	0.5
<i>Streptococcus</i> sp.	ChDC B364	0.125	<0.125	0.5	0.25	<0.125	<0.0625	0.5	0.5
<i>Streptococcus</i> sp.	ChDC B576	0.5	2	4	32	0.5	>32	32	0.5
<i>Streptococcus</i> sp.	ChDC B581	<0.0625	<0.125	0.5	0.25	<0.125	<0.0625	2	0.25
<i>Streptococcus</i> sp.	ChDC B586	0.25	1	2	32	0.25	<0.0625	2	0.5

Table 9. Minimal inhibitory concentration of several antibiotics for gram-negative clinical bacteria

Species (Gram Negative)	Strain name	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)							
		PEN	AMX	AUG	TET	CMX	CLI	OXA	PMB
<i>Citrobacter braakii</i>	ChDC B323	>32	>64	>64	2	8	>32	>32	4
<i>Citrobacter braakii</i>	ChDC B346	>32	>64	>64	1	4	>32	>32	2
<i>Citrobacter freundii</i>	ChDC B324	>32	>64	>64	1	2	>32	>32	8
<i>Citrobacter freundii</i>	ChDC B325	>32	>64	>64	1	4	>32	>32	4
<i>Citrobacter freundii</i>	ChDC B327	>32	>64	>64	1	4	>32	>32	2
<i>Citrobacter freundii</i>	ChDC B352	>32	>64	>64	1	4	>32	>32	1
<i>Citrobacter freundii</i>	ChDC B355	>32	>64	>64	2	8	>32	>32	<0.0625
<i>Klebsiella</i> sp.	ChDC B268	>32	>64	>64	1	4	>32	>32	1
<i>Neisseria oralis</i>	ChDC B360	<0.0625	<0.125	0.25	0.25	<0.125	<0.0625	<0.0625	>32
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B320	0.5	0.5	2	1	2	32	32	>32
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B328	0.25	0.25	2	0.5	4	32	32	0.125
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B579	1	0.5	2	0.5	8	32	32	0.25
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B321	0.5	0.5	2	2	4	>32	>32	2
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B382	1	0.5	2	1	8	16	>32	0.25
<i>Neisseria</i> sp.	ChDC B385	2	0.5	2	1	8	32	>32	0.25
<i>Neisseria subflava</i>	ChDC B580	2	0.5	4	0.5	8	16	>32	0.25
<i>Proteus vulgaris</i>	ChDC B155	>32	>64	>64	64	>64	>32	>32	>32

IV. 총괄 및 고안

한국구강미생물자원은행에서 분양 받은 임상균주 중 한천배지에서 자라난 균주를 사용하여 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법으로 동정하였고, mitis 군 연쇄구균으로 동정된 균주들은 housekeeping 유전자를 기준으로 한 계통발생 분석을 통하여 종 수준으로 동정하였으며, 임상에서 사용되는 수종 항생제에 대한 올바른 기준을 마련하기 위하여 항생제 감수성 검사를 시행하였다.

본 연구 대상은 주로 골수염으로 내원한 환자의 병소에서 분리된 균주로 77개 배양되었고 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법으로 동정한 결과 *Streptococcus* 속 38균주, *Staphylococcus* 속 11균주, *Neisseria* 속 8균주, *Citrobacter* 속 7균주, *Gemella* 속 3균주, *Actinomyces* 속 2균주, *Micrococcus* 속 2균주, *Rothia* 속 2균주, *Burkholderia* 속 2균주, *Proteus* 속 1균주, 및 *Klebsiella* 속 1균주 이었다. 21개 병소에서 연쇄구균과 포도구균이 주로 검출되었고 그 이외에 다양한 세균 종이 검출되었는데, 이는 골수염 부위에서 연쇄구균과 포도구균이 흔히 배양되고 질환에 관여하는 세균 종이 다양하다는 기존의 연구와 일치하는 결과였다(김 등., 2003, Kim *et al.*, 2001). 또한 연쇄구균이 주로 검출된 점은 치면세균막이 형성되는 초기에 집락을 형성하고 있다가 질환이 유발되면 조직에 침입하여 감염의 기원이 된다는 것을 의미한다(Love and Jenkinson, 2002). 본 연구 결과 다양한 세균 종이 검출되었으나, 질환의 주요 병인체로 알려진 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*과 같은 혐기성 세균이 검출되지 않았는데, 이는 호기성 조건에서만 배양하였기 때문에 질환에 관련된 모든 세균을 배양할 수 없었던 것으로 생각된다. 검출된 세균 중에 *Actinomyces*, *Gemella*, *Neisseria*, 및 *Rothia* 속 균주는 구강 정상 세균총의 일종이지만 *Gemella haemolysans*은 심근내막염(La Scola and Raoult, 1998), 내수막염(May *et al.*, 1993), 골수염(Nonaka *et al.*, 2000, van Dijk *et al.*, 1999)을 유발하고, *Rothia dentocariosa*는 심근내막염(Larkin *et al.*, 2001, Kong *et al.*, 1998)을 유발하며, *Actinomyces neuii*와 *Actinomyces naeslundii*은 골수염(Soto-Hernandez *et al.*, 1999, Vandeveld *et al.*, 1995)을 유발한다고 보고되었다. 또한, *Proteus vulgaris*는 장내 세균으로 골수염과 연관이 있다는 연구 보고가 있다(Friedlander, 1975).

