

감염근관에서 Black-Pigmented Bacteria의 동정에 대한 연구

권은경 · 김은숙 · 곽주석 · 이 황 · 이수종 · 임미경

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

DETECTION OF BLACK-PIGMENTED BACTERIA IN INFECTED ROOT CANALS

Eun-Kyoung Kwon, Eun-Sook Kim, Ju-Seog Kwak, Hwang Lee,
Su-Jong Lee, Mi-Kyung Im

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Black-pigmented bacteria have been implicated in the endodontic infections. This group of microorganisms includes *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*. The organisms display a wide variety of virulence factors that may be pertinent to acute endodontic infections.

The aim of this study was to identify *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *P. nigrescens* by using special potency disk test, filter paper spot test, 16S rRNA gene-directed PCR, and API 32A.

Microbial samples were collected from root canals of 33 intact teeth with necrotic pulp and/or apical periodontitis. Conventional laboratory methods were used for identification of the strains of black pigmented bacteria. Eighteen of 33 samples were positive for the growth of black-pigmented bacteria. Five colonies were cultured from each pure cultured colonies from Brucella agar plate. Seventy seven colonies were positive for the growth of black-pigmented bacteria.

Thirty three of 77(42.6%) were identified as *P. nigrescens*, 10 of 77(12.9%) were *P. gingivalis*, 6 of 77(7.8%) were *P. endodontalis*, 10 of 77(12.9%) were *P. intermedia*. On the contrary the reference strains of *P. nigrescens*, experimental strains of *P. nigrescens* was sensitive to kanamycin in special potency disk test.

16S rRNA gene PCR and API test after rapid presumptive identification methods, such as special potency disk test and filter paper spot test, would be accurate detection methods for black-pigmented bac-

I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 세균은 주요한 원인인자로서 대부분의 근관감염은 혼합감염이고 특히 혐기성세균이 주를 이룬다¹⁻³⁾. 이들 혐기성 세균중 black-pigmented bacteria는 치근단 질환의 주요 병인균으로 주목받고 있으며, 악취, 동통, 누공 형성과 지속적인 임상증상이 있는 경우나 만성 치근단 질환의 악화에 중요한 역할을 담당한다⁴⁻⁸⁾. 이전에 black-pigmented bacteria는 *Bacteroides* 속으로 분류되었다⁹⁾. Shah와 Collins는

*Bacteroides*를 세 가지 속으로 나누어, saccharolytic nonpigmenting species로 구성된 *Bacteroides*, asaccharolytic black-pigmenting species로 구성된 *Porphyromonas* 중 및 saccharolytic black-pigmented species와 nonpigmenting species로 구성된 *Prevotella*로 구분하였다^{9,10)}. *Porphyromonas*의 모든 종은 black-pigment를 생성하며 사람에서는 세 가지 종이 발견되는데 *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*이다^{5,9)}. *Porphyromonas* 중 구강에서 발견되는 균은 대부분

*P. gingivalis*이고, *P. asaccharolytica*는 구강 이외에서 관찰되며, *P. endodontalis*는 감염된 치근관에서 분리되었다⁹⁾. *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*는 각각 성인형 치주염과 근관 감염의 주요한 병인으로 제시되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾. *Prevotella* 중 black-pigment를 형성하는 균은 *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. melaninogenica*, *P. loeschei* 등이 있으며, 구강에서는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*가 자주 분리되는 세균이다¹⁵⁻¹⁷⁾.

*P. gingivalis*는 치은연하 치태에서 빈번하게 분리되고, collagenase, 트립신 유사 효소, keratinase, hemolysin, fimbriolysin, hyaluronidase, phospholipase, alkaline phosphatase, 및 acid phosphatase 등을 생산하며, 몇몇 종에서 순수 배양할 때 농양이나 전염성 감염의 유발을 보고하였다¹⁸⁾. *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*와 달리 근관감염과 관련된 심한 치성 농양에서 분리되고 절대 혐기성이어서 짧은 시간동안 공기에 노출이 되면 생존할 수 없고 트립신 유사 효소를 생산하지 않고 hemagglutination 활성을 나타내지 않으며 표현형이 *P. gingivalis*보다는 *P. asaccharolytica*와 비슷하다고 하였다¹⁸⁾. *Prevotella intermedia*는 치주질환과 연관되어 있고, 급성 증상이 있는 근관 감염에서도 많이 발견되는 균으로, 이전에는 *Bacteroides intermedius*로 명명되었다¹⁸⁾. 1992년 Shah 등에 의해 *P. nigrescens*가 *P. intermedia*로부터 따로 분리되어 분류되었다¹⁷⁾. Strain ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD) 33563은 *P. nigrescens*로 밝혀졌고, strain ATCC 25611은 *P. intermedia*로 남아있다^{15,16)}. *P. nigrescens*가 *P. intermedia*로부터 재분류된 후 근관 감염에서 *P. nigrescens*는 black-pigmented bacteria 중 발현율이 가장 높다^{19,20)}. 과사치수에서 분리한 black-pigmented bacteria의 발현율은 25에서 70%이다¹⁹⁻²⁵⁾. *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 근관감염의 급성증상과 밀접한 관련이 있었고, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 증상과 관계없이 관찰되었다^{22,23)}.

신속하고도 민감도가 높은 미생물 동정방법은 미생물학 연구나 실제 감염성 질환의 진단에 모두 필수적이다. 현재까지 근관 감염이나 치근단 병소의 병원성 미생물에 대한 연구는 주로 배양에 의해 세균을 검출하여왔지만, 혐기성 세균을 배양하는 것은 시간과 노력이 많이 소요되며 배양방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다. 역사적으로 혐기성 배양법으로 세균을 분류, 동정하였고, 대부분이 세균 배양에 의존되지만 이 방법은 통상적으로 환자진단에 이용하는 데는 많은 제약이 있다. 균의 동정법과 동정 해석은 표현

형에 의한 동정법과 유전자형에 의한 동정법이 있는데, 표현형에 의한 동정법은 생물형, 약제감수성의 형태, 혈청형, phage형, 전기영동이나 가스 크로마토 그래피로 분리하는 균체의 성분분석, multilocus enzyme electrophoresis 등이 있고, 유전자형에 의한 동정법은 plasmid profile analysis, 제한효소 처리에 의한 분석, ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis, PCR(polymerase chain reaction), AP-PCR(Arbitrary primer-polymerase chain reaction), Nucleotide sequence analysis 등이 있다²⁴⁾.

