

치아 근관 감염 검체에서 검은 색소 형성 *Prevotella* species와 *Porphyromonas* species의 동정

원광보건대학 임상병리과

김 은 속 · 김 신 무

Identification of the Black-pigmented *Prevotella* Species and *Porphyromonas* Species from Infected Dental Root Canals

Eun-Sook Kim and Shin-Moo Kim

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea

Anaerobic black-pigmented bacteria have been implicated in the endodontic infections. This group of microorganisms includes *Porphyromonas endodontalis*, *P. 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 the special potency disk test, filter paper spot test, 16S rRNA gene-directed PCR, and API 32A system.

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

Thirty three out of 77(42.8%) were identified as *P. nigrescens*, 10 out of 77(13%) were *P. gingivalis*, 6 out of 77(7.8%) were *P. endodontalis*, 10 out of 77(13%) were *P. intermedia*. On the contrary the reference strains of *P. nigrescens*, experimental strains of *P. nigrescens* were susceptible to kanamycin in the special potency disk test.

We concluded that after rapid presumptive identification methods, such as the special potency disk test and filter paper spot test were done, 16S rRNA gene PCR and API 32A test would be accurate detection methods for black-pigmented bacteria.

Key Words : *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp. Black-pigmented bacteria

I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 세균은 주요한 원인인자로서 대부분의 근관감염은 혼합감염이고 특히 혐기성 세균이 대부분인 것으로 알려져 있다 (Kakehashi 등, 1965; Zavistoski 등, 1980; Brook 등, 1991). 이들 혐기성 세균 중 검은 색소 생성균(black-pigmented anaerobic bacteria)은 치근단 질환의 주요 원인균으로 주목받고 있으며, 악취, 동통, 누공 형성과 지속적인 임상증상이 있는 경우나 만성 치근단 질환의 악화에 중요한 역할을 담당한다(Hofstad, 1984; Winkelhoff 등, 1985; Lamont와 Jenkinson, 1998; Winkelhoff 등, 1998; Oliveira 등, 2000). 이전에 검은 색소 생성균은 *Bacteroides* 속으로 분류되었다(Shah와 Collis, 1988). Shah와 Collins(1990)는 *Bacteroides*를 세 가지 속으로 나누어, saccharolytic nonpigmenting species로 구성된 *Bacteroides*, asaccharolytic black-pigmenting species로 구성된 *Porphyromonas* 종 및 saccharolytic black-pigmented species와 nonpigmenting species로 구성된 *Prevotella*로 구분하였다(Shah와 Collis, 1988; Shah와 Collins, 1990). *Porphyromonas*의 균속에서 사람에서는 세 가지 종이 발견되는데 *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* 이다 (Winkelhoff 등, 1985; Shah와 Collis, 1988). *Porphyromonas* 중 구강에서 발견되는 균은 대부분 *P. gingivalis*이고, *P. asaccharolyticus*는 구강 이외에서 관찰되며, *P. endodontalis*는 감염된 치근관에서 분리되었다 (Shah와 Collis, 1988). *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*는 각각 성인형 치주염과 근관 감염의 주요한 원인균으로 제시되고 있다(Slots와 Genco, 1979; Steenbergen 등, 1984; Herweijer 등, 1992; Winkelhoff 등, 1992). *Prevotella* 중 검은색소를 형성하는 균은 *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. melaninogenica*, *P. loeschei* 등이 있으며, 구강에서는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*가 흔히 분리되는 세균이다(Shah와 Gharbia, 1992; Gharbia 등, 1994; Stubbs 등, 1999).

*P. gingivalis*는 치은연하 치태에서 빈번하게 분리되고 collagenase, 트립신 유사효소, keratinase, hemolysin, fimbriolysin, hyaluronidase, phospholipase, alkaline phosphatase, 및 acid phosphatase 등을 생산하며, 몇몇 종에서 순수 배양할 때 농양이나 전염성 감염의 유발을 보고하였다. *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*와 달리 근관감염과 관련된 심한 치성 농양에서 분리되고 절대 혐기성

