

2009년 2월
박사학위논문

2009년
2월

박사학위논문

비치성 악안면 감염 병소에서 16S rDNA를 이용한 세균의 동정 및 항생제 감수성 검사

김용민

비치성 악안면 감염 병소에서 16S rDNA를 이용한 세균의 동정 및 항생제 감수성 검사

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 용 민

비치성 악안면 감염 병소에서 16S
rDNA를 이용한 세균의 동정 및
항생제 감수성 검사

Identification of Bacterial Species by 16S rDNA
Sequencing and Determination of Antibiotic
Susceptibility of Bacteria from Non-odontogenic
Infectious Lesions

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 용 민

비치성 악안면 감염 병소에서 16S
rDNA를 이용한 세균의 동정 및
항생제 감수성 검사

지도교수 김 학 균

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 용 민

김용민의 박사학위논문을 인준함

위원장	충남대학교	교수	김 은 석	인
위 원	조선대학교	교수	국 중 기	인
위 원	조선대학교	교수	방 일 수	인
위 원	조선대학교	교수	김 수 관	인
위 원	조선대학교	교수	김 학 균	인

2008년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iii
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	4
III. 연구 결과	9
IV. 총괄 및 고찰	12
V. 결 론	17
VI. 참 고 문 헌	18

표 목 차

Table 1. Interpretive standards for dilution susceptibility testing	8
Table 2. Bacteria isolated from the patients	10
Table 3. Minimum inhibitory concentration of several antibiotics for species isolated from patients	11

ABSTRACT

Antibiotic susceptibility and bacterial identification by 16S rDNA sequence comparison analysis from non-odontogenic infectious lesions

Kim, Yong Min., D.D.S

Advisor : Prof. Kim, Hak-Kyun. D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Purpose: The purpose of this study was to isolate and identify bacteria from the four patients with non-odontogenic infectious lesions (mucormycosis, chronic inflammation from wound infection and two actinomycosis), and determine their antimicrobial susceptibility against eight antibiotics.

Materials and methods: Bacterial culture was performed under three culture conditions (anaerobic, CO₂, and aerobic incubator). And the identification of bacteria was performed by 16S rRNA gene (16S rDNA) sequence comparison analysis method. For the sensitivity of the bacteria against eight antibiotics; penicillin G, amoxicillin, tetracycline, cefuroxime, erythromycin, clindamycin, vancomycin and Augmentin[®] (amoxicillin + clavulanic acid), minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated using broth microdilution assay.

Result: Nosocomial pathogens such as *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, and *Neisseria flavescens* were isolated from mucormycosis. *Veillonella parvula*, *Enterobacter hormaechei*, and *Acinetobacter calcoaceticus*, which are also nosocomial pathogens, were

isolated from chronic inflammatory lesion. *Actinomyces massiliensis* was isolated from actinomycosis in parotid gland. *Capnocytophaga ochracea* was isolated from actinomycosis in buccal region in anaerobic condition. There was no susceptible antibiotic to all bacteria in mucormycosis. Tetracycline was susceptible to all bacteria in chronic inflammation. *C. ochracea* was resistant to vancomycin, and penicillin G and other antibiotics showed susceptibility to all bacteria in actinomycosis.

Conclusion: The results indicated that the combined treatment of two or more antibiotics is better than single antibiotic treatment in mucormycosis, and penicillin is the first recommended antibiotic to treat actinomycosis.

key word: mucormycosis, actinomycosis, 16S rDNA

I. 서 론

구강 내에 존재하는 세균은 약 500종으로 알려져 있다¹⁾. 구강악안면 영역의 감염성 질환에는 발병 부위나 원인에 따라 치성 또는 비치성 농양, 악골 골수염, 상악동염, 방선균증, 타액선염 등 여러 가지가 있으며, 이에 관여하는 세균들도 매우 다양하게 알려져 있다. 대부분의 감염성 질환은 정확한 진단, 원인 요소의 제거, 절개 및 배농술과 항생제 요법으로 치료하게 된다²⁻⁸⁾. 하지만 심한 감염의 경우엔 주변으로 과급되어 골수염, 봉와직염, 근막간극 농양, 림프절염 등을 유발할 수 있으며, 더 악화되면 기도폐쇄, 패혈증, 종격동염, 해면정맥동혈전증 등의 합병증으로 생명에 위협을 초래할 수도 있다²⁻⁴⁾.