본 연구에서 높은 빈도로 검출된 연쇄구균은 정상 세균총에 속하며 골수염과 직접적

인 관련이 있다는 연구 결과는 없다. 그러나 *S. pneumoniae*와 같은 mitis 군 연쇄구균은 이전에 기술한 바와 같이 이차적 감염으로 인해 심각한 전신질환을 일으키는 중요 병원체로 알려져 있다. 연쇄구균은 16S rDNA 핵산염기서열을 기준으로 anginosus, mitis, mutans, salivarius, bovis, 및 pyogenis 군으로 나뉘는데 본 연구에서는 anginosus, mitis, salivarius 군에 속하는 종이 검출되었다. Anginosus 군 연쇄구균에 속하는 *S. constellatus*와 *S. intermedius* 종은 16S rDNA 핵산염기서열 바탕으로는 구별이 어려우나 Park 등의 연구에서 사용된 PCR primer를 이용하여 두 종간의 구별을 할 수 있었다(Park *et al.*, 2013). Mitis 군 연쇄구균은 임상균주의 16S rDNA 핵산염기서열과 EzTaxon database의 핵산염기서열을 비교하여 상동성이 가장 높은 결과로 균주의 종을 우선적으로 결정하였다. 그 결과 *S. mitis* (3 균주), *S. pseudopneumoniae* (3 균주), *S. oralis* (3균주), *S. sanguinis* (1균주), *S. parasanguinis* (3 균주), *S. australis* (1 균주), *S. gordonii* (1 균주), *S. sinensis* (1 균주), *S. infantis* (1 균주), *S. rubneri* (1 균주) 로 동정되었다. 그러나, mitis 군 연쇄구균의 16S rDNA 핵산염기서열은 상이성이 부족하여 상동성 검색 결과가 99% 이상인 종이 여러 개 존재하여 균주의 종을 명확하게 밝히기는 어려웠다. 따라서, 16S rDNA 이외의 housekeeping 유전자 (*rpoB*, *sodA*, *groEL*)를 이용한 계통발생 분석을 통해 종이 명확하지 않은 균주들을 분류해 보고자 하였다. 그 결과 housekeeping 유전자를 기준으로 한 계통발생 분석이 16S rDNA 핵산염기서열을 기준으로 한 계통발생 분석보다 세균 종 간 상이성이 크게 나타나 세균을 종 수준으로 동정하는데 효과적이라는 연구 보고와 다른 결과였다. 또한, 여러 housekeeping 유전자 핵산염기서열을 순서대로 연결하여 하나로 만들고 이를 계통발생 분석하여 세균을 종 수준 및 아종 수준까지 동정하는 방법인 MLST 법(Cesarini *et al.*, 2009)도 단일 유전자를 이용한 결과와 같이 모든 종을 분류하기는 어려웠다. 이는 MLST법에 사용된 유전자의 종류와 개수에 따라 계통발생 분석결과가 다르게 나올 수 있기 때문에 차후에 더 많은 유전자를 이용한 MLST 법으로 계통발생 분석을 시행하고자 한다.

한국인의 구강에서 분리 동정된 균주의 수종 항생제 감수성 검사 결과, 균주 대부분

이 한 가지 항생제에 내성을 갖기보다는 다양한 항생제에 내성을 갖고 있었다. 이러한 결과는 환자가 항생제를 처방받을 때, 질병을 일으키는 원인 균에 대한 미생물학적 검사가 이루어지지 않았기 때문에 올바르고 정확한 방법으로 항생제를 사용하지 않은 데서 비롯되었다고 생각해 볼 수 있다. 폴리펩타이드 계 항생물질은 세균의 세포막에 장애를 일으키는 물질로 그람 양성 세균과 그람 음성 세균에 작용하는 물질로 나뉜다. 반코마이신은 그람 양성 세균에 작용하는 항생제로 본 연구결과에서는 연쇄구균과 포도구균이 반코마이신에 100% 감수성을 보여 이를 뒷받침 하였다. 이는 Bancescu 등에 의한 연구와 일치하는 결과였다(Bancescu *et al.*, 1999). 폴리마이신은 그람 음성 세균에 강력한 살균작용을 하는 항생제로 본 결과에서도 대부분의 그람 음성 세균이 폴리마이신에 감수성을 보였다. 페니실린 계 항생제는 β -lactam 고리를 갖고 있으며, 세포벽의 합성을 방해하여 살균작용을 일으킨다(Waxman *et al.*, 1983). 페니실린에 대한 내성은 내성균주가 β -lactam 구조를 파괴시키는 β -lactamase의 유전자를 가지고 있어 항생제의 효능이 없어지기 때문에 생기는 것이다(Wilke *et al.*, 2005). 페니실린은 일반적으로 연쇄구균, 포도구균에 효과적이며, 그 외에 다양한 그람 음성 세균에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 시간이 지나면서 페니실린에 대한 내성을 나타내는 세균들을 보고하는 연구가 증가하고 있다(Bantar *et al.*, 1996, Shin *et al.*, 2008) 본 연구결과 포도구균, 그람 음성 세균(*Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* sp., *Proteus vulgaris*)들이 페니실린 계 항생제에 내성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 이처럼 페니실린 내성을 해결하기 위하여 β -lactamase inhibitor인 clavulanic acid가 개발되었는데 이 물질은 β -lactam 고리를 파괴시키는 β -lactamase와 결합하여 활성을 억제한다. 현재 β -lactamase를 생산해 내는 포도구균이나 그람 음성 세균 감염에는 페니실린 계 물질인 아목사실린과 clavulanic acid를 혼합하여 오그멘틴이라는 제품으로 개발되어 처방되고 있다(Wang *et al.*, 2002). 그럼에도 본 연구 결과 오그멘틴에 내성을 보이는 세균들이 있는데, 이는 β -lactamase inhibitor에 대한 β -lactamase의 결합력이 떨어져서 생긴 결과로 볼 수 있다(Belaoual *et al.*, 1994). 리코사미드 계 항생물질인 클린다마이신은 50S ribosomal subunit에 결합함으로써 단백질 합성을 억제하여 항균 작용을 나타낸다. 장내구균을 제외한 연쇄구균, 포도구균 및 대부분의 혐기성 세균에 효과적이나 출혈성 대장염을 일으키는 경우가 있어서 페니실린 계 항생제에 알레르기가 있거나 내성이 있는 경우 제한적으로 사용된다. 본 연구결과 장내세균을 제외한 연쇄구균(79.3%)과 포도구균(90.9%)에 높은 감수성을 보였다. 테트라사이클린은