이어서 짧은 시간 동안 공기에 노출이 되면 생존할 수 없고 트립신 유사 효소를 생산하지 않고 hemagglutination 활성을 나타내지 않으며 표현형이 *P. gingivalis*보다는 *P. asaccharolytica*와 비슷하다고 하였다. *Prevotella intermedia*는 치주질환과 연관되어 있고, 급성 증상이 있는 근관 감염에서도 많이 발견되는 균으로, 이전에는 *Bacteroides intermedius*로 명명되었으며(Nisengard와 Newman, 1991), 1992년 Shah 등에 의해 *P. nigrescens*가 *P. intermedia*로부터 따로 분리되어 분류되었다(Shah와 Gharbia, 1992). 예전에 *P. intermedia* ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD) 33563은 후에 *P. nigrescens*로 밝혀졌고, strain ATCC 25611은 *P. intermedia*로 남아있다(Gharbia 등, 1994; Stubbs 등, 1999). *P. nigrescens*가 *P. intermedia*로부터 재분류된 후 근관 감염에서 *P. nigrescens*는 검은색소 형성균 중 발현율이 가장 높다(Bae 등, 1997; Baumgartner 등, 1999). 과사치수에서 분리한 검은 색소 생성균의 발현율은 25~70%이다(Haapasalo, 1989; Sundqvist 등, 1989; Bae 등, 1997; Baumgartner 등, 1999; Siqueira 등, 2001; Siqueira 등, 2001). *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 근관감염의 급성증상과 밀접한 관련이 있었고, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 증상과 관계없이 관찰되었다(Siqueira 등, 2001; Siqueira 등, 2001).

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 검출하여 왔지만, 혐기성 세균을 배양하는 것은 시간과 노력이 많이 소요되며 배양방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다. 혐기성균은 주로 전통적 방법으로 세균을 분리, 동정하였고, 이 방법은 통상적으로 환자진단에 이용하는 데는 많은 시간이 소요된다. 미생물의 동정에는 표현형과 유전자형에 의한 동정법이 있는데, 표현형에 의한 동정법은 생물형, 약제감수성의 성장, 혈청형, phage 형, 전기영동이나 가스크로마토그래피로 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 있다.

세균의 동정 방법 중 유전자를 이용하는 방법으로

PCR법이 가장 널리 쓰이고 있다(Steenbergen 등, 1993; Slots 등, 1995)

균 동정 방법에 사용되는 방법 중 하나인 special potency disk 검사는 추정 동정법으로 유효한 항생물질을 선택하여 균종의 동정 및 그 치료에 사용될 수 있는 방법으로 편리한 방법이다(Summanen 등, 1993).

Filter paper spot 시험(α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase, trypsinlike enzyme)은 15분 이하로 빠르고, 경제적이며, 준비와 실험방법이 간단하다. 이 방법은 하나 혹은 두개의 분리된 집락을 사용하여 효소 활성의 연관성으로 구분하는 추정동정 방법이다(Moncla와 Braham, 1989).

균 동정 방법 중 단시간 동정 키트는 대상 균종별로 되어 있으므로 사용하고자 하는 키트를 선택하면 정확성이 높고 신속하게 동정할 수 있다. API RapidID 32 키트는 이미 형성한 효소의 검출에 기초한 빠른 동정 방법으로 알려져 있다(Slots, 1981; Winkelhoff 등, 1985).

본 연구의 목적은 검은 색소 생성 혐기성균인 *Porphyromonas* 균종과 *Prevotella* 균종을 동정하는데 special potency disk, filter paper spot, API RapidID 32A 키트 및 PCR 시험으로 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

근관치료를 위해 전북지역 K 치과대학병원에 내원한 환자 중 최근 3개월 동안 항생제를 복용하지 않았으며 괴사치수와 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 근관 내 배농을 보였다.

치아를 pumice로 세정하고 rubber dam으로 격리한 후 치아, rubber dam 및 clamp을 3% 과산화수소로 소독하였다. 근관와동을 형성하고 치수관을 개방 후 질소 가스를 주입하면서 #15 paper point로 표본을 채취하였다. Paper point를 근관에 1 분간 넣어서 근관 내 용액을 흡수하도록 하였으며 근관당 5개의 paper point를 사용하였다. Paper point를 미리 환원시킨 trypticase-soy broth(TSB, Difco, Detroit, MI)가 든 cryotube에 삽입하였다. TSB 내

의 검체는 vortex로 혼합 후 Brucella agar(BBL Microbiology Systems, Cockeysville MD)에 5% defibrinated sheep blood, 5 μ g/mL hemin, 그리고 0.5 μ g/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 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 검체는 채취 후 15분 이내에 배양하였다.