모균증은 진균 감염의 일종으로서 당뇨병, 백혈병, 림프종, 후천성면역결핍증, 항암치료, 심한 화상, 영양결핍, 요독증 등의 환자에서 드물게 발생하는 질환이며 이중 70%는 조절되지 않는 당뇨병 환자에서 발생하고, 4%에서는 전신질환의 동반 없이 발생하기도 한다⁹⁻¹¹⁾. 모균증은 모균(Mucorales)목(目)에 속하는 진균들에 의해 유발되는데, 이들 진균들은 넓은 범위로 *Phycomycetes* 아강(亞綱), 그리고 *Zygomycetes* 강(綱)에 속하기 때문에 동의어로서 phycomycosis 혹은 zygomycosis란 용어도 흔히 사용된다. 모균증 환자에서 가장 흔하게 발견되는 균은 *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*로서 이들은 자연환경 어디에나 존재하는데 특히 토양이나 부패한 식물 등에 존재한다. 이 균들은 빠르게 자라며 대기 중으로 끊임없이 포자를 방출한다. 이들 균 자체는 평소엔 무독성이지만, 면역기능에 장애가 있는 환자들이 균의 포자를 흡입하게 되면 모균증이 발생하게 된다.¹²⁻¹⁴⁾ 모균증은 높은 치사율을 보이는 급성 감염으로 craniofacial, pulmonary, cutaneous, gastrointestinal의 유형이 두부 또는 두부-코-안와의 모균증이 두경부에서 가장 흔한 유형이다.

방선균증은 외상이나 염증 등으로 정상 점막 손상 시 주위 조직 침습으로 생기는 질환으로 종물이나 농양을 형성하고 누공에 의해 피부로 배농되는 때

우 드문 만성 감염성 질환으로, 조직 병리학적으로 현미경 하에 특징적인 유황과립 (sulfur granule)이 관찰되는 질환이다¹⁵⁾. 방선균증의 원인균인 *Actinomyces* 종들은 구강 내 정상 세균총을 이루고 있으며, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. turicensis*, *A. radingae* 및 *A. neuii* 등이 사람에게 있어서 기회 감염성 병원체로 잘 알려져 있다¹⁶⁾.

방선균증은 흉부형, 복부형, 두경부형이 있는데, 두경부형은 정상적인 점막 barrier의 파괴가 일어나거나 구강내의 발치, 충치 등의 손상에 의해 산화환원력이 감소되어 혐기성 상태가 조성됨으로써 균주가 증식하여 발병하며, 근막에 관계없이 확산되어 누선이나 타액선을 침범하여 부비동내 감염이 안와까지 번질 수 있고 상악골 감염 시 상부로 연장되어 두개골 감염, 뇌막염, 또는 뇌농양을 일으킬 수 있다^{17,18)}. 두경부에서 호발부위는 이하선부 혹은 감염된 치아 또는 발치 후 남은 발치와 부위의 악하부에 빈발하며¹⁹⁾ 환자의 병력상 치통 또는 치과적인 질환을 청취할 수 있다.

방선균증의 발병은 잠행성으로 일차적인 경안부 방선균증이 연조직, 상악동, 골에 파급되어 이차 감염으로 진행되는데, 초기 임상소견으로 전신적 반응은 경미하여 미열, 권태, 쇠약 등을 보이나, 병변의 파급이 지속되면서 체중감소, 빈혈, 다발성 농양 및 배농로 형성과 황백색의 과립을 포함하는 농을 분비하며 이화학적 검사 소견에서 백혈구와 적혈구 증가증을 보이기도 한다^{20,21)}. 육안적으로 종창은 단단한 경결을 이루며, 주위조직과의 경계가 불분명하고 피부는 암갈색을 띄고 섬유화 조직이 이들 사이에 산재하고 있다^{22,23)}.

구강악안면 영역에서 외상 및 감염으로 인하여 일차적인 원인요소의 치유에도 불구하고 이차적 감염이 흔히 발생한다. 구강악안면 영역의 감염질환에서 정확한 항생제의 사용은 무엇보다 중요하지만 현재 여러 항생제에 내성을 지닌 균주들이 증가하고 있다²⁴⁾.

비치성 감염 병소에 존재하는 세균의 동정은 현재 생화학적 방법, 즉 세균 종이 갖는 특정 효소활성의 존재 유무를 데이터베이스화하여 동정하는 방법

이 사용되고 있다. 분류학적 측면에서 세균종의 동정은 DNA-DNA hybridization법 및 16S rRNA 유전자 (16S rDNA) 핵산서열 비교법을 기본으로 하여, 지방산 성분 분석, 생화학적 검사, G+C 함량 등의 기타 방법을 종합적으로 비교 분석하여 이루어진다. 그러나 이러한 모든 방법을 이용하여 병원에서 세균을 동정할 경우 경제적, 시간적, 노동력 등의 제한으로 인해 불가능하다. 그러므로 여러 세균종의 동정에 있어서 가장 합리적인 방법인 16S rDNA 핵산서열 비교분석법을 이용하는 것이 현실적인 최상의 방법이다. 왜냐하면, 16S rDNA는 계통분류학적으로 잘 보존되어있고, 핵산의 크기가 비교적 작아서 핵산서열을 결정하기 쉬울 뿐 아니라, GenBank라는 거대한 데이터베이스가 전 세계 과학자들에게 제공되고 있어 세균을 쉽게 종 수준으로 동정할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구의 목적은 구강악안면영역에서 발생한 모균증, 술 후 감염에 의한 만성염증, 방선균증 환자의 병소에서 세균을 배양하여 16S rDNA 핵산염기서열 결정법을 이용하여 동정하고, 여덟 가지 항생제에 대한 감수성 검사를 시행하여, 항 후 올바른 항생제 처방을 위한 기초 자료를 마련하는데 있다.