ribosomal의 30S 또는 50S unit에 작용함으로써 단백질 합성을 억제하는 항생제로 사람이나, 동물, 양식장 등 광범위하게 사용되는 항생제이다(Chopra and Roberts, 2001, Roberts, 1996). 본 연구결과 테트라사이클린에 내성을 갖는 균주들이 다수 검출되었는데, 환경에 존재하는 대부분의 세균들이 테트라사이클린에 노출되고 있기 때문에 내성을 갖게 될 확률이 높아진 것으로 생각해 볼 수 있다. 테트라사이클린에 대한 내성균주는 일반적으로 *tetM* 이라는 내성 유전자를 가지고 있는데 Villedieu 등의 연구에 따르면 내성 균주 중에 따라 *tetM* 이외의 다양한 내성 유전자가 존재한다는 연구 결과가 있었다(Villedieu *et al.*, 2002). 본 연구에서 테트라사이클린에 내성을 갖는 균주들은 향후 분자생물학적 방법을 이용하여 종에 따른 내성 유전자에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 세균 배양법과 분자생물학적 분석을 통해 21개 병소에서 주로 검출되는 세균 종은 확인할 수 있었으나 질환과 직접적으로 연관되는 세균을 밝히는 것은 어려웠다. 현재 한국인에서 분리 동정된 구강 세균과 이에 대한 유전자 핵산염기서열에 대한 데이터가 부족한 실정이므로 한국인에서 분리된 임상균주를 많이 확보해야 한다. 또한, 확보된 임상균주 종을 빠르고 정확하게 파악하기 위해서는 DNA-DNA hybridization 법이나 세균 지놈 sequencing법을 신속 정확하고, 경제적인 방법으로 개발하는 연구에 주력할 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한, 임상균주들의 수종항생제에 대한 감수성을 조사한 결과, 특정 항생제에만 내성을 갖는 경우보다 다양한 항생제에 내성을 보이는 경우가 많았다. 이는 미생물학적 검사를 시행하지 않고 잘못된 방법으로 항생제를 사용하여 생긴 결과로 생각된다. 그러므로, 항생제를 올바르게 처방하기 위해서는 원인균에 대한 항생제 감수성 검사를 통하여 균주에 대한 항생제 감수성 검사 자료를 확보하는 것도 중요하고 더 나아가 임상에서 간편하게 병소 부위의 원인균을 동정하여 항생제 내성유전자 존재 유무를 신속하게 알아낼 수 있는 방법을 개발하는 것도 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 한국구강미생물자원은행에서 분양받은 77균주들을 16S rDNA 핵산염기서열 비교 결정법으로 동정하고, mitis 군 연쇄구균으로 동정된 임상균주들을 13종 표준균주의 *rpoB*, *sodA* 및 *groEL* 핵산염기서열을 기준으로 종 수준으로 다시 동정하였으며, 임상균주들의 수종 항생제(Penicillin G, amoxicillin, augmentin[®], cefuroxime axetil, tetracycline, clindamycin, oxacillin, vancomycin 및 polymyxin B)에 대한 감수성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국인 구강병소에서 분리되어 한국구강미생물자원은행에서 분양받은 77균주들을 16S rDNA 핵산염기서열 비교 결정법으로 동정하였다. 그 결과 *Streptococcus* 속 38균주, *Staphylococcus* 속 11균주, *Neisseria* 속 8균주, *Citobacter* 속 7균주, *Gemella* 속 3균주, *Actinomyces* 속 2균주, *Micrococcus* 속 2균주, *Rothia* 속 2균주, *Burkholderia* 속 2균주, *Proteus* 속 1균주, 및 *Klebsiella* 속 1균주로 다양한 종의 균주를 확인할 수 있었다.
2. Mitis 군 연쇄구균으로 동정된 균 중에서 종 수준으로 동정되지 않은 균주들은 13종 표준균주의 *rpoB*, *sodA*, *groEL*, 및 MLST 핵산염기서열을 바탕으로 계통발생 분석을 시행하였다. 그 결과 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 한 계통도보다 housekeeping 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 한 계통도의 상이성이 컸으나 명확하게 모든 종을 분류할 수 있는 유전자는 없었다. 따라서, DNA-DNA hybridization법이나 세균 지놈 sequencing법을 보다 신속하고 경제적으로 시행할 수 있는 방법을 차후 연구할 필요성 있을 것으로 생각된다.
3. 한국인 구강에서 분리된 연쇄구균은 반코마이신에 감수성을 보였고 테트라사이클린에 내성을 보였다. 포도구균의 경우 반코마이신에 감수성을 보였고 페니실린 계 항생제에 내성을 보였다. 그람 음성 세균들은 테트라사이클린에 감수성을 보였고, 클린다마이신에 내성을 보였다. 항생제 감수성 검사에서 보여준 자료는 항생제 초기 치료 처방에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