일차 배양은 각 평판배지에서 5개의 집락을 선택하여 배양한 후 검은색 형성집락 77개를 각각 special potency disk, filter paper spot, PCR 및 API 32A 시험을 하였다. 대조균으로 표준균주는 *P. endodontalis* ATCC 35406, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, 및 *P. nigrescens* ATCC 33563을 사용하였다.

2. 동정시험

1) Special potency disk 시험

순수 배양한 세균을 Brucella blood 우무배지에 항생제 디스크 vancomycin(5 μ g), kanamycin(1000 μ g), colistin (10 μ g) disk를 20 mm 간격으로 놓고, 37 $^{\circ}$ C에서 48-72시간동안 혐기적 상태로 배양한 후 디스크 주위의 성장억제 부위를 조사하였다.

각 항생제 주변에 형성된 억제대의 지름이 10 mm 이상인 경우는 감수성(susceptible, S), 10 mm 이내인 경우는 내성(resistant, R)으로 판정하였다.

2) Filter paper spot 시험(α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase와 trypsinlike enzyme)

Spot 트립신 유사효소 시험은 10 g의 N-carbobenzoxyl-L-arginine 7-amido 4-methylcoumarin hydrochloride (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo., USA)를 4.16 mL의 dimethyl sulfoxide에 용해시켰다. 기질은 필요한 때까지 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 분석은 100 μ L의 dimethyl sulfoxide내의 N-carbobenzoxyl-L-arginine 7-amido 4-methylcoumarin hydrochloride를 pH 8.0 100 μ L의 0.1M Tris buffer에 섞어 filter paper strip을 흡수시키는 데 사용하였다. 본 연구에서 사용된 glucosidase 분석에 필요한 기질은 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside와 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside로 4 mM의 농도까지 증류수에서 현탁하였다. 4-Methylumbelliferyl- α -fucoside는 1 mM의 농도까지 증류수에 용해시켰다.

Filter paper spot 시험은 기질을 포함한 filter paper

strip 위에 집락 1 백급이를 도달하고 15분간 37°C에 배양하였다. Filter strip을 장파장(366 nm)의 hand-held mineral lamp 하에서 효소활성을 filter paper 위의 fluorescent blue spot으로 관찰하였다. 청색 형광이 나타나면 양성으로 형광이 없으면 음성으로 판정하였다.

3) PCR 시험

(1) DNA 추출

순수배양한 *Brucella* blood 우무 평판배지에 자란 집락으로 Qiagene DNeasy 키트(Qiagene, Germany)를 이용하여 추출하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응

PCR은 각각 4 µL의 primer(20 pmol), 4 µL의 premix Taq, 4 µL DNA, 8 µL 증류수를 포함하는 20 µL의 반응 혼합물에서 수행하였다.

(3) PCR 조건

본 연구에 사용된 16S rRNA-specific primers는 Table 1과 같다.

Mineral oil 2 방울을 첨가하고 DNA thermocycler GeneAmp(Applied Biosystems, USA)로 증폭시켰다. *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*에 대한 PCR 온도는 94°C에서 5분간 predenaturation 후 1분 동안 94°C에서 denaturation, 1분 동안 53°C에서 primer annealing, 1분간 72°C에서 polymeration은 30 cycle을 거친 후 10분간 72°C에서 last polymerization 하였다. *P. intermedia*는 5분 동안 94°C에서 predenaturation 후 1분 동안 94°C에서 denaturation, 1분간 56°C에서 primer annealing, 1분간 72°C에서 polymerization은 30 cycle을 거친 후 5분간 72°C에서 last polymerization 하였다. 그리고 *P. nigrescens*의 경우, 5분

동안 94°C에서 predenaturation 후 1분 동안 94°C에서 denaturation, 1분간 65°C에서 primer annealing, 1분간 72°C에서 polymerization은 30 cycle을 거친 후, 그리고 5분간 72°C에서 last polymerization 하였으며, 증폭된 DNA는 -20°C에서 저장하였다.

PCR 산물 확인은 Tris-borate EDTA buffer 내의 1.2% agarose gel electrophoresis를 시행하여 분석하였다. Gel은 0.5 µg/mL의 ethidium bromide로 염색하고 300 nm 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 시험

본 연구에서는 API kit 중 RapidID 32A(BioMerieux Sa, France)를 이용하였다. RapidID 32A 시험은 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 32A는 접종 및 배양 후, 제조자의 지시에 따라 판독하였다. 이전의 연구들에서 분석을 호기성이나 혐기성으로 시행했을 때 API 결과들 사이의 유의한 차이를 보여주지 않았으므로, 효소 실험은 호기성 환경에서 시행

Table 1. 16S rRNA-specific primers used in this study(Baumgartner 등, 1999; Bogen 와 Slots, 1999).

