CHOSUN UNIVERSITY 1946 2006년 2월 박사학위논문

사람 치은염 병소의 치면세균막에서 분리· 동정된 Fusobacterium nucleatum의 수종

조선대학교 대학원

항생제에 대한 내성 검사

치의학과

최 재 흥

> 사람 치은염 병소의 치면세균막에서 분리· 동정된 Fusobacterium nucleatum의 수종 항생제에 대한 내성 검사

> Antibiotic susceptibility in *Fusobacterium nucleatum* isolated from the dental plaque in human gingivitis lesion

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

최 재 흥

## 사람 치은염 병소의 치면세균막에서 분리· 동정된 Fusobacterium nucleatum의 수종 항생제에 대한 내성 검사

지도교수 김 동 기

이 논문을 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

치의학과

최 재 흥

최재흥의 박사학위 논문을 인준함

위원장 전북대학교 장 기 완 亚 수 고 영 무 위 원 조선대학교 인 亚 김 도 경 위 원 조선대학교 수 인 亚 위 원 조선대학교 수 국 중 기 亚 인 김 동 기 위 원 조선대학교 수 인 교

2005년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차	ii
ABSTRACT	iii
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	3
III. 연구결과	8
IV. 총괄 및 고안	13
V. 결론	16
착고문헌	17

#### 표 목 차

Table 1. Strains of Fusobacterium nucleatum used in this study 4
Table 2. Breakpoint of susceptibility for the antibiotics 7
Table 3. Identification of strains of <i>Fusobacterium nucleatum</i> at the species or subspecies level used in this study9
Subspecies level used in this study
Table 4. MIC test for Fusobacterium nucleatum against eight antibiotics10
Table 5. MIC <sub>90</sub> and MIC <sub>50</sub> value of seven antibiotics for <i>Fusobacterium nucleatum</i>



#### ABSTRACT

Antibiotic susceptibility in *Fusobacterium nucleatum* isolated from the dental plaque in human gingivitis lesion

Choi, Jae-Heung, D.D.S., M.S.D.

Advisor: Prof. Kim, Dong-Kie, D.D.S., M.S.D., Ph. D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

**Objectives**: The purpose of this study was to investigate the antimicrobial susceptibility of Fusobacterium nucleatum isolated from the dental plaques in gingivitis lesion of Koreans. **Methods**: The minimal inhibitory concentration of 7 antibiotics for 34 strains of F. nucleatum was tested by broth microdilution assay. **Results**: The data showed that only 2 out of 34 strains have resistance to penicillin G, amoxicillin, and Augmentin<sup>®</sup> (amoxicillin + clavulanic acid, 5:1). The other strains were sensitive to all of the antibiotics tested in this study except ciprofloxacin. **Conclusion**: These results suggest that penicillin G or amoxicillin could be used in the first choice antibiotics for the target of F. nucleatum in Koreans.

#### I. 서론

치주질환은 치아우식증과 더불어 양대 구강병으로 알려져 있도, 치은출혈과 종창, 치주낭의 형성, 부착치은의 상실, 치조골의 파괴 및 구취와 같은 다양한 임상적인 증상을 나타내며 치아상실의 주된 원인이다<sup>3,13)</sup>. 치주질환은 일반적으로 여러 국소적 및 전신적 요인에 의해 발병하는 것으로 알려져 있으며, 국소적 요인 중 가장 중요한 것은 치면세균막이다<sup>20)</sup>. 치면세균막 내에는 현재까지 약 500여 세균 종들이 존재하는 것으로 알려있다<sup>24)</sup>. 주요한 치주질환의 원인 균종으로는 Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Tannerella forsythia(=Bacteroides forsythus), Eikellena corrodens, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia 및 spirochetes 등인 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

F. nucleatum은 혐기성 그람 양성 세균으로 구강 내 대부분의 세균과 응집할 수 있는 능력이 있어서 치면세균막 형성과정에서 초기 집락화하는 세균과 후기 집락화하는 세균간의 연결고리 역할을 하는 것으로 알려져 있다 $^{27}$ . F. nucleatum은 치면세균막 내에서 혐기성인 치주질환 원인균들의 성장에 필요한 혐기성 환경을 만들어주는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다 $^{9}$ . 또한, F. nucleatum은 숙주의 A. actinomycetemcomitans에 대한 T-cells의 이차 면역 반응을 변형시키는 능력이 있음이 보고 되었다 $^{31}$ .