VI. 참 고 문 헌

- 김미성, 김수관, 정해만, 김생곤, 국중기, 김미광, 김화숙, 유소영. 2003. 분자생물학적 기법을 이용한 악골골수염 병소의 세균 동정. *대한구강악안면외과학회*. 29:48-55.
- Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N. 1997. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol*. 24:830-835.
- Aracil B, Minambres M, Oteo J, Torres C, Gomez-Garces JL, Alos JI. 2001. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 48:592-594.
- Băncescu G, Skaug N, Dumitriu S, Băncescu A. 1999. Antimicrobial susceptibility of some streptococci strains of anginosus group isolated from oral and maxillofacial infections. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 58:57-63.
- Bantar C, Fernandez CL, Relloso S, Lanza A, Bianchini H, Smayevsky J. 1996. Species belonging to the "*Streptococcus milleri*" group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 34:2020-2022.
- Becker, M. R., B. J. Paster, E. J. Leys, M. L. Moeschberger, S. G. Kenyon, J. L. Galvin, S. K. Boches, F. E. Dewhirst, and A. L. Griffen. 2002. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J. Clin. Microbiol*. 40:1001-1009.
- Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Nevot P, Krishnamoorthy R. et al. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett*. 120:75-80.
- Berbari, E. F., F. R. Cockerill III, and J. M. Steckelberg. 1997. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganism. *Mayo Clin. Proe*. 72:532-542.
- Bresco-Salinas M, Costa-Riu N, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. 2006.

- Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11:51–56.
- Buduneli, N., H. Baylas, E. Buduneli, O. Turkoglu, T. Kose, and G. Dahlen. 2005. Periodontal infections and pre-term low birth weigh: a case-control study. *J. Clin. Periodontol*. 32:174–181.
- Cesarini S, Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Dalmastrri C. 2009. *RecA* gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Lett Appl Microbiol*. 49: 580–588.
- Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232–260.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 7th ed. Approved standard M7–A7. Wayne, Pa, USA.
- Dodman, T., J. Robson, and D. Pincus. 2000. *Kingella kingae* infections in children. *J. Paediatr. Child. Health*. 36:87–90.
- Drancourt, M., V. Roux, P. E. Fournier, and D. Raoult. 2004. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J. Clin. Microbiol*. 42:497–504.
- Dymock, D., A. J. Weightman, C. Scully, and W. G. Wade. 1996. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J. Clin. Microbiol*. 34:537–542.
- Friedlander AH. 1975. *Proteus vulgaris* osteomyelitis of the mandible Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 40:39–44.
- Glazunova OO, Raoul D, Roux V. 2009. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 59:2317–2322.
- Groppo FC, Castro FM, Pacheco AB. Motta RH, Filho TR, Ramacciato JC, et al. 2005. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and oral streptococci

- strains from high-risk endocarditis patients. *Gen Dent.* 53:410-413.
- Haffajee AD, Socransky SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 5:78-111.
- Kawamura, Y., R. A. Whaley, S.-E. Shu, T. Ezaki, and J. M. Hardie. 1999. Genetic approaches to the identification of the mitis group with the genus *Streptococcus*. *Microbiology.* 145:2605-2613.
- Kazor, C. E., P. M. Mitchell, A. M. Lee, L. N. Stokes, W. J. Loesche, F. E. Dewhirst, and B. J. Paster. 2003. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:558-563.
- Kim SG, Jang HS. 2001. Treatment of chronic osteomyelitis in Korea. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endol* 92:394-398.
- Kong R, Mebazaa A, Heitz B, De Briel DA, Kiredjian M, Raskine L, et al. 1998. Case of triple endocarditis caused by *Rothia dentocariosa* and results of a survey in France. *J Clin Microbiol* 36:309-310.
- Kroes, I., P. W. Lepp, and D. A. Relman. 1999. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14547-14552.
- La Scola B, Raoult D. 1998. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. *J Clin Microbiol.* 36:866-871.
- Lane D.J., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin, and N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.
- Larkin J, Montero J, Targino M, Powers A, Accurso C, Campbell M. 2001. *Rothia dentocariosa* Endocarditis. *Clin Microbiol News let* 23:13-15.
- Love RM, Jenkinson HF. 2002. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:171-183.
- Machuca M, Espejo, Gutierrez L, Herrera J. 2000. Análisis de la prescripción antibiótica en una farmacia comunitaria. *Pharm Care Esp.* 18:300-307.
- Marsh, P.D. 1992. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J. Dent. Res.* 71:1431-1438.

- May T, Amiel C, Lion C, Weber M, Gerard A, Canton P. 1993. Meningitis due to *Gemella haemolysans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:644-645.
- Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, et al. 1985. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 48:507-519.
- Morcillo E, Cortijo J, Villagrasa V. 1996. Bases farmacológicas de la antibioticoterapia en infecciones odontogénicas. *Med Oral.* 1:15-23.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weighman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 81:761-766. Erratum in: *J Dent Res.* 2003. 82:69. *J Dent Res* 2003. 82:247. 2002.
- Nonaka Y, Kiyofuji C, Takano Y, Ito K. 2000. Pyogenic vertebral osteomyelitis caused by *Gemella haemolysans*. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 10:980-982.
- Offenbacher, S., H. L. Jared, P. G. O'Reilly, S. R. Wells, G. E. Salvi, H. P. Lawrence, S. S. Socransky, and J. D. Beck. 1998. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann. Periodontol.* 3:233-250.
- Park SN, Choi MH, and Kook JK. 2013. Molecular identification of Anginosus group streptococci isolated from Korean oral cavities. *J Oral Biol.* 38:21-27.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183:3770-3783.
- Paster, B. J., W. A. Falkler, Jr., C. O. Enwonwu, E. O. Idigbe, K. O. Savage, V. A. Tamer, R. L. Ericson, C. N. Lau, and F. E. Dewhirst. 2002. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. *J. Clin. Microbiol.* 40:2187-2191.
- Paster, B. J., M. K. Russell, T. Alpagot, A. M. Lee, S. K. Boches, J. L. Galvin, and F. E. Dewhirst. 2002. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. *Ann. Periodontol.* 7:8-16.
- Petersen, P.E. 2003. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral

- Health Programme. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 31:3-24.
- Petersen, P.E. 2004. Challenges to improvement of oral health in the 21st century the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Int. Dent. J.* 54:329-343.
- Poyart, C., G., Quesne, and P. Trieu-Cuot. 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38:415-418.
- Roberts MC. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 19:1-24.
- Sakamoto, M., M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno. 2000. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Microbiol. Immunol.* 44:643-652.
- Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. 1995. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J. Dent Res.* 74:1360 - 1366.
- Shin KM, Choe SJ, Lee SY. 2008. Antimicrobial susceptibility of viridans *Streptococcus* plaque isolates in Korea. *J Oral Biol.* 33:197-203.
- Soto-Hernandez JL, Morales VA, Lara Giron JC, Balderrama Banares J. 1999. Cranial epidural empyema with osteomyelitis caused by *actinomyces*, CT, and MRI appearance. *Clin Imaging* 23:209-214.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Biol Evol.* 28:2731-2739.
- Teng, L. J., P. R. Hsueh, J. C. Tsai, P. W. Chen, J. C. Hsu, H. C. Lai, C. N. Lee, and S. W. Ho. 2002. *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. *J. Clin. microbiol.* 40:3172-3178.
- Vallano A, Izarra A. 2006. Principios de terapéutica antimicrobiana. *Medicine.* 9:3196-3203.
- van Dijk M, van Royen BJ, Wuisman PI, Hekker TA, van Guldener C. 1999.

- Trochanter osteomyelitis and ipsilateral arthritis due to *Gemella morbillorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:600–602.
- Vandevelde AG, Jenkins SG, Hardy PR. 1995. Sclerosing osteomyelitis and *Actinomyces naeslundii* infection of surrounding tissues. *Clin Infect Dis* 20:1037–1039.
- Villedieu, A., M.L. Diaz-Torres, N. Hunt, R. McNab, D.A. Spratt, M. Wilson, and P.Mullany. 2003. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:878–882.
- Wade, W. G., D. A. Spratt, D. Dymock, and A. J. Weightman. 1997. Molecular detectin of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. *Clin. Infect. Dis.* 25:S235–S236.
- Wang, X., G. Minasov, and B.K. Shoichet. 2002. The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J. Biol. Chem.* 277:32149–32156.
- Waxman, D.J. abd J.L. Strominger. 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52:825–869.
- Whiley RA, Beighton D. 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13: 195–216.
- Wilke, M.S., A.L. Lovering, and N.C. Strynadka. 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:525–533.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. 1990. In: Ausubel FM & Brent Reds. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience. 241–245.