세균의 동정 방법중 유전자를 이용하는 방법으로 중합효소연쇄 반응법(polymerase chain reaction)이 가장 널리 쓰이고 있다. 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)이란 세균의 염색체를 가열하여 변성(denaturation)시킨 후 온도를 낮추어 염색체의 특정유전자 양끝에 primer를 결합시키고(annealing), 고온에서도 활성이 유지되는 DNA 중합효소가 세균의 염기서열을 형판으로 하여 양 primer의 3'에서부터 DNA를 합성(polymerization)하는 것이다. 이와 같은 cycle을 수십 차례 반복함으로써 primer가 붙는 표적유전자가 대량 증폭되어, 이것을 전기영동을 통하여 관찰할 수 있다. 결국 중합효소 연쇄 반응이란 primer를 이용하여 원하는 특정 유전자를 대량 증폭하는 기술이며, 이런 특성을 이용함으로써 여러 가지 세균 감염증의 진단을 신속히 그리고 정확히 할 수 있다. PCR의 단점은 매우 예민한 검사법이어서 극소량의 유전자가 오염되어도 위양성 반응이 나오게 되므로 오염을 막을 수 있는 숙련된 기술을 요한다^{24,27,28)}. 또한 PCR은 세균의 대한 DNA sequence 자료가 부족하여 모든 세균에 대해 적용할 수 없는 단점을 가지며 특정한 균에 대해서만 특이적인 primer를 제작하여 동정하고자 하는 세균의 DNA와 모든 의심되는 균의 primer를 반응시켜 증폭시키는 과정이 필요하다. 그러므로, PCR 검사 이전에 추정 동정하여 의심되는 균의 수를 줄이게 되면 필요한 primer만을 제작하여 PCR 검사를 하게 되어 보다 신속하고 효율적으로 동정할 수 있게 된다.

균 동정 방법에 사용되는 방법중 하나인 special potency disk 검사는 추정 동정법으로 유효한 항생물질을 선택하여 균종의 동정 및 그 치료에 사용될 수 있는 방법으로 편리한 방법이다^{24,29)}.

Filter paper spot 검사(α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase, trypsinlike enzyme)는 15분 이하로 빠르고, 경제적이며, 준비와 실험방법이 쉽다. 이 방법은 하나 혹은 두개의 분리된 세균 colony를 사용하여 효소 활성의 연관성으로 구분하는 추정동정 방법이다^{30,31)}.

균 동정 방법중 단시간 동정 kit는 대상 균종별로 되어 있으므로 사용하고자 하는 kit의 선택이 필요하다. 세균배양

후 생화학적으로 동정하는 방법으로 각종 생화학적 실험을 실시하여 그 결과로 각종 세균의 생화학적 성상이 기록된 동정표와 비교하여 최종 균명을 확인한다. 최근 신속하게 동정할수 있는 API kit 등의 rapid test kit system이 시판되고 있으며, kit system을 이용하면 신속하고 정확하게 균종의 동정이 가능하다. API 검사는 이미 형성한 효소의 검출에 기초한 빠른 동정 방법으로 발전되고 있다^{3,32}.

본 연구의 목적은 감염근관내에서 높은 발현율을 가지는 네 가지 종류의 black-pigmented bacteria인 *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, 그리고 *Prevotella nigrescens*를 동정시 추정 동정법인, special potency disc 검사와 filter paper spot 검사를 사용하여 각 방법의 균에 대한 동정특성을 확인하고 API kit와 PCR 검사로 확인 동정을 시행하여 그 효과를 확인하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 표본 채취 및 세균배양

근관치료를 위해 원광대학교 치과병원 보존과에 내원한 환자 중 최근 3개월 동안 항생제를 복용하지 않았으며 괴사 치수와 치근단 치주염을 가진 33개의 치아를 선택하였다. 환자의 나이는 22에서 67세 범위였다. 2개의 치아를 제외하고 모든 치아에서 치근단 골 소실이 방사선적으로 관찰되었다. 26 증례에서 타진민감성을 보였으며 19증례는 근관내 배농을 보였다.

치아를 pumice로 세정하고 rubber dam으로 격리한 후 치아, rubber dam 및 clamp을 3% 과산화수소로 소독하였다. 근관와동을 형성하고 치주강을 개방 후 질소 가스를 주입하면서 #15 paper point로 표본을 채취하였다. Paper point를 근관에 1 분간 넣어서 근관내 용액을 흡수하도록 하였으며 근관당 5개의 paper point를 사용하였다. Paper point를 미리 환원시킨 trypticase-soy broth(Difco, Detroit, MI)가 든 cryotube에 삽입하였다. Trypticase-soy broth 내의 표본은 vortex로 혼합 후 비선택적 Brucella agar(BBL Microbiology Systems, Cockeysville MD)에 5% defibrinated sheep blood, 5 µg/ml hemin, 그리고 0.5 µg/ml menadion을 첨가하여 접종하였다. Brucella agar 일차 배양은 90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂를 포함한 anaerobic chamber(Coy Laboratory Products, MI, USA)에서 8~15일간 37°C에서 배양시켰다. 표본 접종 작업은 표본 채취 후 15분 이내에 시행하였다.

일차 배양 후 순수 배양하고 5개의 black-pigmented

colony를 배양하여 각각 special potency disk 검사, filter paper spot 검사, PCR 검사 및 API 검사를 시행하였다. 검사의 정확도를 확인하기 위해 표준균주에 대해 각각의 검사를 시행하였다. 대조균으로 사용될 표준균주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였고, *P. endodontalis* ATCC 35406, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, 및 *P. nigrescens* 33563을 사용하였다.

