

임상검사물에서의 혐기성세균 분리

연세대학교 의과대학 임상병리과

정 윤 섭 · 권 오 현 · 이 삼 열

=Abstract=

Isolation of Anaerobic Bacteria from Clinical Specimens

Yunsop Chong, Oh Hun Kwon, Samuel Y. Lee

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine
Seoul, Korea

Anaerobic bacteria are the major residents of human skin and mucous membranes. The importance, as opportunistic pathogens, of anaerobic bacteria are well recognized because of more population with decreased defense against bacterial invasion due to chemotherapy, radiation therapy, extensive surgical operation etc. are dealt at hospitals.

An analysis of the anaerobe isolation results at Yonsei University Medical Center during the January 1974-May 1975 period was made and the following results were obtained.

- 1) From 118 patients 146 strains of anaerobes were isolated. Among these 81.3% were nonspor-forming anaerobes. Most frequently isolated anaerobes were *Pc. asaccharolyticus*, *Ps. anaerobius*, *Ps. intermedius*, *B. fragilis* and *Cl. perfringens*.
- 2) Anaerobes were frequently isolated from wound, female genital, intraabdominal, and pleuropulmonary specimens. Fewer anaerobes were isolated from blood, spinal fluid and liver specimens.
- 3) The ratio of anaerobe isolation to total bacteria isolation were; liver 66.7%, intraabdominal 33.3%, pleuropulmonary 28.9%, spinal fluid 5.0% and blood 4.2%.
- 4) Among the 118 anaerobe isolated patients, 48.3% yielded anaerobes only and rest of them yielded anaerobes together with aerobes.
- 5) Most of the gram-positive anaerobes were susceptible to the antibiotics tested. Exception was to tetracycline to which appreciable number showed resistance. It was noteworthy that only 48% of *B. fragilis* was susceptible to tetracycline.

인체의 피부 및 체외와 통하는 체강 즉 구강, 장, 비
노생식기등에는 혐기성세균이 정상균총으로서 존재하
며 그 수는 호기성세균의 수를 능가하고 있다¹⁾. 혐기
성세균 감염에 대해서는 세균학의 초창기에서부터 알려
져왔으나 강력한 독소를 생성하는 *Clostridium* 감염에
대해서는 많은 연구가 되어있으나 무아포 혐기성 세균
의 감염에 대한 중요성은 최근에야 다시 강조되고 있
다²⁾.

무아포 혐기성세균은 opportunistic pathogen이다.
세균 감염에 대한 저항력이 감소된 숙주에는 감염을 야
르킬 기회를 갖게된다. 즉, 노령, 화학요법, 방사선치
료, 복잡한 수술이나 부상등은 혐기성세균 감염의 기
회를 주게 된다³⁻⁵⁾.

환자에서 혐기성세균을 분리 동정하는 일은 감염의
치료를 위해 필요한 것이지만 호기성세균의 경우와는
달리 까다로운 술식을 요하기 때문에 흔히 분리등

한하게 된다⁶⁾. 그러나 간편한 GasPak 법⁷⁾의 이용으로 소규모 실험실에서도 혐기성세균 배양을 쉽게 할 수 있게 되었다.

혐기성세균의 분류는 최근에야 재정비되었다^{8,9)}. 동정에는 대사산물의 gas liquid chromatography가 이용되기도 하지만⁸⁾, 간략동정법도 연구되어 있어서¹⁰⁻¹⁵⁾ 임상검체에서 분리된 혐기성세균의 동정에 이용되고 있다.

연세의료원에서는 1972~73년의 혐기성세균 분리결과를 보고한바 있으며¹⁶⁾, 그 이후의 자료를 정리하여 이에 보고한다.