II. 실험재료 및 방법

II-1. 연구 대상

조선대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원하였던 4명의 환자로부터 채취한 병 소의 샘플을 연구 대상으로 하였다.

첫 번째 환자는 76세 남자 환자로 전신질환으로 당뇨가 있었으며 3개월 전 발치한 부위의 통증과 출혈이 있어 조직검사를 위해 내원하였고, 조직 검사에 의해 모균증 (mucormycosis)으로 진단되었다. 처음 내원하여 수술까지 약 1달간 Augmentin[®] (amoxicillin + clavulanic acid)을 투여하였고, 전체 하악골에 걸쳐서 심한 골 파괴가 관찰되어 전체 하악골 절제술을 시행하였으며 수술 중 농을 채취하여 배양하였다. 환자는 수술 10일 후 패혈증으로 사망하였다.

두 번째 환자는 73세 남자 환자로 좌측 악하부의 부종과 경결감이 있었고 촉진 시 통증이 있어 조직 검사를 시행하였으며, salivary duct carcinoma로 진단되었다. 종양 절제술과 경부 청소술을 시행하고, 방사선 치료를 시행하였다. 수술 후 약 3개월간 Augmentin[®]을 투여하였고, 수술 8개월 후 안면부 누공이 형성되고 농 배출이 관찰되어 조직 검사와 동시에 농을 채취하여 배양하였다. 조직 검사 결과는 만성 염증이었다.

세 번째 환자는 52세 남자 환자로 안면부 종창을 주소로 내원하였다. 임상 검사 상 좌측 전이개부에 국소화된 부종과 촉진 시 통증이 관찰되었다. 2개월 간 Augmentin[®]이 투여 되었으며, 그 후 농 흡인을 통한 농 배양 및 조직 검사를 시행하였다. 조직 검사 상 방선균증 (actinomycosis)으로 진단되었다.

네 번째 환자는 31세 여자 환자로 좌측 협부의 구강 외 누공 형성과 부종으로 내원하였으며, 구강 내에 특기할 만한 감염 원인은 발견되지 않았다. 농을 흡인하여 배양하였으며, 내원 당일부터 Augmentin[®]이 투여 되었다. 조직 검사 상 좌측 협부의 방선균증으로 진단되었다.

II-2. 병소 부위에서의 샘플 채취 및 세균 배양

각각의 병소에서 농을 채취한 다음, 이를 10 ml 1x PBS에 담아 조선대학교 치과대학 구강생화학교실 세균 실험실로 옮겼다. 샘플을 1x PBS로 100배 희석한 다음, 5% sheep blood (KOMED CO., LTD, Seoul, Korea)가 첨가된 BHI (Difco Laboratory, Detroit, USA) 한천 배지에 도말한 후, 37°C 온도 조건에서 1) 공기 중, 2) 10% CO₂가 첨가된 상태, 3) 혐기성 상태(5% CO₂, 85% N₂, 10% H₂)의 세 가지 환경에서 2-3일 동안 배양하였다. 한천배지에 균락을 형성한 세균을 백금이를 이용하여 5 ml BHI 액체배지에 접종하여 하루 동안 배양한 다음, 4 ml는 20% glycerol 상태에서 -70°C에 얼려서 보관하고 나머지 1 ml는 세균 지놈 DNA의 추출에 사용하였다.

II-3. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1ml를 10,000x g의 원심력을 이용하여 세균을 수확하고, 이를 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출 하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 50 µl의 pre-incubation solution 과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 µl binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 교반(vortexing)하였다. 이러한 cell lysate를 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 µl의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 옮기고 100 µl의 elution buffer를 넣어 1분간 실온에 방치한 다음 12,000x g에서 1분간 원심분리하였다.

II-4. 중합효소연쇄반응을 이용한 16S rDNA 증폭

16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primer (27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492; 5'-TAG GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 *Accupomer*[®] Premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 그리고 PTC-200 (MJ Reserch INC., Watertown, MA, U.S.A) PCR machine을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 이 때 PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. 20 μ l의 PCR 혼합용액이 되도록, 20 pmoles 씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94°C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 μ l씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭여부를 확인하였다.

II-5. 증폭된 16S rDNA의 클로닝 및 플라스미드 추출

증폭된 16S rDNA를 pGEM-T easy vector (RNA Corp., Seoul, Korea)에 제조회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 균락을 5개 선택하여 이를 5 ml의 LB broth에서 배양한 다음, 통상의 alkaline lysis법²⁵⁾으로 *Accuprep*[™] Plasmid Extraction Kit (Bioneer Corp., Seoul, Korea) 를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균 배양액 1 ml를 30초간 원심분리(12,000x g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 μ l의 resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 μ l lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μ l의 neutralization buffer를 첨가하고 나서, 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 100분간 원심분리(12,000x g)하여 상층액을 binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리(12,000x g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄

을 700 μ l 넣은 후 1분간 원심분리(12,000x g)하였다.