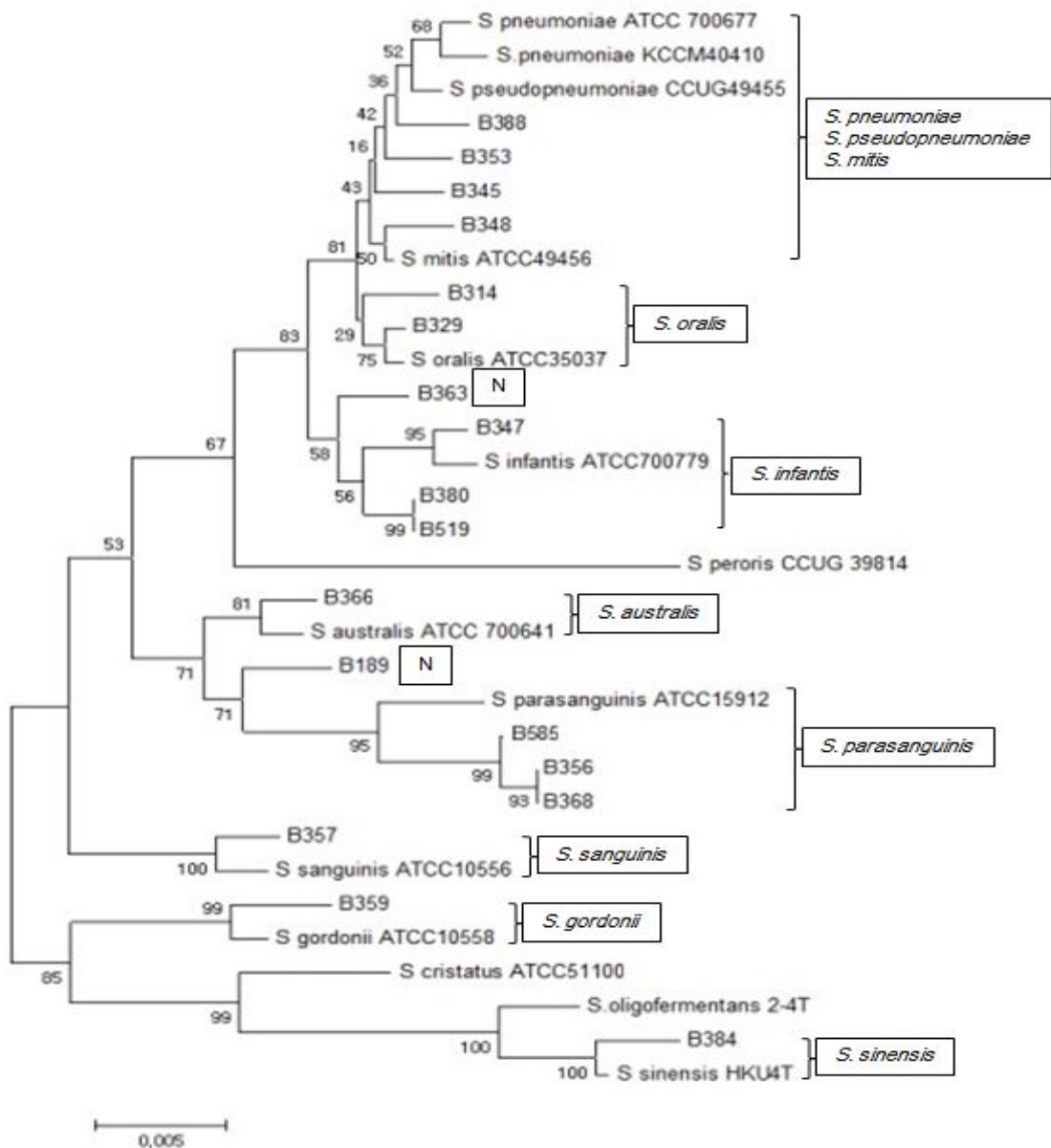


Fig. 1. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of 16S rDNA (about 1.33 kb) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.

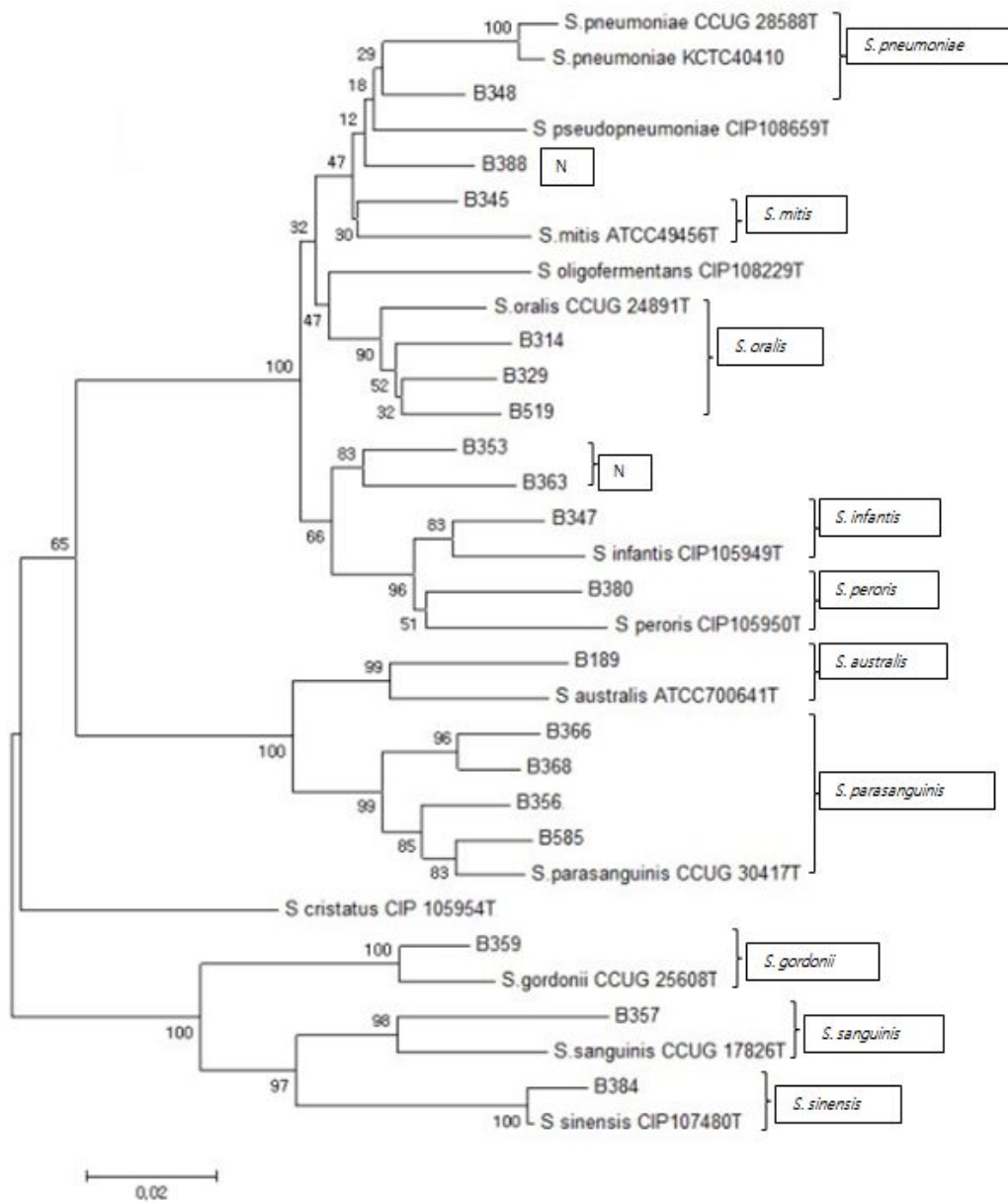


Fig. 2. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *rpoB* (680 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.