지난 20여 년간의 치주질환의 항생제 치료에 대한 많은 연구에 의하면, 치주질환에 있어서 세균 특이성이 있다는 결과들이 쌓여가고 있다<sup>29)</sup>. 미생물을 선택적으로 작은 농도에서 죽이거나 성장을 억제시킬 수 있는 천연 또는 합성 유기물질이라고 정의될수 있는 항생제는 심한 치주질환 감염에 특히 유용하다<sup>29)</sup>. 현재의 치주질환 치료에서는 특정 치주질환 원인균종만을 억제하거나 제거해야함이 강조되고 있다<sup>30)</sup>. 비외과적스케일링과 치근면활택술로 치면세균막을 제거할 수는 있다<sup>11,19)</sup>. 하지만, 이러한 방법으로는 상피하 치은조직, 치주낭 상피세포, 구강 내 점막, 혀나 편도에 서식하는 치주질환 원인균들을 완전히 제거할 수 없어, 이들에 의한 치주조직으로의 이주를 막을 수 없다<sup>7,26)</sup>. 전신적 항생제 치료는 치주낭뿐만 아니라 구강 내 다른 조직에 존재하는 치

주질환 원인균까지 제거할 수 있어 치은연하치면세균막의 재형성을 지연시킬 수 있어 치주질환의 치료 및 재발 방지에 효과적이다<sup>21)</sup>.

치주질환에 있어서 주요한 역할을 한다고 잘 알려진 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* 및 *Treponema denticola*를 포함한 대부분의 치주질환 원인균들은 혐기성 세균들이기 때문에, 주로 치면세균막의 형성에 있어서 혐기성 환경이 조성된 후에 집략화가 시작된다. 이러한 혐기성 치면세균막 형성에 있어서 중요한 역할을 하는 *F. nucleatum*을 제거하면 치주질환의 발병 및 진행을 억제할수 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구는 한국인에서 분리 동정된 *F. nucleatum*에 대한 7종 항생제에 대한 감수성을 조사하여, 치주질환자의 치료 및 치료 보조제로써 항생제를 처방하기 위한 기초 자료를 얻고자 시행하였다.

#### II. 연구재료 및 방법

#### II-1. 세균 및 배양 조건

본 연구에서 사용된 *F. nucleatum* 4가지 아종에 대한 표준균주들은 American Type Culture Collection(ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 사용된 한국인에서 분리 동정된 34 균주의 *F. nucleatum*은 조선대학교 치과대학 구강생화학교실(Department of Oral Biochemistry, Chosun university, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 이들 균주들은 20 명의 한국인에서 분리되었다(Table 1). 모든 균주들은 Schaedler broth(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 또는 1.5% Bacto agar(Difco Laboratories)가 첨가된 Schaedler 한천 배지에 접종하여 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 및 80% N<sub>2</sub>의 혼합가스가 공급되는 37℃ 혐기성 배양기 (Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 1-2일 동안 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

#### II-2. 세균 유전체 DNA 추출

세균의 유전체 DNA는 G-spin<sup>™</sup> Genomic DNA Extraction kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 사용하여 추출하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 50 №의 Pre-incubation 용액과 3 №의 lysozyme 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 №의 G-buffer 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 65℃에서 15분간 반응시키고, 250 №의 Binding 용액을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin<sup>™</sup> column에 넣고 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리한 후 column에 500 №의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin<sup>™</sup> column을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 여기에 100 №의 elution buffer 를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리하여 유전체 DNA를 추출하였다.