Strains of 16S rRNA gene	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>P. endodontalis</i>	S : GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC AS: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672
<i>P. gingivalis</i>	S : AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG AS: ACT GTT AGC AAC TAG CGA TGT	404
<i>P. intermedia</i>	S : TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG AS:TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575
<i>P. nigrescens</i>	S : GTG TTT CAT TGA CGG CAT CCG ATA TGA AAC AS: CCA CGT CTC TGT GGG CTG CGA	828

하였다. 2~4일 혐기성(90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂) 배양을 Brucella agar plate에서 배양하여 세균을 얻었다. 세균 현탁액은 0.85% NaCl를 사용하여 McFarland 5번과 6번 사이의 탁도로 맞추었다. 각 Rapid ID 32A tray의 microcupule은 0.05 mL의 표준화된 세균 현탁액으로 접종하였다. 37°C에서 4시간 동안 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. 결 과

총 33개의 치아검체에서 검은 색소 형성세균은 18개(54.5%) 검체에서 분리되었다. *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* 표준균주와 임상검체에서 분리된 세균으로 special potency 디스크, filter paper spot, PCR 및 API RapidID 32A 시험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Special potency 디스크 검사결과

P. endodontalis ATCC35406 균주와 실험균주인 6주(7.8%)에서, *P. gingivalis* ATCC33277 균주와 10주(13.0%)에서 각각 kanamycin과 colistin에 내성, vancomycin에 감수성이었고, *P. intermedia* ATCC25611 균주와 실험균주인 10주(13.0%)에서, *Prevotella melaninogenica*는 11주(14.3%)의 실험균주에서 각각 kanamycin과 vancomycin에 내성, colistin에 감수성이었다. *Prevotella oralis* 7주(9.0%)에서 kanamycin, vancomycin 및 colistin에 모두 내성이었다. 한편 *P. nigrescens* ATCC 33563 균주와 33주(42.9%)의 실험균주에서 vancomycin에 내성, colistin에 감수성이었으나, kanamycin disk 시험에서는 ATCC 33563 균주에서 내성, 33주(42.9%)의 실험균주에서는 감수성이었다(Table 2-3).

2) Filter paper spot 시험

P. endodontalis ATCC 35406과 6주(7.8%)의 실험균주는 filter paper spot 시험인 α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase 및 trypsinlike enzyme 시험에서 모두 음성이었다. *P. gingivalis*와 ATCC 33277과 10주(13.0%)의 실험

Table 2. Special potency disk test of *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. 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, resistant; S, susceptible

Table 3. Special potency disk test of *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. isolated from clinical specimen

Organisms	Kana-mycin	Vanco-mycin	Colistin	No.(%) of strains
<i>P. endodontalis</i>	R*	S	R	6 (7.8)
<i>P. gingivalis</i>	R	S	R	10 (13.0)
<i>P. intermedia</i>	R	R	S	10 (13.0)
<i>P. melaninogenica</i>	R	R	S	11 (14.3)
<i>P. nigrescens</i>	S	R	S	33 (42.9)
<i>P. oralis</i>	R	R	R	7 (9.0)

*R, resistant; S, susceptible

균주는 α -glucosidase, β -glucosidase, α -fucosidase 시험에서 음성이고, trypsinlike enzyme 시험에서 양성을 보였다.

P. intermedia ATCC 25611와 10주(13.0%)의 실험균주에서, *P. melaninogenica*는 11주(14.3%)의 실험균주에서, *P. nigrescens* ATCC 33563와 33주(42.9%)의 실험균주에서, *P. oralis*는 7주(9.0%)의 실험균주에서, 각각 α -glucosidase와 α -fucosidase 시험은 양성, β -glucosidase와 trypsinlike enzyme 시험은 음성반응을 보였다(Table 4-5).

3) PCR 결과

PCR시험으로 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*는 각각 10주, *P. nigrescens*는 33주에서 모두 동정되었으나, *P. endodontalis*는 2주(33.3%)만 동정되었다(Table 6, Fig.1-2).