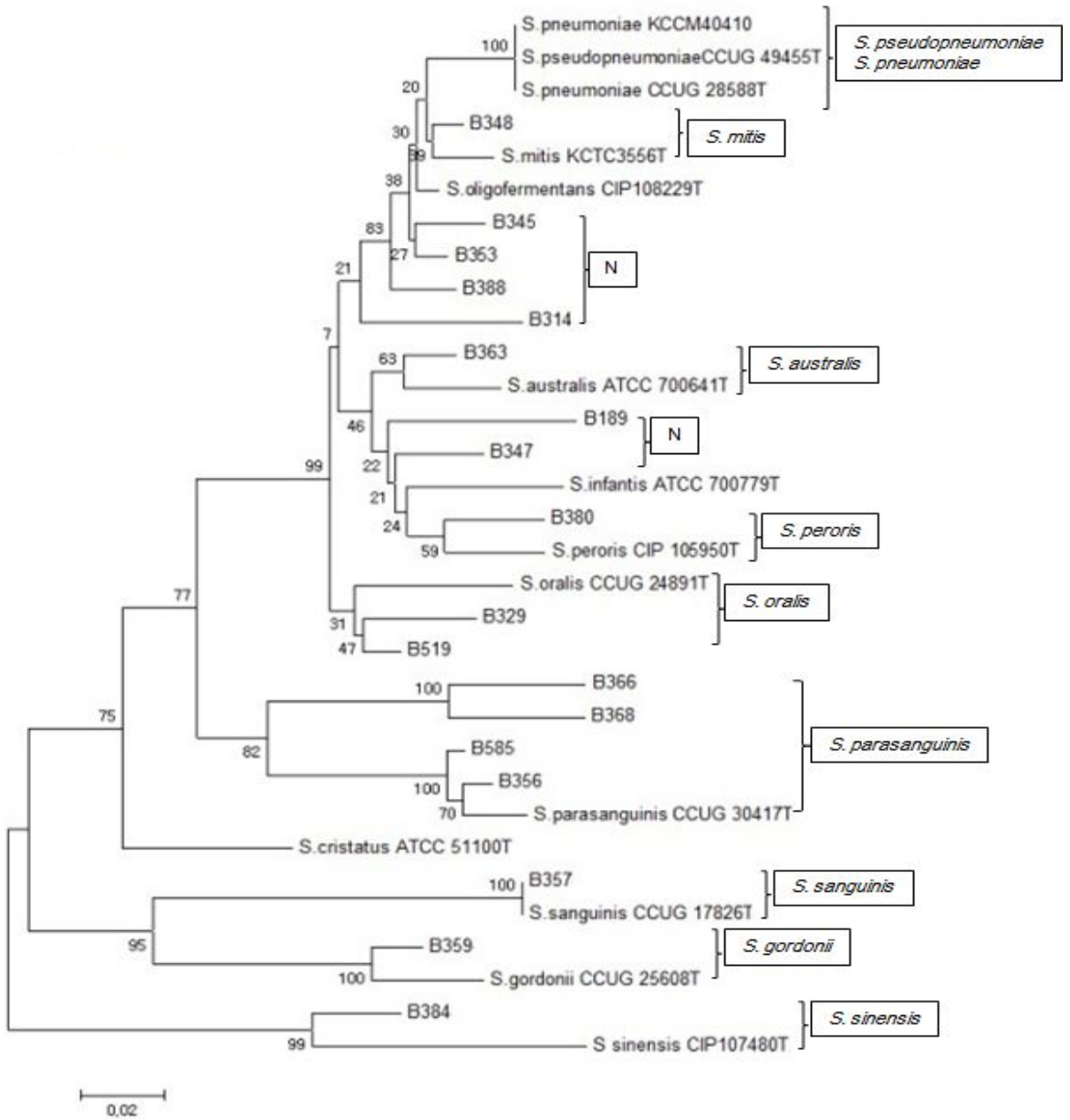


Fig. 3. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *sodA* (366 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.