2. 연구방법

1) Special potency disk 검사

순수 배양한 세균으로 검사하였다. 항생제 디스크 vancomycin(5µg), kanamycin(1000µg), colistin disk(10 µg)를 20mm간격으로 위치시켰다. Plate를 37°C에서 48-72시간동안 혐기성상태로 배양한 후 디스크 주위의 성장역제 부위를 조사하였다.

각 항생제 주변에 형성된 억제대의 폭경이 10mm이상인 경우는 감수성(sensitive, S), 폭경이 10mm이내인 경우는 내성(resistant, R)로 구분하였다.

2) Filter paper spot 검사(α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase 와 trypsinlike enzyme)

Spot 트립신 유사효소 검사는 10g의 N-carbobenzoxy-L-arginine 7-amido 4-methylcoumarin hydrochloride (Sigma)를 4.16ml의 dimethyl sulfoxide에 용해시켰다. 기질은 필요한 때까지 4°C에서 저장하였다. 분석은 100µl의 dimethyl sulfoxide내의 N-carbobenzoxy-L-arginine 7-amido 4-methylcoumarin hydrochloride를 pH 8.0 100µl의 0.1M Tris buffer에 섞어 filter paper strip을 흡수시키는데 사용하였다. 본 연구에서 사용된 glucosidase 분석에 필요한 기질은 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside와 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside로 4mM의 농도까지 증류수에서 현탁하였다. 4-Methylumbelliferyl- α -fucoside는 1mM의 농도까지 증류수에 용해시켰다.

Filter paper spot test는 기질을 포함한 filter paper strip 위에 bacteria colony의 1 loop를 도말하고 15분간 37°C에 저장하였다. Filter strip을 장파장(366nm)의 hand-held mineral lamp하에서 효소활성을 filter paper 위의 fluorescent blue spot으로 관찰하였다. 청색 형광이 나타나면 양성으로 형광이 없으면 음성으로 판정하였다.

3) PCR 검사

가. DNA 추출

순수배양한 Brucella blood agar plate에서 colony를 취해서 Qiagene DNeasy kit(Qiagene, Germany)를 이용

해서 추출하였다.

나. 중합효소 연쇄반응

PCR은 각각 4 μ l의 primer(20pmol), 4 μ l의 premix Taq, 4 μ l DNA, 8 μ l DDW를 포함하는 20 μ l의 반응혼합물에서 수행하였다.

다. PCR 조건

*P. endodontalis*의 primer pair 부위는 16S rRNA gene(sense primer: 5'-GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC-3', antisense primer: 5'-CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC-3', 672bp)이고, *P. gingivalis*의 primer pair 부위는 16S rRNA gene(sense primer: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3', antisense primer: 5'-ACT GTT AGC AAC TAG CGA TGT-3', 404bp)이고, *P. intermedia*의 primer pair는 16S rRNA gene(sense primer: 5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3', antisense primer: 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T-3', 575 bp)이고, *P. nigrescens*는 16S r-RNA gene(sense primer: 5'-GTG TTT CAT TGA CGG CAT CCG ATA TGA AAC-3', antisense primer: 5'-CCA CGT CTC TGT GGG CTG CGA-3', 828bp)이었다^{19,26}.

2 방울의 mineral oil을 첨가하고 DNA thermocycler GeneAmp(Applied Biosystems, USA)로 확장하였다. *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*에 대한 PCR 온도는 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 후 1분 동안 94 $^{\circ}$ C에서 denaturation, 1분 동안 53 $^{\circ}$ C에서 primer annealing, 1분간 72 $^{\circ}$ C에서 polymeration은 30 cycle을 거친 후 10분간 72 $^{\circ}$ C에서 last polymerization하였다. *P. intermedia*는 5분 동안 94 $^{\circ}$ C에서 predenaturation 후 1분동안 94 $^{\circ}$ C에서 denaturation, 1분간 56 $^{\circ}$ C에서 primer annealing, 1분간 72 $^{\circ}$ C에서 polymerization은 30cycle을 거친 후 5분간 72 $^{\circ}$ C에서 last polymerization한다. 그리고 *P. nigrescens*의 경우, 5분 동안 94 $^{\circ}$ C에서 predenaturation 후 1분 동안 94 $^{\circ}$ C에서 denaturation, 1분간 65 $^{\circ}$ C에서 primer annealing, 1분간 72 $^{\circ}$ C에서 polymerization은 30 cycle을 거친 후, 그리고 5분간 72 $^{\circ}$ C에서 last polymerization한다. 확장체는 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

PCR 산물 확인은 Tris-borate EDTA buffer 내의 1.2% agarose gel electrophoresis를 시행하여 분석하였다. gel은 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide로 착색하고 300nm ultraviolet light 하에서 Polaroid(Polaroid Co. USA)를 이용하여 사진을 찍었다. 1 kb DNA ladder(Promega, USA)는 molecular weight marker로 사용하였다.

4) RapidID 32A 검사

본 연구에서는 API kit중 RapidID 32A(BioMerieux Sa, France)를 이용하였다. RapidID 32A 검사는 반정량적 미세방법으로 빠른 검사법이다. 탈수된 chromogenic enzyme substrate, detector reagent A[UREase, Alginine Dihydrolase, α -Galactosidase, β -Galactosidase, β -Galactosidase 6 Phosphate, α -Glucosidase, β -Glucosidase, α -ARAbinosidase, β -GlucURonidase, β -N-Acetyl-Glucosaminidase, MaNnosE Fermentation, RAFinose fermentation, Glutamic ac. DeCarboxylase, α -FUCosidase, Reduction of NITrates, INDole Production, Phosphatase ALcalme, Arginine Arylamidase, Proline Arylanidase, Leucyl Glycin Arylamidase, Phenylalamic ac. Arylamidase, Tyrosine Arylamidase, Alanine Arylamidase, Glycine Arylamidase, Histidine Arylamidase, Glutamyl Glutamic ac. Arylamidase, Serine Arylamidase]에 대한 효소 분석이다. RapidID 32A system은 Analytab Products(BioMerieux Sa, France)에서 구입하였다.