재료 및 방법

Routine bacteriology를 위해 1974년 1월부터 1975년 5월 사이에 연세의료원 환자에서 채취되어 배양한 결과를 검토하였다. 혐기성세균이 정상균총으로서 들어 있게 되는 객담, 뇨, 변 및 인후와 질의 검체물은 혐기성배양을 하지 않았다¹³⁾. 혈액배양은 fluid thioglycollate medium (FTM)을 써서 하였고 다른 검체물은 혐기성배양이 의뢰된 경우와 intraabdominal pus 중 혐기성세균이 있을 듯한 것은 primary culture plate를 혐기성으로 배양하고 그 밖의 것은 혐기성세균배양을 위한 배지로는 thioglycollate medium만을 사용하는 재래식 방법을 쓰고, 혐기성세균의 증식이 있는 것으로 생각될 때에는 agar plate에 subculture하여 혐기성으로 배양하였다. thioglycollate medium 으로서는 FTM (Difco)에 BHI (Difco)과 TSB (BBL) 1/4량씩과 hemoglobin 분말 (Difco)을 첨가하여 개량한 FB-TH¹⁷⁾을 사용하였고 blood agar는 tryptose blood agar base (Difco)에 human bank blood를 5% 넣어 만들었다. 그 밖에 GAM (Nissui)¹⁸⁾평판배지와 phenylethyl alcohol blood agar (Difco)¹⁹⁾ 선택배지를 필요에 따라 사용하였다.

혐기성 배양방법은 GasPak 법⁷⁾과 steel wool single plate 법 (SWAP)^{20, 21)}을 겸용하되 pleuropulmonary specimen의 배양에는 GasPak을 더 이용하였다. Subculture를 하면 aerotolerant하게 되는 일이 있는 *Ps. intermedius*와 *B. corrodens*는 예외로 하고 그 밖의 세균에 있어서는 condle jar에서도 증식되지 않는 것만을 혐기성세균으로 동정하였다²²⁾.

분리세균의 분류는 Holdeman and Moore⁷⁾에 따르되 동정은 형태, 재래식 생화학적 방법, 담즙이나 항생제 내성^{7, 14, 18, 23)}을 근거로 하였다. 항생제 감수성시험

은 disk diffusion 법으로 Bauer-Kirby 법²⁴⁾에 규정된 농도의 disk를 써서 blood agar에서 시험하였고 대개 SWAP 법으로 배양하였으며 *Clostridium*은 24시간 배양후에 그 밖의 세균은 2일후에 결과를 판독하였다. 판독기준은 Sutter et al¹³⁾에 따르고 여기에 기준이 없는 항생제에 대해서는 Bauer-Kirby²⁴⁾의 기준을 이용하였다.

결 과

이 기간중에 118명의 환자에서 146주의 혐기성세균이 분리되었다(Table 1). 분리세균중 27주(18.7%)는 *Clostridium*이고 119주(81.3%)는 무아포 혐기성세균이었다. 분리수가 많은 세균은 *Pc. asaccharolyticus* 17주, *Ps. anaerobius* 11주, *Ps. intermedius* 19주, *B. fragilis* 27주, *Cl. perfringens* 24주이었다.

검체물별로는 창상에서 60주, 여성생식기에서 47주, 복강에서 15주, pleuropulmonary에서 13주, 혈액에서 8주, 간에서 2주, 척수액에서 1주가 분리되었다.

세균배양 양성 환자중 혐기성세균의 분리율을 창상과 여성생식기를 제외한 다른 검체물에서 보면 12.0%이었다(Table 2). 검체물별로는 간 66.7%, 복강 33.3%, pleuropulmonary 28.9%, 척수액 5.0%이었고 혈액은 salmonella 중 환자를 제외하고 4.2%이었다.

혐기성세균 분리환자 118명중 57명(48.3%)에서는 혐기성세균만이, 61명(51.7%)에서는 호기성세균이 함께 분리되었다(Table 3).