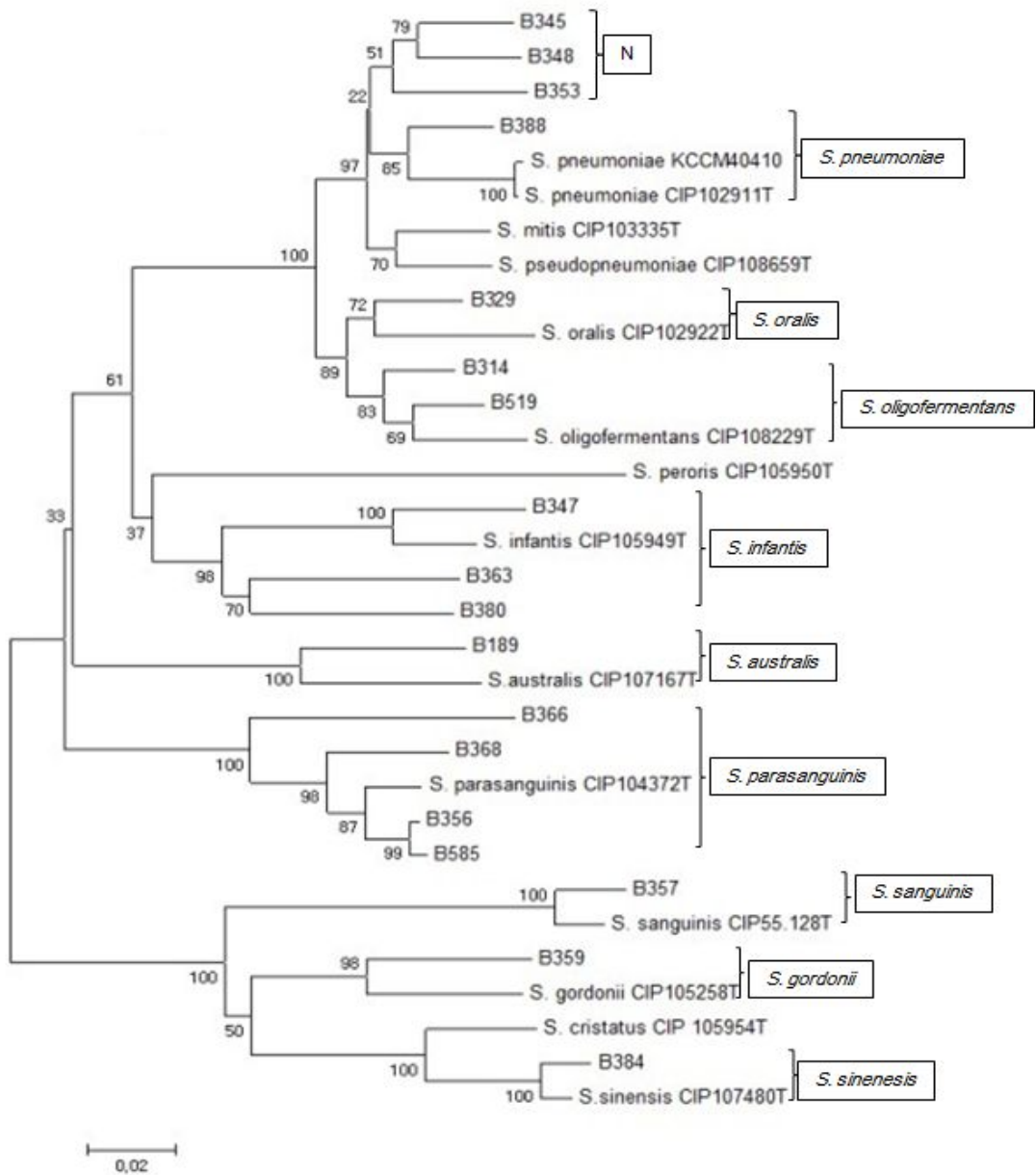


Fig.4. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of *groEL* (756 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.

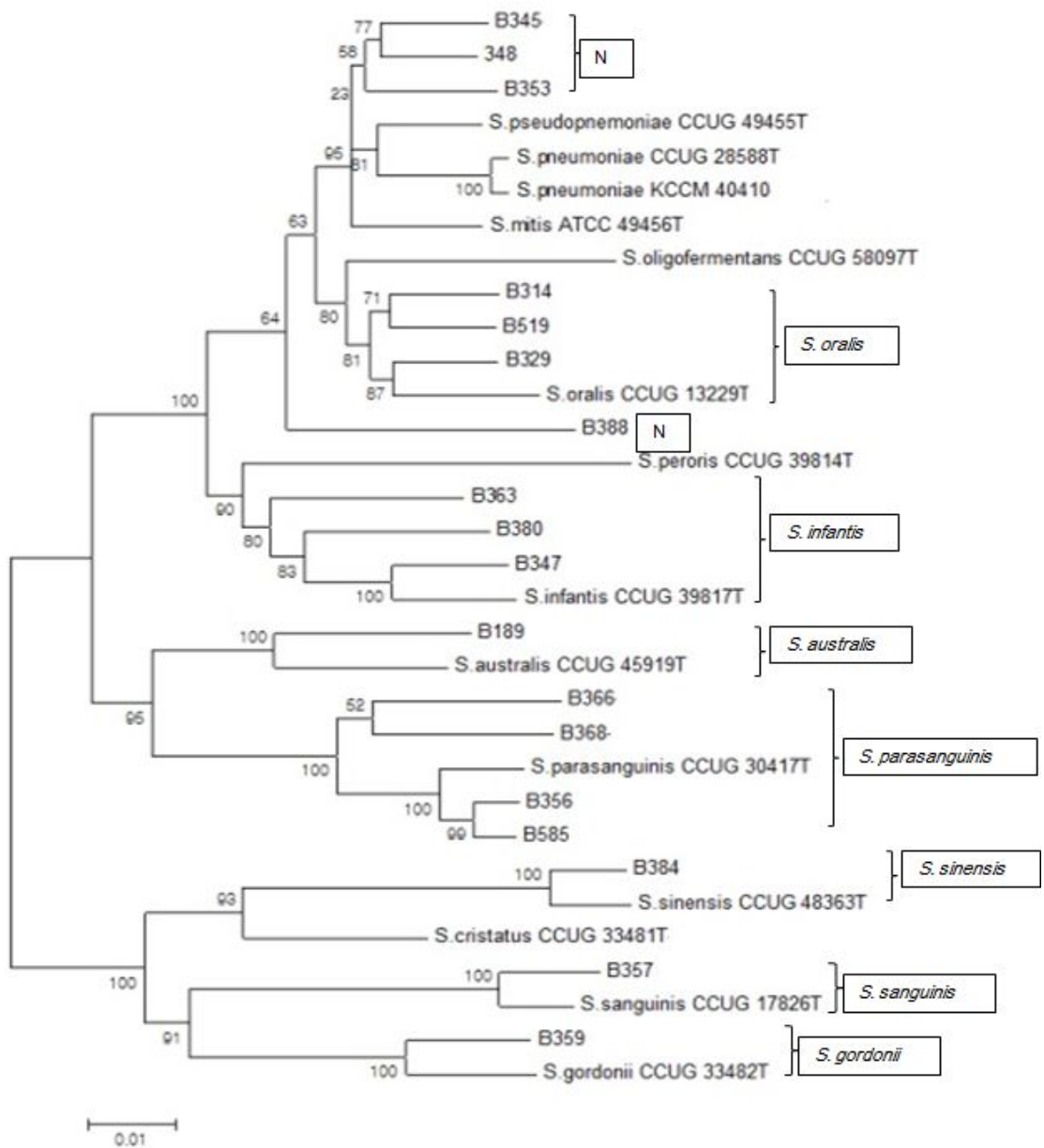


Fig.5. Phylogenetic trees base on the partial nucleotide sequences of MLST (3128 bp) of type strains and clinical isolates of mitis group streptococci. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses of the neighbor-joining tree based on 1,000 resamplings. The scale bar (neighbor-joining distance) represents a 5% difference in nucleotide sequence.