Table 1. Strains of Fusobacterium nucleatum used in this study

Strains	Patient No.	Tooth site (#)
ATCC 25586 <sup>T</sup>	=	_
ATCC 10953 <sup>T</sup>	_	
ATCC 49256 <sup>T</sup>	-	_
ATCC 51190 <sup>T</sup>	-	=
ChDC F37	Yebang 4	35
ChDC F47	Yebang 4	44
ChDC PV-F42	Yebang 21	15
ChDC PV-F45	Yebang 21	15
ChDC PV-F48	Yebang 21	26
ChDC PV-F55	Yebang 21	34
ChDC PV-F61	Yebang 21	34
ChDC PV-F63	Yebang 21	43
ChDC F113*	Seong 1	44
ChDC F119*	Seong 3	36
ChDC F128*	Seong 4	16
ChDC F130*	Seong 4	21
ChDC F134*	Seong 4	44
ChDC F145*	Seong 5	41
ChDC F165*	Seong 6	44
ChDC F174*	Seong 9	41
ChDC F175*	Seong 9	41
ChDC F186*	Seong 10	36
ChDC F206*	Seong 13	44
ChDC F218*	Seong 16	41
ChDC F219	Seong 16	41
ChDC F286*	Seong 25	21
ChDC F288*	Seong 25	36
ChDC F289*	Seong 25	44
ChDC F300	Haksang 20	16
ChDC F302	Haksang 21	16
ChDC F309	Haksang 21	36
ChDC F304	Haksang 24	16
ChDC F305	Haksang 24	24
ChDC F306	Haksang 26	16
ChDC F307	Haksang 28	16
ChDC F310	Yebang P2	14
ChDC F311	Yebang P2	36
ChDC F313	Chijoo PI9	46

ATCC, American Type Culture Collection; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; \*Those were isolated in previous study<sup>1)</sup>.

#### CHOSUN UNIVERSITY 1946цэ 160 грыл 크리나 및 체사업기

II-3. 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정

분양받은 34균주의 종 또는 아종 수준에서의 재동정(re-identification)을 위해 16S rDNA를 각각의 균주로부터 클로닝하여 핵산염기서열을 결정하였다. 대부분 세균의 16S rDNA 유전자를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), AccuPower® Premix(Bioneer Corp.)와 PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR machine을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 이때 PCR 조건은 다음과 같다. 20 雌의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94℃에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 결합반응, 72℃에서 1분간 중합하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72℃에서 10분간 중합하였다. 최종 반응물을 2 雌씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

#### II-4. 증폭된 16S rDNA의 클로닝 및 플라스미드 DNA 추출

앞에서 증폭한 16S rDNA를 pGEM-T easy vector(Promega Corp., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 군락을 3 개씩 선택하여 플라스미드를 추출하여 클로닝 성공여부를 결정하였다.

 $E.\ coli$  DH5a에 형질전환시킨 각각의 재조합 플라스미드 DNA를  $AccuPrep^{TM}$  Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 配를 30초간 원심분리( $12,000x\ g$ )하고, 얻어진 세균 당어리를  $250\ \mu$ 신의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후,  $250\ \mu$ 신 Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음,  $350\ \mu$ 신의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 혼합한 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 10분간 원심분리( $12,000x\ g$ )하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리( $12,000x\ g$ )하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을  $700\ \mu$ 신 넣은 후 1분간 원심분리( $12,000x\ g$ )하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해

여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리(12,000 x g) 하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 ⊯의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리(12,000x g)하여 여과액을 -70℃에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다.

#### II-5. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), Seq-F1(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), Seq-R2(5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'), F16(5'-TAG ATA CCC YGG TAG TCC-3'), 및 ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')를 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Maidison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

#### II-6. 최소성장억제농도 측정

한국인에서 분리 동정된 F. nucleatum 균주 및 표준균주들의 7가지 항생제에 대한 감수성을 조사하기 위하여 액체배지 미세희석법 $^{21}$ 으로 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다. 본 실험에서 사용된 항생제 중 penicillin G, amoxicillin, tetracycline 및 metronidazole은 씨그마사(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, Augmentin $^{(g)}$ (amoxycillin + cavulanic acid, 5:1)은 SmithKline Beecham 사(Brentford, UK), ciprofloxacin은 삼천당제약회사(Seoul, Korea) 그리고, cefuroxim axetile 대응제약회사(Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 본 실험에서 실시한 액체배지 미세희석법을 설명하자면 다음과 같다. 각각의 항생제의 농도가 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0  $\mu$ g/ $\pi$ l 되도록 조절된 0.1  $\pi$ l의 액체배지에, 450 nm의 파장에 대한 흡광도( $A_{450}$ )가 0.05로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1  $\pi$ l엔 접종하고, 이를 각 세균의 최적 성장 조건에서 48시간 배양한 후, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 음성