II-6. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 T3 promoter, T7 promoter Seq-F1 (5'-CCT ACg ggA ggC AgC Ag-3'), Seq-F2(5'-ggA TTA, gAT ACC CTg g-3')를 이용하여 그 결과를 SeqMan 프로그램 (Version 5.00; DNAS-TAR, INC., Maidison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

위에서 결정된 핵산염기서열을 GenBank 등의 데이터베이스를 이용하여 상동성을 검색하였고, 그 결과 98%이상 상동성을 보이는 세균과 같은 종이라고 판정하였다.

II-7. 항생제 감수성 실험

본 연구에서는 penicillin G, amoxicillin, tetracycline, cefuroxime, erythromycin, clindamycin, vancomycin 및 Augmentin[®] 등 총 8개의 항생제를 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 여러 항생제에 대한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration; MIC)는 Murry와 Jorgensen²⁶⁾의 방법에 따라 액체 배지 희석법으로 측정하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 항생제의 농도가 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 μ g/ml 씩 되도록 조절된 0.1 ml의 액체배지에 600 nm의 파장에 대한 흡광도(A_{600})가 0.05로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml 씩 접종하고, 이를 각각의 세균에 최적의 성장 조건에서 48시간 배양한 후, enzyme-linked immuosorbent assay (ELISA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 결과 음성대조군인 세균을 넣지 않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 MIC 값으로 결정하였다. 이때 양성 대조군으로는 항생제를 넣지 않은 세균 배양

액으로 하였다. 항생제에 대한 각각의 세균 균주들의 민감도는 다음을 기준으로 결정하였다 (Table 1).

Table 1. Interpretive standards for dilution susceptibility test²⁶⁾

Antibiotics	MIC($\mu\text{g/ml}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin G	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Amoxicillin	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
Cefuroxime	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycin	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Clindamycin	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Vancomycin	≤ 8		≥ 16
Augmentin [®]	< 2	2	4

III. 연구결과

III-1. 병소 샘플에서 세균 배양 결과

첫 번째 환자의 모균증 병소와 두 번째 환자의 병소에서는 각각 5개 및 4개 세균종 (각각 11개 및 5개 균주)에 해당하는 균주들이 배양되었다 (Table 2). 반면에 세 번째와 네 번째 방선균증 환자의 병소에는 각각 1 균주 (1개의 균종) 만이 배양되었다 (Table 2). 이들 균주들 중 *Veillonella parvula*(ChDC OSN23)와 *Capnocytophaga ochracea*(ChDC OSN10)은 혐기성 조건에서만 자라는 균종들이고, *Acinetobacter calcoaceticus*(ChDC OSN25)은 산소가 존재하는 조건에서만 자라는 균종이다. 그 외 나머지 균종들은 통성혐기성 세균종들이었다. 세 번째 환자의 방선균증 병소에서 분리 배양된 균주의 16S rDNA 핵산염기서열을 GenBank의 데이터베이스를 이용한 상동성 검색 결과, 가장 최근에 신균 종으로 밝혀진 *Actinomyces massiliensis*의 16S rDNA 염기서열과 97% 상동성이 있었지만, 새로운 균종일 가능성도 있다.

III-2. 항생제 감수성 검사 결과

첫 번째 모균증 환자의 병소 부위에서 분리 배양된 모든 세균들에 대해 감수성을 보이는 항생제는 없었다 (Table 3). 그람 양성균인 *E. faecalis*, *S. gordonii*, 및 *B. subtilis* 중에 속하는 균주들은 모두 vancomycin과 Augmentin[®]에 감수성을 보였다 (Table 3). *K. pneumoniae*(ChDC KB94) 균주는 Cefuroxime, tetracycline에만 중간 정도의 감수성을 보였고, 나머지 항생제에 대해서는 내성을 보였다.

두 번째 환자의 염증 병소로부터 분리 배양된 *E. hormaechei*(ChDC KB105) 균주는 amoxicillin에서는 중간 정도의 감수성을 나타내었으며, 나머지 항생제에서는 모두 감수성을 나타내었다 (Table 3). *V. parvula*(ChDC

KB105) 균주는 tetracycline과 clindamycin에서만 감수성을 나타내었으며, 나머지는 tetracycline에서만 감수성을 나타내고 나머지 항생제에 대해서는 내성을 보였다.

세 번째 및 네 번째 환자의 방선균증 병소로부터 분리 배양된 *A. massiliensis*(ChDC KB103)는 amoxicillin에서만 중간 정도의 감수성을 나타내었고 나머지 항생제는 모두 감수성을 보였으며, *C. ochracea*(ChDC OSN10)균주는 penicillin G, vancomycin에는 저항성을 보였고 amoxicillin에서는 중간 정도의 감수성을 나타내었으며, 나머지 항생제에는 감수성을 나타내었다 (Table 3).