RapidID 32A는 접종 및 배양 후, 제조자의 지시에 따라 판독하였다. 이전의 연구들에서 분석을 호기성이나 혐기성으로 시행했을 때 API 결과들 사이의 유의한 차이를 보여 주지 않았으므로, 효소 실험은 호기성 환경에서 시행하였다. 2~4일 혐기성(90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂) 배양을 Brucella agar plate에서 채취하여 세균을 얻었다. 세균 현탁액은 McFarland 표준 5도와 6도 사이의 탁도까지 0.85% NaCl의 혼탁도를 만들었다. 각 Rapid ID 32A tray의 microcupule은 0.05ml의 표준화된 세균 현탁액으로 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 4시간동안 어두운 환경에서 호기성 배양 후 시약을 각각 microcupule에 첨가하고, 5분 후에 일어나는 색변화를 RapidID 32A 색변화 chart를 사용하여 판독하였다. 실험을 2~3회 반복 시행하였다.

III. 연구성적

표본을 배양하여 black-pigmented bacteria가 배양된 경우는 총 33 증례중 18 증례였다. 1개의 plate에서 5개의 colony를 각각 배양하였고 77 colony가 배양되었다. *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* 표준균주와 실험균주의 colony에 각각 special potency 디스크 검사, filter paper spot 검사, PCR을 시행하였고 PCR에서 동정이 되지 않은 경우 RapidID 32A를 시행하였다.

1) Special potency 디스크 검사결과

Porphyromonas 균인 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 표준 균주와 실험균주 모두에서

Table 1. Special potency disk test on ATCC type strains

	Kanamycin	Vancomycin	Colistin
<i>P. endodontalis</i> (35406)	R	S	R
<i>P. gingivalis</i> (33277)	R	S	R
<i>P. intermedia</i> (25611)	R	R	S
<i>P. nigrescens</i> (33563)	R	R	S

* R indicates resistant; S indicates sensitive

Table 2. Special potency disk test on clinical isolates

	Kanamycin	Vancomycin	Colistin	No. of strains
<i>P. endodontalis</i>	R	S	R	16 (20.8%)
<i>P. gingivalis</i>				
<i>P. intermedia</i>	R	R	S	21 (27.2%)
<i>P. melaninoogenica</i>				
<i>P. nigrescens</i>	S	R	S	33 (42.9%)
<i>P. oralis</i>	R	R	R	7 (9%)

* R indicates resistant; S indicates sensitive

Table 3. Filter paper spot test on ATCC type strains

	α -glucosidase	β -glucosidase	α -fucosidase	trypsinlike enzyme
<i>P. endodontalis</i> (35406)	-	-	-	-
<i>P. gingivalis</i> (33277)	-	-	-	+
<i>P. intermedia</i> (25611)	+	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> (33563)				

+, 90 to 100% of strains positive; -, 90 to 100% of strains negative

Table 4. Filter paper spot test on clinical isolates

	α -glucosidase	β -glucosidase	α -fucosidase	trypsin like enzyme	No. of strains
<i>P. endodontalis</i>	-	-	-	-	6 (7.8%)
<i>P. gingivalis</i>	-	-	-	+	10(12.9%)
<i>P. intermedia</i>	+	-	+	-	56(72.7%)
<i>P. nigrescens</i>					

+, positive reaction observable after 15 min; -, No reaction detected after 15 min

kanamycin과 colistin에 저항성을 보이고, vancomycin에 감수성을 보여주었는데, 16 strain(20.7%)의 실험균주에서 보여주었다. *P. intermedia*와 *Prevotella melaninogenica*는 표준균주와 실험균주에서

kanamycin과 vancomycin에 저항성을 가지고 colistin에 감수성을 보여주었는데, 21 strain의 실험균주(27.2%)에서 보여주었다. *Prevotella oralis* 실험균주는 kanamycin, vancomycin, 그리고 colistin 모두에 저항성

Table 5. Number of strains clinical isolates identified using PCR

	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>P. nigrescens</i>	total*
No. of strains	2 (2.5%)	10 (12.9%)	10 (12.9%)	33 (42.6%)	55 (71.9%)

*: total number of strains identified by PCR

Table 6. Number of strains clinical isolates identified using RapidID 32A

	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. oralis</i>	total*
No. of strains	4 (5.2%)	11 (14.3%)	7 (9%)	22 (28.5%)

*: total number of strains identified by PCR

을 보였는데 7 strain(10%)에서 보여주었다. 그러나, *P. nigrescens*의 경우 표준균주와 실험균주는 vancomycin에 저항성을 보이고 colistin에 감수성을 보였는데 kanamycin disk 검사에서는 표준균주에서는 저항성을 보이고 실험균주에서는 감수성을 보여주었는데 33 strain(42.6%)의 실험균주에서 보여주었고 PCR결과 *P. nigrescens*로 동정되었다.

2) Filter paper spot 검사 결과

*P. endodontalis*와 같이 모두 음성 반응을 보이는 균은 6 strain(7.8%)이었다. *P. gingivalis*와 같은 결과를 보여주는 균은 10 strain(12.9%)이었다. *P. intermedia*, *P. nigrescens*와 같은 결과를 보여주는 균은 56 strain (72.7%)이다. *P. melaninogenica*와 *P. oralis*는 *P. nigrescens*와 *P. intermedia*와 같은 효소반응을 보여주었다.

3) PCR 결과

*P. endodontalis*는 2 strain(2.5%), *P. gingivalis*는 10 strain(12.9%), *P. intermedia*는 10 strain(12.9%), *P. nigrescens*는 33 strain(42.6%)가 검출되었다.