분리균주수가 비교적 많았던 세균의 항생제 감수성은 (Table 4), 그람양성 세균에 있어서는 routine battery의 여러 항생제에 대부분의 균주가 감수성을 나타내었는데 chloramphenicol이 가장 좋은 결과를, tetracycline이 가장 불량한 결과를 보였다. *B. fragilis*는 시험된 항생제중 chloramphenicol에는 모두 감수성이었으나 tetracycline에는 내성주가 많았으며 다른 항생제에는 모두 내성이었다.

고 안

임상검체물에서 흔히 분리되는 혐기성세균은 무아포 혐기성세균이며 이들은 opportunistic pathogen으로서 중요함이 알려져 있다. 연세의료원에서는 1972년부터 혐기성세균 분리에 관심을 가져왔으며 이보고는 1972~73년의 분리결과 보고¹⁶⁾에 이은 제 2차보고가 된다. 제 1차 보고기간에는 111명의 환자에서 128주의 혐기성

Table 1. Anaerobic bacteria isolated from clinical specimens (Jan 1974-May 1975)

Anaerobes	Number of strains							Total
	Blood	CSF	Pleuropulmonary*	Intraabdominal	Liver	Wound*	Female genital*	
<i>Pc. asaccharolyticus</i>	1			2		6	8	17
<i>Pc. magnus</i>						2	1	3
<i>Peptococcus</i> spp.			1	1		4	2	8
<i>Ps. anaerobius</i>			2			4	5	11
<i>Ps. intermedius</i>	1		1		2	5	10	19
<i>Ps. micros</i>			2			3	1	6
<i>Ps. productus</i>						1	1	2
<i>Peptostreptococcus</i> spp.			1			1	5	7
<i>B. corrodens</i>			1			1		2
<i>B. fragilis</i>	5	1	2	6		9	4	27
<i>B. melaninogenicus</i>			1				1	2
<i>Bacteroides</i> spp.						3	2	5
<i>F. necrophorum</i>	1		1			1	1	4
<i>F. nucleatum</i>						3		3
<i>Fusobacterium</i> spp.							1	1
<i>Fubacterium</i> spp.			1			1		2
<i>Cl. perfringens</i>				6		13	5	24
<i>Clostridium</i> spp.						3		3
Total	8	1	13	15	2	60	47	146

* Pleuropulmonary includes pleural fluid, lung abscess and transtracheal aspiration specimen.

Wound includes pus from unspecified sources.

Female genital does not include vaginal specimens.

Table 2. Anaerobic bacteria isolation rate by specimen

	Blood	CSF	Pleuropulmonary	Intraabdominal	Liver	Total
No. of patients with bacteria isolation	192*	20	38	39	3	292
No. of patients with anaerobic bacteria isolation (%)	8 (4.2)	1 (5.0)	11 (28.9)	13 (33.3)	2 (66.7)	35 (12.0)

* Does not include 164 salmonellosis patients.

Table 3. Importance of anaerobic bacteria as pathogen shown by the concomitant presence or absence of aerobes

Isolated organism	Number of patients							Total (%)
	Blood	CSF	Pleuropulmonary	Intraabdominal	Liver	Wound	Female genital	
Anaerobe only	8	1	6	7	1	23	11	57(48.3)
Anaerobe & Aerobe			5	6	1	22	27	61(51.7)
Total	8	1	11	13	2	45	38	118 (100)

Table 4. Antibiotic susceptibility test results by disk diffusion method of anaerobic bacteria

Anaerobe	No. of strains tested	Ampicillin	Chloramphenicol	Cloxacillin	Lincomycin	Penicillin	Tetracycline
<i>Pc. asaccharolyticus</i>	14	100*	100	86	93	100	54
<i>Ps. anaerobius</i>	11	90	100	73	100	91	70
<i>Ps. intermedius</i>	11	82	100	70	80	80	46
<i>Cl. perfringens</i>	21	95	95	53	71	65	32
<i>B. fragilis</i> **	23	0	100				48

* Per cent of strains susceptible.