Table 2. Bacteria isolated from the patients

No. of patients	Species	Strains
1 Mucomycosis	<i>Enterococcus faecalis</i>	ChDC KB92, ChDC KB99
	<i>Streptococcus gordonii</i>	ChDC KB93, ChDC KB100
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ChDC KB94, ChDC KB95, ChDC KB101
	<i>Bacillus subtilis</i>	ChDC KB96, ChDC KB97, ChDC KB98
	<i>Neisseria flavescens</i>	ChDC KB102
2 Chronic inflammation	<i>Streptococcus anginosus</i>	ChDC KB104, ChDC KB105,
	<i>Veillonella parvula</i>	ChDC OSN23
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ChDC OSN24
3 Actinomycosis	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ChDC OSN25
	<i>Actinomyces massiliensis</i>	ChDC KB103
4 Actinomycosis	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	ChDC OSN10

Table 3. Minimum inhibitory concentration of several antibiotics for species isolated from patients

strains	Antibiotics							
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)							
	PEN	AMX	TET	CMX	ERY	CLI	VAN	AUG
ChDC KB92	2	1	>64	>64	>64	>64	4	0.5
ChDC KB93	0.063	<0.125	>64	<0.5	>64	>64	1	0.032
ChDC KB94	>64	>64	8	8	>64	>64	>64	8
ChDC KB95	>8	>16	2	16	>16	>8	>64	4
ChDC KB96	1	0.5	<0.5	32	<0.5	2	0.5	0.125
ChDC KB97	16	8	<0.5	32	<0.5	4	<0.5	0.25
ChDC KB98	1	0.5	<0.5	32	<0.5	2	1	0.25
ChDC KB99	4	0.5	64	32	>16	>8	2	1
ChDC KB100	0.25	<0.125	32	<0.5	<0.125	<0.063	<0.5	0.25
ChDC KB101	>8	>16	4	4	>16	>8	>64	4
ChDC KB102	1	1	<0.5	4	8	16	>64	0.25
ChDC KB103	<0.063	<0.125	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.032
ChDC KB104	0.125	<0.125	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.125
ChDC KB105	<0.063	<0.125	0.5	<0.5	<0.125	<0.063	1	0.125
ChDC OSN10	8	<0.125	<0.5	1	<0.5	<0.5	16	0.125
ChDC OSN23	>8	<0.125	<0.5	16	16	<0.063	64	2
ChDC OSN24	>8	>16	2	32	>16	>8	>64	>64
ChDC OSN25	>8	16	1	64	16	>8	>64	16

PEN, Penicillin G; AMX, Amoxicillin; TET, Tetracycline; CMX, Cefuroxime; ERY, Erythromycin; CLI, Clindamycin; VAN, Vancomycin.

IV. 총괄 및 고찰

방선균증의 진단은 혐기성 배양 검사에서 방선균을 동정하면 확진할 수 있지만 부적절한 배양기술과 타 균주의 과다성장, 이전의 항생제 치료 등에 의해 균주의 동정이 50% 미만이므로, 병소 부위의 조직이나 화농성 물질의 병리조직학적 소견과 임상병력이 방선균증 진단에 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 본 연구에서도 이하선에 발생한 방선균증의 경우 두 달간의 항생제 투여에도 *A. massiliensis* 균주가 분리되었고, 협부에 발생한 방선균증의 경우에는 항생제 투여 전에 세균을 배양하였지만 *Actinomyces* 속에 속하는 균종은 검출되지 않았고, 2차 감염으로 인한 *C. ochracea*가 검출되었다. 이는 방선균증 병소에서 *Actinomyces* 속이외의 균종들이 발견된다는 보고²⁸⁾에 미루어보아 특이한 결과는 아닌 것으로 생각된다.

방선균증의 치료는 조직괴사와 농양주변의 반흔 조직의 형성으로 혈관공급이 감소되어 병변에 항생제 도달이 어렵기 때문에 장기간의 항생제 요법과 더불어 병소부위의 괴사조직 및 화농성 물질을 포함한 염증성 물질을 제거해야 하고, 주변조직의 철저한 변연 절제술이 병행되어야 한다²⁹⁾. 본 연구에서도 이하선에 발생한 방선균증의 경우 이하선 부위의 철저한 debriment를 시행하고 8주간 Augmentin[®]을 투여하여 완치되었으며, 협부에 발생한 경우에는 8주간의 항생제 복용만으로 증상이 개선되었다.

방선균증의 치료에 사용되는 항생제는 주로 penicillin이 선택약제이며, 이외에도 erythromycin, cephalosporin, tetracycline, clindamycin, streptomycin, lincomycin이 추천되나 amphotericin B, nystatin, griseofulvin 등의 항진균제는 효과적이지 못하다는 이전의 연구 결과를 참고할 때 방선균증은 세균 감염에 의한 것임을 시사한다³⁰⁾. 또한 문헌에서 추천하는 항생제들은 기존에 개발된 대부분의 항생제들임을 감안할 때 방선균증은 다양한 세균종에 의해 발생할 수 있으며, 이들 세균들이 여러 가지 항생제에 동시에 내성을 보일 수

있다는 것을 시사한다.