4) RapidID 32A 검사 결과

*P. endodontalis*가 4 strain(5.1%)이 검출되었다. RapidID 32A에서 *P. endodontalis*로 동정된 strain은 filter spot test에서도 *P. endodontalis*로 동정되었다. *P. melaninogenica*가 11 strain(14.3%), *P. oralis*가 7 strain(9%)에서 각각 검출되었다.

Black-pigmented anaerobic bacteria는 근관감염에서 분리율이 다양하여 25%에서 70%에 이른다. Sundqvist²¹⁾는 치근단 치주염을 가진 치아 72개의 근관에서 black-pigmented bacteria의 발현율을 연구하였는데 30.5%에서 분리되었다. Wayman등³³⁾은 58개의 치근단 병변을 평가하여 *P. intermedia*는 10%에서 발견되었고, 1%에서 *P. gingivalis*가 관찰되었다. Gharbia등¹⁶⁾은 근관 감염과 치주감염에서 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 동정하였는데 치주표본에서는 *P. intermedia*가 70%에서 발견되었고 근관 표본에서는 27%에서 발견되었다. *P. nigrescens*는 건강한 치은에서 많이 발견되었다. Matto등³⁴⁾은 여러부위의 감염에서 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*를 동정하였는데, 치성 감염에서는 49 strain중 *P. nigrescens*는 53%에서 *P. intermedia*는 40%, *P. gingivalis*는 6%에서 관찰되었다. Bogen등²⁶⁾은 black-pigmented anaerobic bacteria를 치근단 병변에서 동정하였는데 *P. gingivalis*는 0.5%에서 관찰되었고, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. endodontalis*는 검출되지 않았다. 1999년 Baumgartner¹⁹⁾는 근관감염에서 black-pigmented bacteria를 분리하였는데 55%에서 black-pigmented bacteria가 분리되었고, 그 중 *P. nigrescens*는 50%, *P. intermedia*는 36%, *P. gingivalis*는 9%, *P. melaninogenica*는 5%로 동정되었다. Oliveira등⁶⁾은 감염근관 44개에서 *P. endodontalis*를 동정하였는데 39.5%에서 발견되었다. Siqueira등²³⁾은 감염된 치아에서 black pigmented bacteria를 분리, 동정하였는데 black-pigmented anaerobic bacteria는 59.3%에서 분리되었고, *P. endodontalis*는 42.6%, *P. gingivalis*는

IV. 총괄 및 고찰

27.8%, *P. nigrescens*는 7.4%, *P. intermedia*는 5.6%가 동정되었다. Siqueira등²²⁾이 10개의 급성 치근단 농양에서 동정하였을 때 급성 농양의 80%에서 black-pigmented anaerobes를 검출하였고, *P. endodontalis*는 70%에서 검출되었고, *P. gingivalis*는 40%, *P. intermedia*는 10%에서 검출되었다. *P. nigrescens*는 검출되지 않았다.

근관 감염에서 가장 빈번하게 검출되던 BPB중의 하나인 *P. intermedia*로부터 *P. nigrescens*가 따로 분리되어 분류된 후 *P. nigrescens*가 가장 빈번하게 검출되고 있다¹⁷⁾. Bae 등²⁰⁾은 지금까지 *P. intermedia*로 동정된 56 strain을 SDS-PAGE를 이용하여 동정한 결과 73.2%가 *P. nigrescens*이고 26.8%가 *P. intermedia*이었다고 발표하였다.

많은 연구들에서 *P. nigrescens*가 높은 발현율을 보이지만, 다른 연구들은 세균의 발현율에 대해 다양한 보고를 하고 있다. 이런 세균 발현율의 차이는 증례의 선택, 표본채취와 이동, 동정에 사용된 방법등의 차이로 나타날 수 있다.

본 연구에서는 감염근관의 발현율이 높은 black-pigmented bacteria중 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*를 동정하기 위해 현재 세균을 동정하는데 많이 사용되고 있는 추정 동정 방법중 special potency disk 검사와 filter paper spot 검사를 시행하고 PCR을 시행하고, PCR로 동정이 되지 않는 균은 API kit를 사용하였다. 33개의 표본 중 18개 (55%)의 표본에서 black pigmented bacteria가 배양되었다. 각 표본에서 5개의 colony를 분리, 배양하여 총 77개 colony에서 black-pigmented bacteria가 배양되었다. 배양된 bacteria를 동정한 결과 *P. nigrescens*는 33 strain(42.6%)로 가장 높은 발현율을 보였고, *P. gingivalis*는 10 strain(12.9%), *P. intermedia*는 10 strain(12.9%), *P. endodontalis*는 6 strain(7.8%)의 발현율을 보였다. 본 연구는 근관감염에서 *P. nigrescens*가 가장 높은 발현율을 보이고 있다.

Special potency disk 검사시 *Porphyromonas*는 vancomycin에 민감성을 가지고 kanamycin과 colistin에 저항성을 가진다. *Prevotella*는 kanamycin과 vancomycin에 저항성을 가지지만 colistin에는 다양한 반응을 보인다²⁵⁾. 본 연구에서 사용한 special potency disk 검사에서 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 kanamycin과 colistin에 저항성을 가지고 vancomycin에 민감성을 나타내었다. *P. intermedia*와 *P. melaninogenica*는 kanamycin, vancomycin에 저항성을 보이고 colistin에는 감수성을 나타냈다. *P. oralis*는 kanamycin, vancomycin 및 colistin에 모두 저항성을 보였다. *P. endodontalis*, *P. gingi-*

valis, 및 *P. intermedia*는 표준균주와 실험 균주가 동일한 결과를 보였다. *P. nigrescens*는 표준균주와 실험균주 모두 vancomycin에 저항성을 보이고 colistin에 감수성을 보였다. 그러나, kanamycin disk 검사에서 표준균주의 *P. nigrescens*가 kanamycin에 저항성을 보였지만, 실험균주에서는 kanamycin에 감수성을 보여주었다. 이런 결과는 표준균주는 치주원인균을 사용하고 있고 실험균주는 근관감염균을 사용하고 있어서 치주원인의 *P. nigrescens*는 근관감염의 *P. nigrescens*가 다른 특성을 보여주는 것으로도 추정할 수 있을 것이다.