대조군인 세균을 넣지 않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 MIC 값으로 결정하였다. 이때 양성대조군으로는 항생제를 넣지 않은 세균 배양액으로 하였다. 이때 7종 각각의 항생제에 대한 *F. nucleatum* 균주들의 내성과 감수성을 판단하는 기준은 Haffajee 등 <sup>14)</sup>과 Jorgensen 등<sup>15)</sup>)이 제시한 기준에 따랐다(Table 2).

Table 2. Breakpoint of susceptibility for the antibiotics (Haffajee *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 1999)

Antibiotics	Breakpoint of susceptibility $(\mu g/m\ell)$
Penicillin G	0.5
Amoxicillin	3
Augmentin (anixicillin + clavulanate	2) 3.0+0.5
Tetracycline	8
Cefuroxime axetil	4
metronidazole	8
Ciprofloxacin	4

#### III. 연구 결과

조선대학교 치과대학 구강생화학교실 및 한국구강미생물자원은행에서 분양받은 *F. uncleatum*의 16S rDNA를 클로닝하고 핵산염기서열을 결정하여, 종 또는 아종 수준으로 재동정(re-identification)한 결과 34 균주 모두 *F. nucleatum*인 것으로 확인되었다 (Table 3). 이들 중 가장 많은 아종은 26 균주의 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*이었으며, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*은 3 균주였다. 그리고 5 균주는 기존의 4가지 아종의 어디에도 포함되지 않았다(Table 3).

F. nucleatum 4가지 아종(subspecies)의 표준균주들과 한국인에서 분리 동정된 34 균주들의 7가지 항생제에 대한 내성 검사를 실시한 결과 모든 균주들이 tetracycline, cefuroxime axetil 및 metronidazole에 대하여 감수성을 보였다(Table 4). Penicillin G, amoxicillin 및 Augmentin<sup>®</sup> 등의 페니실린계에 대해서는 2명 환자에서 각각 분리 동정된 ChDC F302와 ChDC F306 균주를 제외하고는 모두 내성을 보였다(Table 4). 다만 ChDC F311 균주가 penicillin G에 대하여 중간내성을 갖는 경향을 보였다. Ciprofloxacin에 대하여 ChDC F206와 ChDC F286 두 균주를 제외하고는 모든 균주들이 내성을 보였다(Table 4).

본 연구에서 7종에 항생제에 대한 F. nucleatum의  $MIC_{90}$ 와  $MIC_{50}$  값을 Table 5에 정리하였다.

Table 3. Identification of strains of *Fusobacterium nucleatum* at the species or subspecies level used in this study

Strains	Species or subspecies*
ATCC 25586 <sup>T</sup>	F. nucleatum subsp. nucleatum
ATCC 10953 <sup>T</sup>	F. nucleatum subsp. polymorphum
ATCC 49256 <sup>T</sup>	F. nucleatum subsp. vincentii
ATCC 51190 <sup>T</sup>	F. nucleatum subsp. fusiforme
ChDC F37	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F47	F. nucleatum
ChDC PV-F42	F. nucleatum subsp. nucleatum
ChDC PV-F45	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC PV-F48	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC PV-F55	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC PV-F61	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC PV-F63	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F113**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F119**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F128**	F. nucleatum
ChDC F130**	F. nucleatum subsp. nucleatum
ChDC F134**	F. nucleatum
ChDC F145** ChDC F165**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F103 ChDC F174**	F. nucleatum subsp. polymorphum F. nucleatum
ChDC F174 ChDC F175**	F. nucleatum  F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F173 ChDC F186**	F. nucleatum subsp. polymorphum  F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F206**	F. nucleatum  F. nucleatum
ChDC F218**	F. nucleatum
ChDC F219	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F286**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F288**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F289**	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F300	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F302	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F309	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F304	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F305	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F306	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F307	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F310	F. nucleatum subsp. polymorphum
ChDC F311	F. nucleatum subsp. nucleatum
ChDC F313	F. nucleatum subsp. polymorphum

\*based on 16S rDNA sequence; ATCC, American Type Culture Collection; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; \*\*Those were isolated in previous study<sup>1)</sup>.