이차 감염은 고령의 환자, 당뇨병 기왕력이 있는 환자, 스테로이드약제로 치료 받고 있는 환자, 심한 비만증 환자, 영양실조 상태에 있는 환자 등에서 더욱 잘 일어나는 것으로 알려져 있으며, 그 밖에 치근 감염 상태에 있던 환자도 창상 감염이 잘 일어나는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 본 연구의 두 번째 증례인 salivary duct carcinoma 수술 8개월 후에 창상 감염에 의한 만성 염증 병소에서 검출된 *V. parvula*, *E. hormaechei*, *A. calcoaceticus* 균종들은 대표적인 원내감염 (nosocomial infection)의 원인균종들이었다³²⁻³⁴⁾. 그러므로, 이 환자의 경우도 이들 세 가지 균종들에 의한 이차 감염이 발생하였을 것으로 생각되며 특히, 환자가 고령인 점을 보아 전신적인 면역기능 저하로 이차 감염 발생에 영향을 미쳤으리라 생각된다. 이 환자에서 검출된 *E. hormaechei*, *A. calcoaceticus* 경우 tetracycline에서만 감수성을 나타내었으며 나머지 7개의 항생제는 모두 저항성을 나타내었다.

모균증 환자에서 가장 흔하게 발견되는 진균은 *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* 속의 종들이 주로 발견된다고 보고되었다. 이러한 이유로 진균의 존재 유무를 알아보기 위해 진균의 18S rDNA를 중합효소연쇄반응법으로 증폭을 시도해보았지만 18S rDNA 증폭물을 얻을 수 없었다. 이러한 이유는 잘 알 수 없지만, 본 병소에 존재하는 진균의 DNA를 추출하는 과정의 오류에 의한 것일 수도 있다. 본 연구에서 조사한 모균증 병소에서는 기회감염성 병원체로 알려진 *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, 및 *N. flavescens* 등이 검출되었다. 이는 모균증 병소에 이들 세균종들에 의한 이차 감염에 의한 것으로 생각된다.

모균증은 진균 감염이므로 항생제는 주요 치료제가 아니며, amphotericin B가 가장 믿을만한 치료제이다. 실험용량 (test dose)에서 과민증이 나타나지 않는다면 하루용량 0.7-1.0 mg/kg/day에 도달할 때까지 점차적으로 증량한다. 허용할 수 있는 최대용량을 진행이 멈출 때까지 투여한다. 약제는 총 10-12주간 계속 사용 한다³⁵⁾. 본 환자는 외과적 처치와 더불어 amphotericin

B를 고농도로 투여했음에도 불구하고 술후 10일 폐혈증으로 사망하였는데, 본 연구에서 분리된 모든 세균종에 감수성을 갖는 항생제가 없는 것으로 미루어보아, 이들 세균들의 이차 감염에 의한 폐혈증도 환자의 사망 원인이었을 수도 있다고 생각된다.

항생제의 선택에 있어 Sandor²⁾은 β -lactam 계통의 항생제 특히 penicillin은 병원균에 대하여 효과적이고 부작용이 적으며 비용이 저렴하여 일차 항생제로 사용할 것을 추천하였으나, 구강악안면의 감염질환을 일으키는 병원균 중 특히 streptococci와 구강내 혐기성 세균에 대한 penicillin의 내성이 증가하고 있다³⁶⁾. 본 연구 결과에서도 모균증의 경우 11개 중 한 개의 균주만이 penicillin G에 감수성을 나타내었으며 나머지는 중간정도 감수성 혹은 저항성을 나타내었다. 하지만 Augmentin[®]의 경우 세 개의 균만이 저항성을 나타내었으며 나머지 여덟 개의 균은 감수성을 나타내었다. 또한 이차 감염환자에서 한개의 균이 penicillin G에 저항성 또 다른 한 개는 감수성을 나타내었으며 나머지는 저항성을 나타내었고, amoxicillin의 경우 세 개의 균이 중간정도의 감수성을 보였으며 두 개의 균은 저항성을 나타내었다. Augmentin[®]의 경우 두 개의 균은 감수성을 나타내었으며 나머지는 저항성을 나타내었다. 또한 방선균증 환자의 경우 Augmentin[®]은 모두 감수성을 나타내었다.

Tetracycline은 현재 구강악안면 감염질환에 거의 사용되고 있지 않는다. 본 연구에는 모균증 환자에서 분리된 4개의 균에서 저항성을 나타내었고, 1개의 균주에서 중증도의 감수성을 나타내었다. 나머지 4개의 균주에서 감수성을 나타내었으며, 이차 감염 환자와 2명의 방선균증 환자에서 모두 감수성을 나타내었다. 이는 역시 현재 구강 내 감염질환에 거의 사용되어지지 않고 있기 때문에 이 항생제에 대한 내성을 갖는 균주가 많이 감소하였을 것으로 사료 되며 이에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

Cefuroxime은 세포벽의 합성을 억제하는 세파로스포린계 항생제로 β -lactam 구조를 갖는 페니실린계 항생제에 내성을 보이는 세균에 항균작용을 가지고 있다³⁷⁾. 본 연구에서는 모균증의 환자의 경우 페니실린 계 항생제에

중증도의 감수성을 보이는 두 개의 균주 *Streptococcus gordonii*와 *Neisseria flavescens*에서 감수성을 나타내었으며 저항성을 나타내는 한 개의 균주 *Klebsiella pneumoniae*에서 중증도의 감수성을 나타내었다. 이차감염 환자에서는 두 개의 균에서 저항성을 한 개의 균에서 중간정도의 감수성을 나타내었으며 나머지는 감수성을 나타내었고 방선균증 환자에서는 모두 감수성을 나타내었다.