Filter paper spot 검사는 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides levii*를 동정할 수 있고, *Porphyromonas asaccharolytica*는 *Porphyromonas endodontalis*와 α -fucosidase 양성반응으로 구별할 수 있다^{26,27)}. 본 연구의 filter paper spot 검사에서 *P. endodontalis*는 6 strain(7.8%), *P. gingivalis*는 10(12.9%), *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 56(72.7%) strain에서 검출되었다. *P. endodontalis*로 검출된 strain은 RapidID 32A 검사에서도 같은 결과를 보여주었다.

PCR은 DNA 특정서열의 복제를 이용한 실험실적 동정방법이다. 하나의 세균 세포와 매우 적은 양의 DNA에서 시작하여 특별히 알려진 세균 DNA의 서열을 증폭하여서 전기영동으로 찾아낸다. PCR은 매우 높은 민감성과 배양하지 못하는 미생물을 찾아내는 능력이 있어서 근관 세균의 조사와 진단에 유용한 가능성을 가진다^{24,27,28)}. 또한 PCR은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 동정하는 효과적인 방법이다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 표현형은 비슷하지만 다른 유전형을 가지고 있다. 배양시 모양과 colony type이 비슷하여 두 종을 분리하는데 도움을 주지 못한다. 그러나, 이전의 PCR에 기초한 연구들은 PCR방법이 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 구분하는 간단하고 빠른 방법으로 도움을 준다고 알려준다^{27,28)}. 그러나 PCR은 세균의 대한 DNA sequence 자료가 부족하여 모든 세균에 대해 적용할 수 없는 단점을 가진다.

본 연구에서 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*에 대한 primer를 제작하여 16S rRNA gene PCR을 시행할 결과 *P. nigrescens*는 33 strain(42.6%), *P. intermedia*와 *P. gingivalis*는 각각 10 strain(12.9%), *P. endodontalis*는 2 strain(2.5%)이 동정되었다. Filter paper spot 검사와 RapidID 32A 결과에서 6개의 strain이 *P. endodontalis*로 동정되었는데 4개의 *P. endodontalis*는 PCR로 동정되지 않았다. 본 연구에 사용된 *P. endodontalis*의 primer가 모든 *P.*

endodontalis에 대하여 특이적이지 않은 primer이거나 P. endodontalis에 대한 새로운 strain일 것으로 보인다. 앞으로 P. endodontalis에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

API system은 RapID ANA II(Innovative Diagnostic Systems, Inc.), RapidID 32A(BioMerieux, France), ANI Card(Vitek Systems, Inc.) AN-Ident 와 API ZYM(Alytab), 그리고 MicroScan(American Microscan)등이 있다. 이런 system은 여러 종류가 시판되고 있지만 bacteria glycosidases, aminopeptidases 그리고 다른 효소들에 대한 chromogenic substrate를 이용한다. 실험 미생물은 carbohydrate를 포함하지 않는 agar medium에 신선한(24에서 72시간) 상태로 배양을 해야한다. 배양 후에 적절한 시약을 첨가하고, 반응을 수작업으로 해석하거나 자동 해석기(Microscan[AutoScan-4], RapidID 32)로 해석한다. 특별한 code 숫자를 만들었고 동정을 위한 code book에서의 목록과 비교하였다. 그러나 색깔 반응의 해석은 이런 system에서 정확도 문제를 야기할 수 있다. 게다가, 접종물을 준비하는데 사용되는 성장 배지는 어떤 미생물에서는 결과를 방해할 수도 있다^{5,32}. 이번 연구에서 RapidID 32A를 시행하여 P. endodontalis는 4 strain(5.1%), P. melaninogenica는 11strain(14.3%), P. oralis는 7 strain(9%)가 발견되었다.

본 연구에서는 special potency disk 검사, filter paper spot 검사, 16S rRNA gene PCR 및 RapidID 32A 방법으로 순수배양한 모든 black pigmented bacteria를 동정할 수 있었다. Special potency disc test 및 filter paper spot 검사는 시행이 간편하며 실험한 균의 특성에 따라 어느 정도 정확하게 균을 추정할 수 있었고 PCR 및 API kit로 확인 동정을 할 수 있었다. 추후 black pigmented bacteria의 동정을 위해 감수성이 높고, 정확하며 시행하기 편하고 저가의 균 동정 방법의 개발에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

Black-pigmented bacteria중 근관내에서 발현율이 높은 균인 P. endodontalis, P. gingivalis, P. intermedia, P. nigrescens를 동정하는 방법으로 special potency disk 검사, filter paper spot 검사, PCR 검사 및 API 검사를 사용하여 동정하였다.

감염된 치근관내의 black-pigmented bacteria를 배양, 동정한 결과 77 strain중 P. nigrescens는 33 strain(42.6%)로 가장 높은 발현율을 보였다. P. gingivalis는 10 strain(12.9%), P. intermedia는 10

strain(12.9%), P. endodontalis는 6 strain(7.8%), P. melaninogenica는 11 strain(14.3%), P. oralis는 7 strain(9%)의 발현율을 보였다.

표준균주의 P. nigrescens가 special potency disk 검사에서 kanamycin 저항성을 보이는 것과 달리 감염근관내에서 동정한 P. nigrescens는 special potency disk 검사에서 kanamycin에 감수성을 보였다.

근관원인 black-pigmented bacteria를 동정할 때 special disk potency 검사, filter paper spot 검사등을 이용하여 원인균을 추정하고 PCR 및 API kit를 사용하여 배양된 모든 표본의 black-pigmented bacteria를 효과적이고 정확하게 확인 동정할 수 있었다.