** All of the strains were resistant to colistin, gentamicin, kanamycin and streptomycin.

세균이 분리된 때 비해 제 2차 기간 1년 5개월 사이에는 118명에서 146주가 분리되어 분리수의 증가를 보이지만, primary plate의 혐기성 배양으로 35%의 검사물에서 혐기성 세균을 분리한 Martin²⁶⁾의 결과와 비교할 때, 본 실험에서와 같은 thioglycollate medium에 의존하는 배양 방법은 불충분함을 알 수 있다.

분리 세균중 18.7%가 *Clostridium*이었는데 이 율은 다른 연구자의 것보다 월등히 높다. *Clostridium*의 분리는 thioglycollate medium을 쓰는 재래식 방법으로도 분리하기 쉽기 때문인 것으로 생각된다. 무아포 혐기성 세균의 균종별 분리 수는 *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* 및 *B. fragilis*가 많았는데 이러한 경향은 다른 연구자의 결과와 비슷하다²⁵⁻²⁷⁾.

혐기성 세균은 뇌, 폐, 간, 복강내 기관, 여성생식기 등 어떠한 부위에나 감염을 일으킬 수 있다⁶⁾. 따라서 검사물의 종류가 무엇이든지 혐기성 세균의 배양을 고려해야 되지만 정상 균종이 안 섞일 수 없는 객담, 뇨, 변, 질 검사물 등에서는 혐기성 배양을 안한다. 객담과 뇨에서 혐기성 배양을 해야할 경우에는 transtracheal aspiration (TTA)이나 suprapubic aspiration 등의 방법으로 채취해야 된다. 이 실험 결과에는 소수의 TTA 검사물이 pleuropulmonary specimen 중에 포함되어 있다. 검사물별 분리수는 창상과 여성 생식기에서 많았으며 이러한 검사물에서의 혐기성 세균 분리의 중요성을 나타내고 있다.

Normal flora의 개입 염려가 적은 검사물에서의 혐기성 세균 분리율은 12% (Table 2)인데 이것은 1972~73년의 7.8%보다 높으나 이것은 감염의 증가보다는 분리방법의 향상에 기인되었을 것으로 생각된다. 분리율이 높은 검사물은 간에서는 66.7%, 복강내 33.3%, pleuropulmonary 28.9%로 검사물 종류에 따라서는 혐기성 세균이 감염 세균으로서 대단히 중요함을 나타내고 있다. 창상 검사물에는 source를 알 수 없는 pus

가 들어있기 때문에, 그리고 여성 생식기 검사물중에는 *Trichomonas*, *Candida* 혹은 gonococcus culture가 그 목적인 것이 대부분이었을 것이고 검사물마다 그 목적은 확인할 수 없어서 혐기성 세균 분리는 물론 산하지 않았지만 혐기성 세균은 난소 농양, Bartholin's gland abscess, 산후감염, post abortal sepsis, 자궁내막염 등의 원인이 됨이 잘 알려져 있다.

분리세균의 etiologic agent로서의 중요성을 따지기 위하여는 흔히 분리 세균의 수, 다른 세균과의 동시분리 여부를 고려에 넣는다. 혐기성 세균이 분리된 환자 118명중 57명(48.3%)에서는 혐기성 세균만이 분리되었다. 61명(51.7%)에서는 호기성 세균과 함께 분리되었지만 pathogenicity가 분명한 호기성 세균이나 다수의 호기성 opportunistic pathogen이 분리된 검사물에 있어서는 대개 혐기성 세균배양을 시도하지 않았으므로 함께 분리된 세균은 소위 비병원성 세균이거나 소수의 opportunistic pathogen이었으므로 혐기성 세균의 역할을 부인할 수는 없으며 특히 혐기성 세균은 단독으로 감염을 일으키기 보다는 다른 세균과 함께 synergistic infection을 일으킴을²⁸⁾ 고려할 때 그러하다.