Erythromycin은 주로 그람 양성균에 효과가 있으며 penicillin과 tetracycline의 중간 항균범위를 갖고 있는 정균성 항생제로, 호기성 그람양성균에 의한 구강감염증에 매우 효과적일뿐 아니라 혐기성 세균감염에도 비교적 좋은 항균효과를 갖는다³⁸⁾. 그러나 erythromycin은 쉽게 내성균이 발견되고 항균효과가 penicillin보다 떨어지기 때문에 구강악안면 감염질환의 치료에 대한 일차 항생제라기보다는 penicillin 내성균에 의한 감염, 과민반응 등의 원인으로 penicillin을 사용할지 못할 때 이용되는 대체약물이라 할 수 있다. 본 연구에서도 모균증의 경우 11개 중 네 개에서 감수성을 나타내었으며 나머지 7개의 균에서는 저항성을 나타내어 penicillin계 항생제 보다 더 많은 저항성을 나타내었다.

Clindamycin은 골조직에 친화력이 높은 약제로서 그람 양성균 및 혐기성 세균에도 높은 감수성을 갖는다³⁹⁾. 또한 cephalosporin계 항생제는 penicillin과 유사한 화학구조를 갖고 있는 살균성, 광범위항생제로서 일반적으로 penicillinase에 의하여 파괴되지 않아 penicillinase에 대한 내성균에도 유효하다고 알려져 있다. 하지만 본 연구에서 모균증의 환자의 경우 *B. subtilis*의 경우 penicillin계 항생제와 같은 중증도의 감수성을 나타내었으며, *S. gordonii*의 경우 감수성을 나타내었으며 나머지 모든 세균에서 저항성을 나타내었다. 2차 감염환자와 방선균증 환자의 세균에서는 2개의 균주에서는 저항성, 나머지 2개의 균주에서는 감수성을 나타내었다.

Vancomycin은 폴리펩타이드계 항생제로 세균 세포벽의 합성을 억제하여 항균작용을 갖고 그람 양성 세균에 특이적으로 강력한 항균력을 갖고 있다⁴⁰⁾.

본 연구에서는 모균증의 경우 *K. pneumoniae*, *Ne. flavescens*를 제외하고 모두 항생제에 감수성을 나타내었으며, salivary duct carcinoma환자에서는 *S. anginosus*의 경우 항생제에 감수성을 나타내었고 나머지는 저항성을 나타내었으며, 방선균증의 *C. ochracea*의 경우 저항성을 나타내었으며, 방선균증의 원인균인 *A. massiliensis*는 감수성을 나타내었다.

아직까지 우리나라 구강에서 발생하는 세균 감염성질환자의 세균학적 진단 및 항생제 내성 검사 기준이 마련되지 않아 경험적 항생제 처방이 주로 이루어지고 있다. 그러므로 본 연구 결과는 구강외과 영역에서 세균 감염성질환 병소에서의 세균 분리 및 동정, 그리고 항생제내성검사를 통한 적절한 항생제 처방을 위한 기초적인 자료로서 그 의의가 있다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 구강악안면영역에서 발생한 모균증, 만성 염증, 방선균증의 환자 병소에서 세균을 배양하여 16S rDNA 핵산염기서열 결정법을 이용하여 동정하고, 8종의 항생제에 대한 감수성 검사를 시행하여 항 후 올바른 항생제 처방을 위한 기초 자료를 마련하고자 시행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모균증 병소에는 진균은 중합효소연쇄반응법에 의한 18S rDNA는 검출되지 않았다. 하지만, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, 및 *N. flavescens* 등의 기회감염에 관여하는 세균종이 검출되었다. 이들 모든 세균들에 대한 감수성을 보이는 항생제는 없었다.
2. 두 명의 방선균증 병소에서는 각각 *A. massiliensis*와 *C. ochracea* 균종이 검출되었다. 이들은 모두 augmentin에서는 감수성을 나타내었고 amoxicillin에서는 중간 정도의 감수성을 나타내었으며 협부의 방선균증에서 vancomycin, penicillin G에 저항성을, 나머지 항생제에는 감수성을 나타내었다
3. Salivary duct carcinoma 술후 발생한 만성염증 병소에는 기회감염 병소에서 흔히 발견되는 *S. anginosus*, *V. parvula*, *E. hormaechei*, 및 *A. calcoaceticus* 균종들이 검출되었다. *E. hormaechei*(ChDC KB104) 균주는 penicillin G, amoxicillin에서는 중간 정도의 감수성을 나타내었으며, 나머지 항생제에서는 모두 감수성을 나타내었다.