참고문헌

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ.: The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg 20: 340-349, 1965.
2. Brook I, Frazier EH, Gher ME.: Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol Immunol 6: 123-125, 1991.
3. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J.: Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg 49: 171-174, 1980.
4. Winkelhoff V, Steenbergen TJM, Graaff J.: The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. J Clin Periodontol 15: 145-155, 1998.
5. Winkelhoff AJ, Steenbergen TJM, Kippuw N, Graaff J.: Further characterization of Bacteroides endodontalis, an asaccarolytic black-pigmented bacteroides species from the oral S Cavity. J Clin Microbiol 22: 75-79, 1985.
6. Oliveira JCM, Siqueira JF, Alves GB, Hirata R, Andrade AFB.: Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endodon 26: 729-732, 2000.
7. Hofstad T.: Pathogenicity of anaerobic gram-negative rods: possible mechanisms, Rev Infect Dis 6: 189-199, 1984.
8. Lamont RJ, Jenkinson HF.: Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev 62: 1244-1257, 1998.
9. Shah HN, Collis MD.: Proposal for reclassification of Bacteroides asaccarolyticus, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides endodontalis in a new genus. Porphyromonas, Int J Syst Bacteriol 38: 128-131, 1988.
10. Shah HN, Collins MD.: Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides. Int J Syst Bacteriol 40: 205-208, 1990.
11. Winkelhoff AJ, Steenbergen TJM, Graaff J.: Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis: Its role in endodontal infections. J Endodon 18: 431-433, 1992.
12. Steenbergen TJM, Winkelhoff AJ, Grenier D, Graff J.: Bacteroides endodontalis sp. nov., an Asaccharolytic black-pigmented bacteroides species from infected

- dental root canals. *Int J Syst Bacteriol* 2: 118-120, 1984.
13. Slots J, Genco RJ.: Direct hemagglutination technique for differentiating *Bacteroides asaccarolyticus* oral strains from nonoral strains. *J Clin Microbiol* 10: 371-374, 1979.
 14. Herweijer JA, Loos BG, Neiders ME.: Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. *J Endodon* 18: 620-624, 1992.
 15. Stubbs S, Park SF, Bishop PA, Lewis MAO.: Direct detection of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* in suppurative oral infection by amplication of 16S rRNA gene. *J Med Microbiol* 18: 1017-1022, 1999.
 16. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA.: Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J periodontol* 65: 56-61, 1994.
 17. Shah HN, Gharbia SE.: Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 542-546, 1992.
 18. Nisengard & Newman.: *Oral microbiology and immunology*. second edition. 213-216, 1991.
 19. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T.: Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endodon* 25: 413-417, 1999.
 20. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL.: Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of Endodontic Origin. *J Endodon* 23: 620-623, 1997.
 21. Sundqvist G, Johnsson E, Sjogren U.: Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endodon* 15: 13-18, 1989.
 22. Siqueira JF, Rocas IN, Oliveira JCM, Santos KRN.: Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *J Endodon* 27: 164-167, 2001.
 23. Siqueira JF, Rocas IN, Oliveira JCM, Santos KRN.: Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endodon* 27: 563-566, 2001.
 24. 김양호, 김선희.: 진단 임상 미생물학. 284-406, 2000.
 25. Haapasalo M.: *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol*. 5: 1-10, 1989.

26. Bogen G., Slots J.: Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions, *Int Endodon J* 32: 204-210, 1999.
27. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ.: Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 20: S304-7, 1995.
28. Steenberg TJM, Menard C, Tjihof CJ, Mouton C, Graaff J.: Comparison of three molecular typing methods in studies of transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *J Med. Microbiol* 14: 416-421, 1993.
29. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM.: *Wadsworth Anaerobic bacteriology Manual*. 1993.
30. Moncla BJ, Braham P.: Detection of sialidase (Neuraminidase) activity in actinomyces species by using 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuraminic acid in a filter paper spot test. *J Clin Microbiol* 27: 182-184, 1989.
31. Moncla BJ, Braham P, Rabe LK, Hillier SL.: Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria by using 4-methylumbelliferone derivatives. *J Clin Microbiol* 29: 1955-1958, 1991.
32. Slots J.: Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system, *J Clin Microbiol* 14: 288-294, 1981.
33. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB.: A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endodon* 18: 152-155, 1992.
34. Matto J, Asikainen S, Vaisanen ML, Rautio M, Saarela M, Summanen P, Finegold S, Jousimies-Somer H.: Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin Infect Dis* 25: S194-8, 1997.

사진부도 설명

- Fig. 1. Primary culture sample
- Fig. 2. Specific potency disk test of *P. gingivalis*(ATCC 33277)
P. gingivalis was resistant to kanamycin and colistin, and sensitive to vancomycin.
- Fig. 3. Specific disk potency test of *P. intermedia*(ATCC 25611)
P. intermedia was resistant to kanamycin and vancomycin, and sensitive to colistin.
- Fig. 4. Specific potency disk test of *P. nigrescens*(ATCC 33563)
P. nigrescens was resistant to kanamycin and vancomycin, and sensitive to colistin.
- Fig. 5. Special potency disk test of patient sample was identified *P. nigrescens*.
P. nigrescens was resistant to vancomycin, and sensitive to kanamycin and colistin.
- Fig. 6. Filter paper spot test result of patient sample was identified *P. nigrescens*.
from left to right: trypsin like enzyme, α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase *P. nigrescens* showed positive response to α -glucosidase and α -fucosidase.
- Fig. 7. PCR profiles of *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* amplified with species specific primers for the 16S rRNA
SM: size marker(1kb DNA ladder)
lane 1: *P. endodontalis*(ATCC 35406)
lane 2: *P. gingivalis*(ATCC 33277)
lane 3: *P. nigrescens*(ATCC 33563)
lane 4: *P. intermedia*(ATCC 25611)
- Fig. 8. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products of samples
SM: size marker(1kb DNA ladder)
lane 1: sample No. 201(*P. nigrescens*)
lane 2: sample No. 2803(*P. intermedia*)
lane 3: sample No. 2806(*P. intermedia*)
lane 4: sample No. 2401(*P. gingivalis*)
lane 5: sample No. 2403(*P. gingivalis*)
lane 6: sample No. 3201(*P. nigrescens*)
lane 7: sample No. 3205(*P. nigrescens*)
- Fig. 9. RapidID 32A test result of clinical isolates