Table 4. MIC test for Fusobacterium nucleatum against seven antibiotics

Cturing		MIC (μg/mℓ)					
Strains	PEG	AMX	AMC	TET	CXM	MTZ	CIP
ATCC 25586 <sup>T</sup>	0.125	ND	ND	0.125	1	4	16
ATCC 10953 <sup>T</sup>	0.125	0.125	0.5	0.25	1	8	8
ATCC 49256 <sup>T</sup>	0.125	0.5	ND	0.125	1	8	8
ATCC 51190 <sup>T</sup>	0.5	ND	ND	0.125	1	8	8
ChDC F37	0.125	0.125	0.5	1	0.5	4	16
ChDC F47	0.125	1	0.25	ND	2	2	16
ChDC PV-F42	0.125	0.125	0.25	1	1	8	16
ChDC PV-F45	ND	0.125	0.25	1	0.25	2	16
ChDC PV-F48	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5	1	8
ChDC PV-F55	0.125	0.5	0.5	0.5	0.5	4	8
ChDC PV-F61	0.125	2	1	0.5	1	4	16
ChDC PV-F63	0.125	0.25	1	0.125	2	4	8
ChDC F113	0.125	0.125	0.125	1	0.5	4	16
ChDC F119	ND	0.125	0.125	0.5	0.5	2	16
ChDC F128	ND	8	ND	0.25	1	4	8
ChDC F130	ND	32	ND	0.125	2	2	16
ChDC F134	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	2	8
ChDC F145	0.5	0.25	0.5	0.5	2	8	16
ChDC F165	0.125	0.125	0.25	0.5	0.5	1	8
ChDC F174	0.125	0.125	0.25	0.125	1	8	8
ChDC F175	0.25	0.125	0.125	0.5	1	2	8

ATCC, American Type Culture Collection; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; PEG, penicillin G; AMX, amoxicillin; AMC, augmentin, TET, Tetracycline; CXM, Cefuroxime axetil; MTZ, metronidazole; CIP, Ciprofloxacin; ND, Not Determined

(Continued on next page)

Table 4. (Continued in prvious page)

	MIC (μg/mℓ)						
Strains	PEG	AMX	AMC	TET	CXM	MTZ	CIP
ChDC F186	0.125	0.25	0.25	1	0.25	2	16
ChDC F206	0.125	0.125	0.25	0.5	2	8	4
ChDC F218	0.125	0.5	2	1	1	8	16
ChDC F219	0.125	0.25	0.25	2	1	8	8
ChDC F286	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
ChDC F288	0.125	0.125	0.25	1	0.5	2	16
ChDC F289	0.125	0.125	0.25	1	0.5	1	16
ChDC F300	0.125	0.125	0.5	0.25	2	8	8
ChDC F302	> 64	> 64	> 64	8	1	4	8
ChDC F309	0.125	0.125	0.5	0.25	1	4	16
ChDC F304	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5	2	8
ChDC F305	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5	1	8
ChDC F306	> 64	> 64	> 64	2	1	8	16
ChDC F307	0.125	0.125	0.25	0.25	1	1	16
ChDC F310	0.125	0.25	2	1	2	4	16
ChDC F311	1	0.125	0.25	ND	4	2	8
ChDC F313	0.5	0.5	2	1	1	2	16

ATCC, American Type Culture Collection; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; PEG, penicillin G; AMX, amoxicillin; AMC, augmentin, TET, Tetracycline; CXM, Cefuroxime axetil; MTZ, metronidazole; CIP, Ciprofloxacin; ND, Not Determined.