이상의 연구결과를 종합하면 모균증의 경우 일반적인 항진균제의 투여와 동시에 반드시 항생제 감수성 검사를 시행하여 여러 항생제에 내성을 갖는 균이 존재할 경우 두 종류 이상의 항생제를 복합 처방하는 것이 효과적일 것으로 사료되며, 방선균증의 경우 전통적인 치료 방법대로 치료 초기에는 페니실린계열 항생제를 사용하고 항생제 감수성 검사를 시행하여 이에 맞는 항생제를 사용하는 것이 치료에 효과적일 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. 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):3770-3783.
2. Sandor GK, Low DE, Judd PL, Davidson RJ: Antimicrobial treatment option in the management of odontogenic infection. *J Can Dent Assoc* 1998;64:508-514.
3. Jerry L, Lionel M: Oral and maxillofacial surgery, Vol VII. WB Saunders, Philadelphia, 2000;77-117.
4. 김규식, 이동근: 구강악안면의 감염질환. 개정 2판. 군자출판사, 서울, 1992;131-212.
5. Baker KA, Fotos PG: The management of odontogenic infection. A rationale for appropriate chemotherapy. *Dent Clin North Am* 1994;38:689-706.
6. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K: Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000;90:600-608.
7. Sabiston CB, Grigsby WR, Segerstron N: Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. *Oral Surg* 1976;41:430-436.
8. Topazian RG, Goldberg MH: Management of infection of the oral and maxillofacial regions, ed 2. Philadelphia, WB Saunders, 1981:173-266.
9. Jones AC, Bentsen TW, Freedman PD : Mucormycosis of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75:455-460.
10. Salisbury PL, Caloss R Jr, Cruz JM, Powell BL, Cole R, Kohut RI et al: Mucormycosis of the mandible after dental extraction in a patient with acute myelogenous leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:340-344.

11. Nussbaum ES, Hall WA : Rhinocerebral mucormycosis: Changing patterns of disease. Surg Neurol 1994;41:152-156.
12. Armstrong D : Treatment of opportunistic fungal infections. Clin Infect Dis 1993;16:1-9.
13. Adam RD, Hunter G, DiTomasso J et al : Mucormycosis: emerging prominence of cutaneous infection. Clin Infect Dis 1994;19:67-76.
14. Parfrey NA: Improved diagnosis and prognosis of mucormycosis: a clinicopathologic study of 33 cases. Medicine 1986;65:113-123.
15. Bennhoff DF. Actinomycosis : Diagn-ostic and therapeutic consideration and a review of 32 cases. Laryngoscope. 1984;94:1198-1217.
16. Mello KA, Snyderman DR, Arora S : *Capnocytophaga* infection involving a portal-systemic vascular shunt, Digestive Diseases and Sciences. 1990;35:909-911.
17. Harrison TR: Principles of internal medicine. McGraw-hill Kogakusa, Ltd. Tokyo Eight edition 1977, 938-939.
18. Brown, J.R.: Human Actinomycosis. A study of 181 subject. Hum. Pathol. 4: 319, 1973.
19. Kay EB: Bronchopulmonary Actinomycosis. Ann Int Med 26:581, 1947.
20. Davis-Christopher: Textbook of Surgery, 125h 3d. 17:355, 1981.
21. Harvey JC, Caantrell JR, Fisher AM: Actinomycosis: Its recognition and treatment. And Int Med 46:868, 1957.
22. Robbins SL: Pathologic basis of diseases. 2nd edition. WB Saunders Company. Philadelphia 1979, p.455.
23. Putman HC, Dockery MB and Waugh JW: Abdominal catinomycosis. Surg Gynec and Obstet 146:412, 1978.
24. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M: antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherland and Spain. J Clin Periodontol 2005;32:893-898.
25. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular cloning: a laboratory

- origin. Scand J Infect Dis Suppl 1985;46:101-105.
37. Griffiths GK, VandenBurg MJ, Wight LJ, Gurdgeon AC, Kelsey M: Efficacy and tolerability of cefuroxime axetil in patients with respiratory tract infections. *Curr Med Res Opin* 1987;10:555-561.
 38. Wilson WR: Tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and clindamycin. *Mayo Clin Proc* 1977;52:635-640.
 39. Mehrhof AI: Clindamycin an evaluation of its role in dental patients. *J Oral Surg* 1976;34:811-817.
 40. Bascones Martinez A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, Blanco Carrion A, Gay-Escoda C, Gonzalez-Moles MA, et al: Consensus statement on antimicrobial treatment of odontogenic bacterial infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:369-376.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20077375	과 정	박사
성 명	한글 김 용 민 한문 金 用 敏 영문 Kim, Yong Min				
주 소	광주시 북구 동림동 1161-1 푸른마음 주공4단지 408-1503				
연락처	E-mail : blackpower77@hanmail.net				
논문제목	한글 : 비치성 악안면 감염 병소에서 16S rDNA를 이용한 세균의 동정 및 항생제 감수성 검사				
	영문 : Identification of Bacterial Species by 16S rDNA Sequencing and Determination of Antibiotic Susceptibility of Bacteria from Non-odontogenic Infectious Lesions				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2009년 2월

저작자: 김 용 민 (인)

조선대학교 총장 귀하