4) RapidID 32A 시험

API RapidID 32A 키트로 시험된 77주에서 *P. endodontalis*는 6주, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*는 각각 10주, *P. melaninogenica*는 11주, *P. nigrescens*는 33주, *P. oralis*는 7주로 동정되었다(Table 7).

Table 4. Filter paper spot test of *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. ATCC type strains

Organisms	α -glucosidase	β -glucosidase	α -fucosidase	Trypsinlike enzyme
<i>P. endodontalis</i> ATCC 35406	-	-	-	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	-	-	-	+
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	+	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	+	-	+	-

* +, $\geq 90\%$ of strains positive; -, $\geq 90\%$ of strains negative

Table 5. 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(13.0)
<i>P. intermedia</i>	+	-	+	-	10(13.0)
<i>P. melaninogenica</i>	+	-	+	-	11(14.3)
<i>P. nigrescens</i>	+	-	+	-	33(42.9)
<i>P. oralis</i>	+	-	+	-	7(9.0)

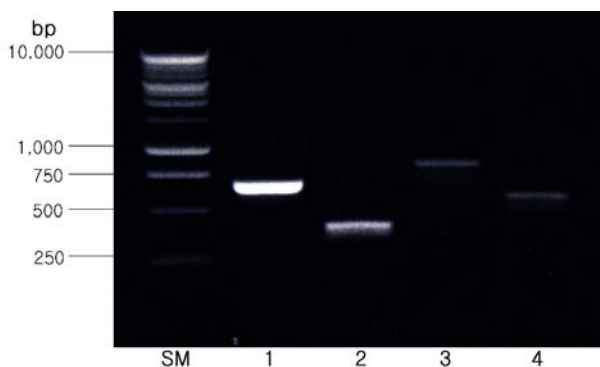
*+, positive reaction after 15 min; -, negative reaction 15 min

Table 6. Identification of *Porphyromonas* spp. and *Prevotella* spp. by PCR

Strains	No. of strains tested (n=77) [†]	No. (%) of strains identified
<i>P. endodontalis</i>	6	2(33.3)
<i>P. gingivalis</i>	10	10(100)
<i>P. intermedia</i>	10	10(100)
<i>P. melaninogenica</i>	11	NT*
<i>P. nigrescens</i>	33	33(100)
<i>P. oralis</i>	7	NT*

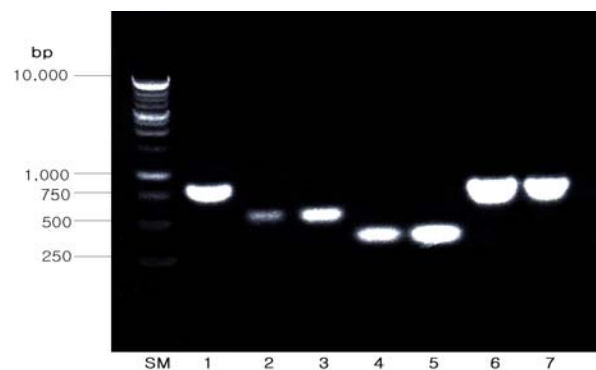
* NT, not tested

[†] Total no. of strains tested

**Fig. 1.** PCR profile 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.**Table 7.** Identification of *Porphyromonas* spp. and *Prevotella* spp. by API RapidID 32A system

Strains	No. of strains tested (n=77)*	No. (%) of strains identified
<i>P. endodontalis</i>	6	6(100)
<i>P. gingivalis</i>	10	10(100)
<i>P. intermedia</i>	10	10(100)
<i>P. melaninogenica</i>	11	11(100)
<i>P. nigrescens</i>	33	33(100)
<i>P. oralis</i>	7	7(100)