Table 5. MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> value of seven antibiotics for Fusobacterium nucleatum

Antibiotics —		MIC (μg/mℓ)					
		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>			
PEN		0.125~>64	0.125	0.5			
AMX		0.125~>64	0.125	1			
AMC		0.125~>64	0.25	1			
TET		0.125~8	1	2			
CXM		$0.125 \sim 4$	0.5	1			
MTZ		0.25~8	2	8			
CIP		$0.25 \sim 16$	16	16			

MIC<sub>50</sub> or MIC<sub>90</sub> is the minimal inhibitory concentration (MIC) at which 50% or 90% of each of antibiotics against clinical isolates (n= 34) of *F. nucleatum*, respectively. PEG, penicillin G; AMX, amoxicillin; AMC, augmentin, TET, Tetracycline; CXM, Cefuroxime axetil; MTZ, metronidazole; CIP, Ciprofloxacin.

#### Ⅳ. 총괄 및 고안

본 연구에서 20 명의 한국인에서 분리 동정된 34균주의 F. nucleatum 중 2명의 환 자에서 각각 분리된 ChDC F302와 ChDC F306 균주들은 ciprofloxacin을 제외한 6종 항생제에 대해 감수성을 보였다. 특히 tetracycline은 정균제이며, 이에 대한 구강 내 세균들의 내성균주가 많기 때문에 임상에서는 거의 처방되지 않고 있지만, 본 연구에 서 사용된 모든 균주들은 tetracycline에 대해 감수성을 보였다. 최근 최 $^{1)}$ 는 F. nucleatum의 tetracycline 내성여부에 대해 세균배양법과 tet M 내성 유전자의 PCR법 에 의한 검출법을 비교한 연구에서 F. nucleatum을 선택배지에서 분리 배양하고, 이를 Kim 등 $^{16)}$ 이 고안한 F. nucleatum 종-특이 PCR 프라이머를 이용하여 동정하여 tetracycline에 대한 내성유무를 조사하였다. 그 연구에 의하면, 총 33 균주를 분리 배 양하여 11 균주가 tetracycline 내성을 보였고, 그중 10 균주에서 tet M 유전자가 검출 되었다. 하지만, 본 연구를 위하여 최<sup>1)</sup>의 연구에 사용되었던 균주들의 16S rDNA를 클 로닝하여 핵산염기서열을 결정한 결과, tetracycline에 내성을 보였던 11 균주 모두가 F. nucleatum이 아닌 연쇄상구균 혹은 F. periodonticum인 것으로 판명되었다(자료는 제시 안함). 이는 Kim 등 $^{16)}$ 이 고안한 F. nucleatum 종-특이 PCR 프라이머는 구강 내 존재하는 Fusobacterium spp.을 검출할 수 있는 것이었으며, 연쇄상구균 종이 검출된 것은 실험 도중 F. nucleatum 유전체 DNA의 오염에 의한 것으로 조사되었다(자료는 제시 안함). 이러한 점을 감안하여, 본 연구에서는 분양받은 모든 균주들의 16S rDNA 를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 다음 본 실험에 사용하였다. 그 결과 최<sup>11</sup>에서 사용되었던 균주들 중 15 균주가 F. nucleatum이었으며( $Table\ 1$ ), 본 연구의 연구 결 과와 같이 모두 tetracycline에 감수성을 보였다. 본 연구 결과 F. nucleatum만을 표적 으로 할 경우 tetracycline도 한국인에 있어서는 치주질환의 치료에 사용가능함을 시사 한다.