항생제 감수성검사 결과의 비교에는 무리가 있다. 혐기성 세균의 감수성검사방법은 표준화되어 있지 않으므로 다른 연구자의 결과와 비교하기 어렵기 때문이다²⁹⁾. 그러나 tetracycline 감수성 균주의 감소를 볼 수 있었는데 이러한 현상은 Gorbach and Bartlett³⁰⁾나 小栗³¹⁾등의 보고에서도 볼 수 있으며 앞으로의 변화가 주목된다. *B. fragilis*의 항생제 감수성은 호기성 그람 음성간균과는 판이하며 routine battery의 항생제 중에서는 chloramphenicol과 tetracycline만이 유효한 것인데 tetracycline 내성주의 출현은 환자치료에 문제점이 될 것으로 생각된다.

결 론

연세의료원의 1974년 1월부터 1975년 5월까지의 혐기성 세균 분리결과를 검토하였으며 다음 결과를 얻었다.

1) 118명의 환자에서 146주의 혐기성 세균이 분리되었으며 81.3%는 무아포 혐기성 세균이었다. 분리수가 많은 것은 *Pc. asaccharolyticus*, *Ps. anaerobius*, *Ps. intermedius*, *B. fragilis*, *Cl. perfringens* 이었다.

2) 혐기성 세균이 많이 분리된 검사물은 창상, 여성생식기, 복강, pleuropulmonary 검사물이었다.

3) 검사물별 분리율은 간 66.7%, 복강 33.3%, pleuropulmonary 28.9%, 척수액 5.0%, 혈액 4.2%이었다.

4) 혐기성 세균이 분리된 환자 118명중 48.3%에서는 혐기성 세균만이 분리되었고 나머지 환자에서는 호기성 세균이 동시에 분리되었다.

5) 그람양성 세균은 여러 항생제에 대부분이 감수성이었지만 tetracycline 에 대해서는 내성주가 상당수 있었다. *B. fragilis* 는 tetracycline 감수성주가 48%에 불과하였다.

참 고 문 헌

- 1) 上野一恵: 正常菌叢, 嫌氣性菌と嫌氣性菌症. 1版. 小酒井望, 鈴木祥一郎編著. 醫學書院, 東京, pp. 19-30, 1968.
- 2) 鈴木祥一郎: 歴史, 嫌氣性菌と嫌氣性菌症. 1版. 小酒井望, 鈴木祥一郎編著. 醫學書院, 東京, pp. 1-6, 1968.
- 3) Dupont, H.L. and Spink, W.W.: *Infections due to gram-negative organisms: An analysis of 860 patients with bacteremia at the University of Minnesota Medical Center, 1958-1966. Medicine, 48:307, 1969.*
- 4) Felner, J.M. and Dowell, V.R., Jr.: "Bacteroides bacteremia. *Amer. J. Med., 50:787, 1971.*
- 5) Finegold, S.M., Marsh, V.H. and Bartlett, J.G.: *Anaerobic infections in the compromised host. Proc. Internat. Conf. on nosocomial infections. Am. Hosp. Assoc., Chicago, pp. 123-134. 1971.*
- 6) Gorbach, S.L. and Bartlett, J.G.: *Anaerobic*