* No. of strains tested

**Fig. 2.** 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*).

IV. 고 찰

검은 색소 생성 혐기성균은 근관감염에서 25~70%로 분리되는 것으로 알려져 있다. 치근단 치주염을 가진 치아 72개의 근관에서 검은색소 생성 혐기성균의 분리율이 30.5%(Sundqvist 등, 1989), 58개의 치근단 병변에서 *P. intermedia*는 10%, *P. gingivalis*는 1%의 분리율(Wayman 등, 1992)을 각각 보고하였다. 근관감염과 치주감염에서 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 동정하였는데 치주표본에서는 *P. intermedia*가 70%, 근관 표본에서는 27%를 분리하였다(Gharbia 등, 1994). *P. nigrescens*는 건강한 치은에서 많이 상재하고 있다. 여러 부위의 감염에서 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*를 동정하였는데, 치성 감염에서는 49 균주 중 *P. nigrescens*는 53%에서, *P. intermedia*는 40%, *P. gingivalis*는 6%가 분리되었다(Matto 등, 1997). 치근단 병변에서 0.5%의 *P. gingivalis*를 분리 보고하였는데, *P. intermedia*, *P. nigrescens* 및 *P. endodontalis*는 검출되지 않았다(Bogen와 Slots, 1999). 1999년 예는 근관감염에서 55%에서 검은 색소 생성 혐기성균이 분리되었고, 그 중 *P. nigrescens*는 50%, *P. intermedia*는 36%, *P. gingivalis*는 9%, *P. melanogenica*는 5%로 동정되었다(Baumgartner 등, 1999). 감염근관 44개에서 39.5%의 *P. endodontalis*를 보고하였다(Oliveira 등, 2000). 감염된 치아에서 59.3%의 검은 색소 생성 혐기성균을 보고하였는데 이중, *P. endodontalis*는 42.6%, *P. gingivalis*는 27.8%, *P. nigrescens*는 7.4%, *P. intermedia*는 5.6%가 분리되었다(Siqueria 등, 2001). 10개의 급성 치근단 농양에서 80%의 검은 색소 생성 혐기성균을 보고하였는데, 이중 *P. endodontalis*는 70%, *P. gingivalis*는 20%, *P. intermedia*는 10%이었으나, *P. nigrescens*는 검출되지 않았다(Siqueira 등, 2001).

근관 감염에서 가장 빈번하게 검출되던 검은 색소 생성 혐기성균 중의 하나인 *P. intermedia*는 이 세균으로부터 *P. nigrescens*가 따로 분류되어 그 후로부터 *P. nigrescens*가 가장 빈번하게 검출되고 있다(Shah와 Gharbia, 1992). 지금까지 *P. intermedia*로 동정된 56 균주를 SDS-PAGE를 이용하여 동정한 결과 73.2%가 *P. nigrescens*이고, 26.8%가 *P. intermedia*이었다고 보고하였다(Bae 등, 1997).

많은 연구자들에서 근관 감염의 원인균으로 *P. nigrescens*가 가장 높은 분리율을 보이고 있으며, 이 세균 외에도 검은 색소 생성 혐기성균들의 다양한 보고를 하

고 있다. 이런 세균의 분리율의 차이는 증례의 선택, 검체 채취와 수송, 동정에 사용된 방법 등의 차이로 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens*를 검체로부터 분리하고 동정하기 위해 많이 사용되고 있는 추정동정 방법 중 special potency disk, filter paper spot 및 PCR 시험을 하고, PCR로 동정이 되지 않는 세균은 API RapiID 32A 키트를 사용한 바 33개의 검체 중 18개(55%)에서 검은색 색소 생성 혐기성균이 분리되었다. 각 검체에서 5개의 집락을 배양하여 총 77개의 검은 색소 생성 혐기성균이 배양되어 동정한 바 *P. nigrescens*가 33 주(42.6%)로 가장 높은 분리율을 보였고, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*는 각각 10 주(12.9%)이었고, *P. endodontalis*는 6 주(7.8%) 순으로 분리되었다.

Special potency disk시험에서 *Porphyromonas*는 vancomycin에 감수성, kanamycin과 colistin에 내성이고, *Prevotella*는 kanamycin과 vancomycin에 내성이지만 colistin에는 다양한 성상으로 알려졌다(Haapasalo, 1989). 본 연구에서 사용한 special potency disk시험에서 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 kanamycin과 colistin에 내성이고, vancomycin에 감수성을 보였으며, *P. intermedia*와 *P. melaninogenica*는 kanamycin, vancomycin에 내성, colistin에는 감수성이었고, *P. oralis*는 kanamycin, vancomycin 및 colistin에 모두 내성을 보였다. 또한 *P. endodontalis*, *P. gingivalis* 및 *P. intermedia*는 표준균주와 실험 균주가 동일한 결과이었고, *P. nigrescens*는 표준균주와 실험균주 모두 vancomycin에 내성, colistin에 감수성이었다. 그러나 kanamycin 디스크 시험에서 표준균주의 *P. nigrescens*가 kanamycin에 내성을 보였으나, 실험균주에서는 kanamycin에 감수성이었다.