본 연구결과 2명(10%)의 환자에서 각각 분리 배양된 ChDC F302와 ChDC F306 균 주들은 Augmentin<sup>®</sup>을 포함한 penicillin 계 항생제에 내성을 보였다. β-lactam 구조를 갖는 페니실린 계 항생제에 대해 내성을 갖는 세균은 β-lactamase를 생산해서 β -lactam 구조를 파괴하는 내성 기전을 갖는다<sup>4)</sup>. F. nucleatum에서도 β-lactamase를 생

Cefuroxime axetil은 세포벽의 합성을 억제하여 항균력을 나타내는 반합성 세파로스포린 계 항생제이며, β-lactamase에 대하여 안정하여 그람 양성균, 그람 음성 세균 및혐기성 세균에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. Metronidazole은 세균의 DNA 합성을 억제하는 항생제로 세균 내로 들어가기 전에 활성을 갖는 환원 형(reduced form)으로 전환되어야 하기 때문에, 혐기성 세균에 대한 효과가 높은 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. Metronidazole도 β-lactamase을 생산하는 균주에도 효과가 있기 때문에 구강 내 감염성질환의 치료에 페니실린 계 약물과 복합 처방되어 사용되기도 한다<sup>18)</sup>. 본 연구 결과에서도 페니실린 계 3가지 항생제에 내성을 보였던 균주들도 Cefuroxime axetil과 metronidazole에는 감수성을 보였다. 하지만, Cefuroxime axetil과 metronidazole에는 감수성을 보였다. 하지만, Cefuroxime axetil과 metronidazole은 penicillin G, amoxicillin 및 tetracycline 등의 제제보다는 고가라는 단점이 있다.

Ciprofloxacin은 fluoroquinolone 계에 속하며, 세균의 DNA 복제과정을 억제하여 항 균력을 보이고, 골조직과 연조직의 methicillin 저항성 포도상구균에 특히 효과적인 것

으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 하지만, 혐기성세균이나 연쇄상구균에 대한 항균력이 미약하기 때문에 구강 내 감염의 치료나 예방적 투여로는 사용되지 않는다고 한다<sup>8)</sup>. 본 연구결과에서도 대부분의 *F. nucleatum*은 ciprofloxacin에 대해서 내성을 보였다. 치주질환의원인균이 대부분이 혐기성 세균임을 감안한다면, 치주과 영역에서는 ciprofloxacin은 사용되어서는 안 될 것으로 생각된다. 이상의 연구결과는 한국인의 치주질환 치료 시 *F. nucleatum*을 표적으로 항생제를 선택할 때, penicillin G 또는 amoxicillin이 첫 번째로선택될 수 있는 항생제라는 것을 시사한다.

#### V. 결론

본 연구는 20명의 한국인 치은염환자 20명의 병소에서 분리 동정된 *F. nucleatum*의 7종 항생제[penicillin G, amoxicillin, Augmentin<sup>®</sup>(amoxicillin + clavulanic acid, 5:1), tetracycline, cefuroxime axetil 및 metronidazole]에 대한 감수성을 알아보기 위하여 최소성장억제농도를 액체배지 미세희석법으로 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

- 1. 본 연구에 사용된 모든 *F. nucleatum* 균주들이 tetracycline, cefuroxime axetil 및 metronidazole에 대하여 감수성을 보였다
- 2. Penicillin G, amoxicillin 및 Augmentin<sup>®</sup> 등의 페니실린 계에 대해서는 2명 환자에서 각각 분리 동정된 ChDC F302와 ChDC F306 균주를 제외하고는 모두 내성을 보였다
- 3. Ciprofloxacin에 대하여 ChDC F206과 ChDC F286 두 균주를 제외하고는 모든 균주들이 내성을 보였다.

이상의 연구결과는 한국인의 치주질환 치료 시 *F. nucleatum*을 표적으로 항생제를 선택할 때, penicillin G 또는 amoxicillin이 첫 번째로 선택될 수 있는 항생제라는 것을 시사한다.

#### 참고문헌

- 1. 최재흥, Fusobacterium nucleatum의 테트라사이클린 내성여부를 검사하기 위한 세 균배양법과 중합효소연쇄반응법의 비교. 조선대학교 대학원 석사학위논문. 2003.
- 2. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. J Periodontol. 1997, 68(10):973-81.
- 3. Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. J Clin Periodontol. 1997, 24(11):830–5.
- 4. Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. Beta-lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. Antimicrob Agents Chemother. 1990, 34(8):1546-50.
- 5. Belaaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Nevot P, Krishnamoorthy R, Paul G. 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. 1994, 120(1-2):75-80.
- 6. Blazquez J, Baquero MR, Canton R, Alos I, Baquero F. Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1993, 37(10):2059-63.
- Christersson LA, Wikesjo UM, Albini B, Zambon JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. J Periodontol. 1987, 58(8):540–5.
- 8. Cohen MA, Embil JM, Canosa T. Osteomyelitis of the maxilla caused by