- infections. N. Engl. J. Med., 290:1177, 1974.*
- 7) Brewer, J.H. and Allgeier, D.L.: *Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. Appl. Microbiol., 14:985, 1966.*
- 8) Holdeman, L.V. and Moore, W.E.C.: *Anaerobe laboratory manual. Virginia Polytechnic Institute; Blacksburg, 1973.*
- 9) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.*
- 10) Finegold, S.M., Harada, N.E. and Miller, L.G.: *Antibiotic susceptibility patterns as side in classification and characterization of gram-negative anaerobic bacilli. J. Bacteriol., 94:1443, 1967.*
- 11) Shimada, K., Sutter, V.L. and Finegold, S.M.: *Effect of bile and desoxycholate on gram-negative anaerobic bacteria. Appl. Microbiol., 20:737, 1970.*
- 12) Ninomia, K., Othani, F., Koosaka, S., Kamiya, H., Ueno, K., Suzuki, S. and Inoue, T.: *Simple and expedient methods of differentiation among Bacteroides, Sphaerophorus and Fusobacterium. Jap. J. Med. Sci. and Biol., 25:63, 1972.*
- 13) Sutter, V.L., Attebery, H.R., Rosenblatt, J.E., Bricknell, K.S. and Finegold, S.M.: *Anaerobic bacteriology manual. School of Med., UCLA, Los Angeles, 1972.*
- 14) Ellner, P.D., Granato, P.A. and May, C.B.: *Recovery and identification of anaerobes: A system suitable for the routine clinical laboratory. Appl. Microbiol., 26:904, 1973.*
- 15) Slifkin, M. and Hercher, H.J.: *Paper chromatography as an adjunct in the identification of anaerobic bacteria. Appl. Microbiol., 27:550, 1974.*
- 16) Chong, Y., Ine, S.H., Choe, M.H., Yi, K.N. and Lee, S.Y.: *Anaerobic bacteria in routine diagnostic cultures. Yonsei Med. J., 15:1, 1974.*
- 17) Chong Y.: *Comparison of thioglycollate media, modified thioglycollate media, and GAM for*

- the cultivation of non-sporeforming anaerobes.*
Yonsei Med. J., **15**:136, 1974.
- 18) 上野一恵: 培地, 嫌氣性菌と嫌氣性菌症. 1版. 小酒井望, 鈴木祥一郎編著, 醫學書院, 東京, pp. 324-367, 1968.
- 19) Dowell, V.R., Jr., Hill, E.O. and Altemeier, W.A.: *Use of phenylethyl alcohol in media for isolation of anaerobic bacteria.* *J. Bacteriol.*, **88**:1811, 1964.
- 20) 上野一恵: 國産スチール・ウルによる嫌氣性培養法の實際. *Media Circle*, **57**:1, 1964.
- 21) 정운섭: 혐기성세균 배양을 위한 *Steel wool* 법과 *GasPak* 법의 비교. 한국미생물학회지, **12**:131, 1974.
- 22) McBee, R.H., Lamanna, C. and Weeks, O.B.: *Definitions of bacterial oxygen relationships.* *Bacteriol. Rev.*, **19**:45, 1955.
- 23) Dowell, W.R., Jr. and Hawkins, T.M.: *Laboratory methods in anaerobic bacteriology.* *USDHEW, Atlanta*. 1974.
- 24) Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Tuck, M.: *Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method.* *Amer. J. Clin. Path.*, **45**:493, 1966.
- 25) Martin, W.J.: *Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory.* *Appl. Microbiol.*, **22**:1168, 1971.
- 26) Stokes, E.J.: *Anaerobes in routine diagnostic cultures.* *Lancet*, **1**:668, 1958.
- 27) 鈴木祥一郎, 上野一恵: 無孢子嫌氣性菌の検査の進め方(そのて). *Modern, Media*, **11**, 315, 1965.
- 28) Socransky, S.S. and Gibbons, R.J.: *Required role of Bacteroides melaninogenicus in mixed anaerobic infections.* *J. Infect. Dis.*, **115**:247, 1965.
- 29) Lerner, P.I.: *Antimicrobial considerations in anaerobic infections.* *Med. Clinics North Amer.*, **58**:533, 1974.
- 30) Gorbach, S.L. and Bartlett, J.G.: *Anaerobic infections.* *N. Engl. J. Med.*, **290**:1289, 1974.
- 31) 小栗豊子, 設樂政次, 與政子, 小酒井望, 村主千日月: 嫌氣性菌の各種化學療法劑に對する感受性の推移の検討. 第三回 嫌氣性菌感染症研究會講演記録. *Eisai*, 東京, pp. 48-51, 1973.