Filter paper spot 시험은 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Bacteroides levii*를 동정할 수 있고, *Porphyromonas asaccharolytica*와 *P. endodontalis*는 α -fucosidase 시험에서 *P. asaccharolytica*는 양성반응, *P. endodontalis*는 음성반응으로 구별할 수 있다고 하였다 (Slots 등, 1995; Bogen 와 Slots, 1999). 본 연구의 filter paper spot 검사에서 *P. endodontalis*는 6 주(7.8%), *P. gingivalis*는 10 주(13%), *P. intermedia* 10 주(13%) *P. nigrescens*는 33 주(42.9%)에서 분리되었고, 이 시험에서 *P. endodontalis*로 동정된 균주도 역시 RapidID 32A 검사에서도 같은 결과를 보여주었다.

근관 감염에서 색소생성 혐기성균의 동정에 PCR시험이 유용한 것으로 알려져 있고, 또한 PCR은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 동정하는 방법으로 많이 이용되고 있다(Steenbergen 등, 1993; Slots 등, 1995).

본 연구에서 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*에 대한 primer를 제작하여 16S rRNA gene PCR을 시행한 결과 *P. nigrescens*는 33 주 (42.6%), *P. intermedia*와 *P. gingivalis*는 각각 10 주 (12.9%), *P. endodontalis*는 2주(2.5%)가 동정되었다. Filter paper spot 검사와 RapidID 32A 결과에서 6 균주가 *P. endodontalis*로 동정되었는데 4 주의 *P. endodontalis*는 PCR로 동정되지 않았다. 본 연구에 사용된 *P. endodontalis*의 primer가 모든 *P. endodontalis*에 대하여 특이적이지 않은 primer이거나 *P. endodontalis*에 대한 새로운 균주일 것으로 추정되었으며, 앞으로 *P. endodontalis*에 대한 연구가 더 필요하다고 사료되었다.

본 연구에서 RapidID 32A 키트 시험은 PCR 시험에서 동정되지 않은 *P. endodontalis* 4주가 이 세균으로 동정되었고, 시험된 다른 균주도 PCR과 RapidID 32A 키트와 동일하게 동정되어, 색소생성 혐기성균을 동정 시 이 두 가지 방법을 사용하면 동정률을 증가시킬 수 있다고 생각되었으며, special potency 디스크 및 filter paper spot 시험은 검은 색소 형성 혐기성균에 대해서 간단하고, 편리하게 선별 동정할 수 있었고 PCR 및 API RapID 32 A 키트로 확인 동정을 할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endodon* 25:413-417, 1999.
3. Bogen G., Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endodon J* 32:204-210, 1999.
4. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 6:123-125, 1991.
5. 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.
6. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol* 5:1-10, 1989.
7. Herweijer JA, Loos BG, Neiders ME. Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. *J Endodon* 18:620-624, 1992.
8. Hofstad T. Pathogenicity of anaerobic gram-negative rods: possible mechanisms. *Rev Infect Dis* 6:189-199, 1984.
9. 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.
10. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244-1257, 1998.
11. 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.
12. 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.
13. Nisengard & Newman. Oral microbiology and immunology. second edition. P. 213-216, 1991.
14. 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.
15. 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.

16. 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.
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. 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.
19. 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.
20. Slots J. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J Clin Microbiol* 14:288-294, 1981.
21. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplication with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 20:S304-7, 1995.
22. Slots J, Genco RJ. Direct hemagglutination technique for differentiating *Bacteroides asaccarolyticus* oral strains from nonoral strains. *J Clin Microbiol* 10:371-374, 1979.
23. Steenbergen TJM, Menard C, Tjihof CJ, Mouton C, Graaff J. Comparison of three molecular typing methods in studies of transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *J Med. Micobiol* 14:416-421, 1993.
24. 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.
25. 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.
26. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic bacteriology Manual. 15th. p65-93, 1993.
27. Sundqvist G, Johnsson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endodon* 15:13-18, 1989.
28. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endodon* 18:152-155, 1992.
29. Winkelhoff V, Steenbergen TJM, Graaff J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* 15:145-155, 1998.
30. Winkelhoff AJ, Steenbergen TJM, Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: Its role in endodontal infections. *J Endodon* 18:431-433, 1992.
31. 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.
32. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg* 49:171-174, 1980.