## CHOSUN UNIVERSITY 1946 methicillin-res

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Oral Maxillofac Surg. 2003, 61(3):387-90.
- 9. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. Microbiology. 2002, 148(Pt 2):467-72.
- 10. Edwards DI. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. J Antimicrob Chemother. 1993, 31(1):9-20.
- 11. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. J Clin Periodontol. 1999, 26(3):143–52.
- 12. Griffiths GK, VandenBurg MJ, Wight LJ, Gudgeon AC, Kelsey M. Efficacy and tolerability of cefuroxime axetil in patients with upper respiratory tract infections. Curr Med Res Opin. 1987, 10(8):555–61.
- 13. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994, 5:78–111.
- 14. Haffajee AD, Uzel NG, Arguello EI, Torresyap G, Guerrero DM, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis. J Clin Periodontol. 2004, 31(10):869-77.
- 15. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington A: Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, In: Murray ER, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (Eds.), Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 7th Ed. ASM press. Washington, pp1526–1543, 1999.
- 16. Kim M-K, Kim H-S, Kim B-O, Yoo SY, Seong J-H, Kim D-K, Lee S-., Choe S-J, Park J-C, Min B-M, Jeong M-J, Kim DK, Shin YK, Kook J-K Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rDNA primers for simultaneous detection of Fusobacterium nucleatum and Actinobacillus

## CHOSUN UNIVERSITY 1946 actinomycetem

- actinomycetemcomitans. J. Microbiol. Biotechnol. 2004, 14(1):110-115.
- 17. Kolokotronis A. Beta-lactamases producing anaerobic bacteria in dentoalveolar abscesses. J Oral Sci. 1999, 41(4):187-90.
- Lewis MA, Parkhurst CL, Douglas CW, Martin MV, Absi EG, Bishop PA, Jones SA. Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. J Antimicrob Chemother. 1995, 35(6):785-91.
- 19. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomyetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. J Periodontol. 2000, 71(1):14–21.
- 20. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect Immun. 1985, 48(2):507–19.
- 21. Muller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of Actinobacillus actinomycetemcomitans from the oral cavity in adult periodontitis. J Periodontal Res. 1998, 33(1):49–58.
- 22. Murray PR, Jorgensen JH: Quantitative susceptibility test methods in major united states medical center. Antimicrob Agents Chemother 1981, 20(1):66-70,
- 23. Nyfors S, Kononen E, Syrjanen R, Komulainen E, Jousimies-Somer H. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. J Antimicrob Chemother. 2003, 51(1):107–12.
- 24. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001, 183(12):3770-83.
- 25. Piercy EA, Barbaro D, Luby JP, Mackowiak PA. Ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Antimicrob Agents

## CHOSUN UNIVERSITY 1946 Chemother. 1989, 33(1):128-30.

- 26. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. J Clin Periodontol. 2001, 28(6):499–507.
- 27. Roberts GL. Fusobacterial infections: an underestimated threat. Br J Biomed Sci. 2000, 57(2):156-62.
- 28. Sixou JL, Magaud C, Jolivet-Gougeon A, Cormier M, Bonnaure-Mallet M. Microbiology of mandibular third molar pericoronitis: incidence of beta-lactamase-producing bacteria. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003, 95(6):655-9.
- 29. Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontal 2000. 2002, 28:106–76.
- 30. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002, 28:12–55.
- 31. Tew JG, Thomas SS, Ranney RR. Fusobacterium nucleatum-mediated immunomodulation of the in vitro secondary antibody response to tetanus toxoid and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res. 1987, 22(6):506–12.
- 32. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. J Clin Periodontol. 2005, 32(8):893-8.
- 33. Wang X, Minasov G, Shoichet BK. The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. J Biol Chem. 2002, 277(35):32149-56.