사진부도 ①

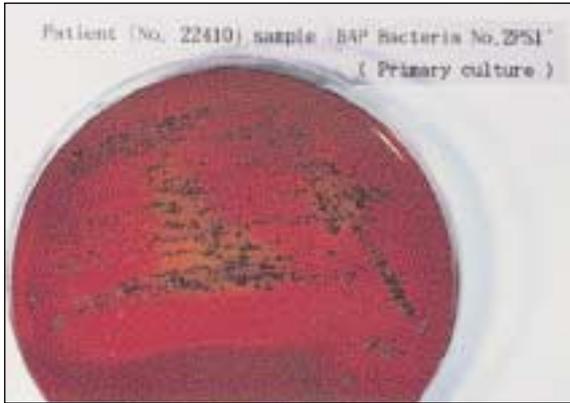


Fig. 1

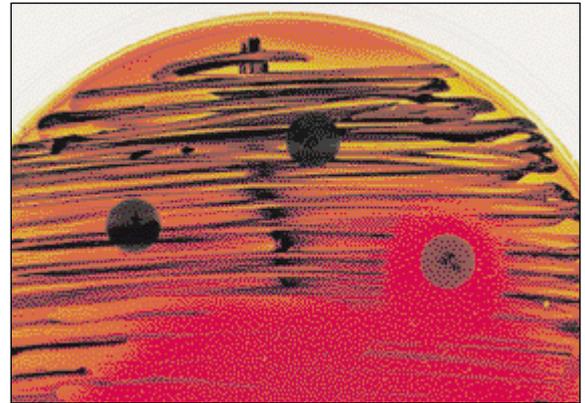


Fig. 2

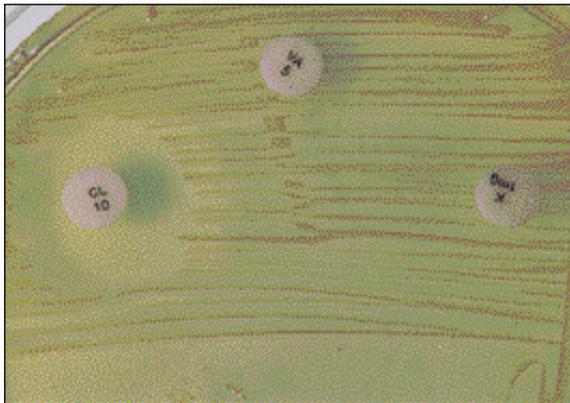


Fig. 3



Fig. 4

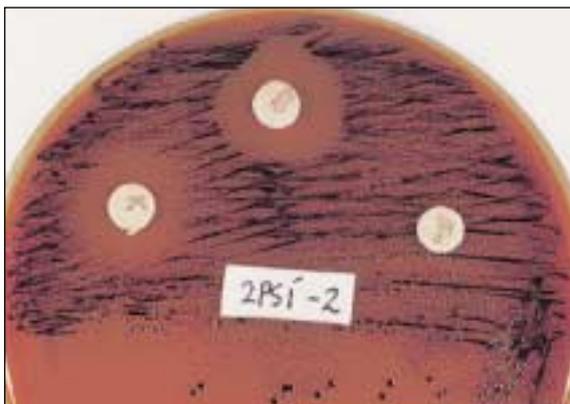


Fig. 5

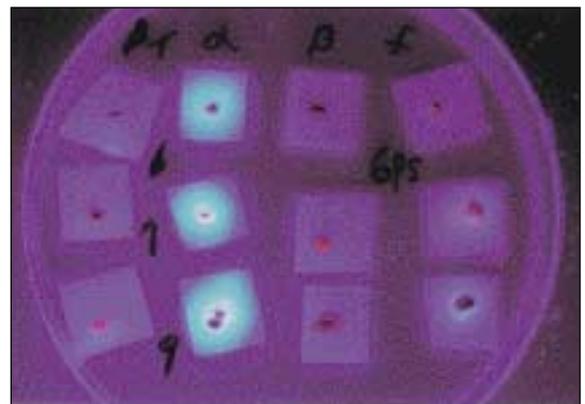


Fig. 6

사진부도 ②

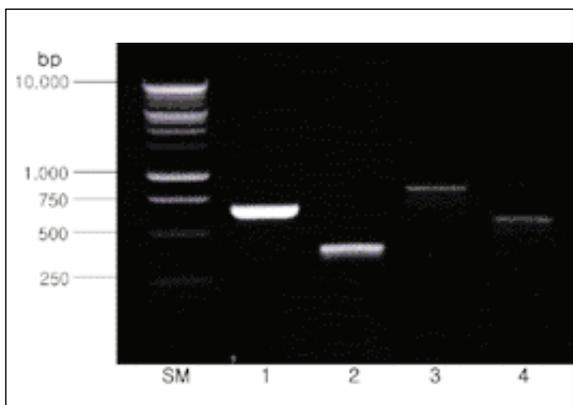


Fig. 7

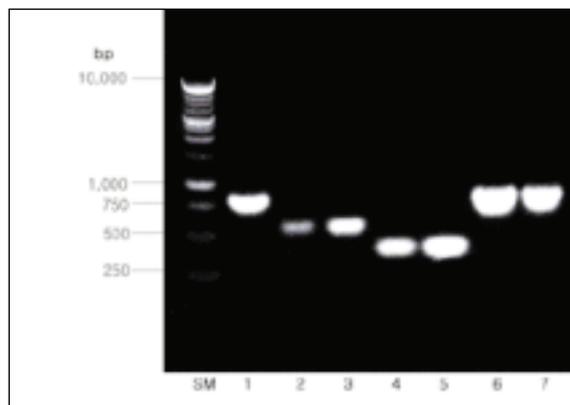


Fig. 8



Fig. 9