

Identification of Non-*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Bacteria Grown on the Tryptic soy-Serum-Bacitracin-Vancomycin Medium

Eojin Jo, Soon-Nang Park and Joong-Ki Kook*

Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Republic of Korea

(received November 22, 2016; revised December 06, 2016; accepted December 07, 2016)

The aim of this study was to identify the non-*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteria grown on the tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin (TSBV) medium, an *A. actinomycetemcomitans* selective medium. A total of 82 unidentified bacterial isolates from the oral cavities of a Korean population were kindly provide by the Korean Collection for Oral Microbiology. All the clinical isolates were grown on TSBV medium and bacterial DNA purified from each isolate was subjected to PCR with universal primers specific for bacterial 16S rRNA genes (16S rDNAs) sequence. The each bacterial 16S rDNA was amplified by PCR and the nucleotide sequences of it was determined by the dideoxynucleotide chain termination method. They were identified by 16S rDNA sequence comparison method at the specie-level. The data showed that *Neisseria* spp. (42 strains), *Fusobacterium* spp. (10 strains), *Capnocytophaga* spp. (8 strains), *Propionibacterium acnes* (5 strains), *Aggregatibacter arophilus* (4 strains), *Campylobacter* spp. (5 strains), *Veillonella dispar* (3 strains),

Streptococcus sp. (1 strain), *Haemophilus parainfluenzae* (1 strain), *Leptotrichia wadei* (1 strain), *Morococcus* sp./*Neisseria* sp. (1 strain), and *Staphylococcus* sp. (1 strain) were identified. These results could be used to develop a new *A. actinomycetemcomitans*-selective medium which is more effective than the TSBV medium in future studies.

Key words: tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin medium, non-*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, identification, 16S rDNA

서론

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (= *Actinobacillus actinomycetemcomitans* = *Haemophilus actinomycetemcomitans*)는 그람음성 비운동성 간균으로 미세호기성(microaerophilic) 세균으로 알려져 있다[1,2]. *A. actinomycetemcomitans*는 국소 유년형 치주염(localized juvenile periodontitis, 현재 진단명은 국소 급진성 치주염, localized aggressive periodontitis)의 주요한 원인균으로 보고되어[3], 특정 치주질환의 원인균으로 처음 보고된 균종이다. 또한 성인의 재발성 치주염[4] 및 성인의 급성 치주질환[5,6]과의 밀접한 관련성이 있다고 보고되고 있다. *A. actinomycetemcomitans*는 구강질환 외에도 뇌농양[7,8], 폐 감염[9], 심장내막염[10-12], 울혈성 심부전[13] 및 방광염, 요도염과 같은 비구강 감염에서도 검출되었다[14].

*A. actinomycetemcomitans*의 대표적인 외독소는 백혈구와 단핵 세포의 세포자살을 유도해서 세포를 사멸시키

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Republic of Korea.
Tel: +82-62-230-6877, Fax: +82-62-224-3706
E-mail: jkook@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0003-2628-2870

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 leukotoxin[15-17]이 있으며, leukotoxin의 농도는 국소적 급진성 치주염의 정도와 연관이 있는 것으로 보고되었다[18]. 내독소인 지질다당류[19]는 숙주 세포 주기(host-cell cycle)의 진행을 방해하는 이열성 치사 팽창 독소(Cytolethal distending toxin; CDT)를 생산하여 파골세포를 형성함으로써 뼈 흡수를 야기하므로 병원성이 높은 것으로 보고되었다[20,21].

*A. actinomycetemcomitans*의 세균-숙주 상호작용 연구 등의 병인론 연구를 위해서는 사람의 구강에서 분리 및 동정하는 것이 필요하다. 이를 위해 *A. actinomycetemcomitans*를 선택적으로 분리하기 위한 배지로 malachite green-bacitracin (MGB) 배지[22], TSBV (tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin) 배지[23], Dentaid-1 배지(brain-heart infusion agar에 0.5% yeast extract, 0.15% sodium fumarate, 0.1% sodium formate 및 9 µg/ml vancomycin 첨가)[24] 및 *A. actinomycetemcomitans* selective medium (AASM) 배지[25] 등이 개발되어 알려져 있다. 그 중에서도 tryptic soy agar 배지에 horse serum, yeast, bacitracin 그리고 vancomycin이 추가된 TSBV 배지가 *A. actinomycetemcomitans*의 성장과 분리를 위한 선택배지로 두 번째로 보고되었지만[23], TSBV 배지가 새로운 *A. actinomycetemcomitans* 선택배지 개발에 있어서 대조군으로 가장 많이 사용되었다[24,25]. 또한, TSBV 배지에는 말 혈청 성분이 포함되어 있어서 이 배지에서 성장하는 *A. actinomycetemcomitans* 콜로니 중심부에는 특징적인 별모양이 있어 쉽게 구별할 수 있는 장점이 있다[2,25]. 하지만, 본 연구자 팀의 경험에 의하면 TSBV 배지에서 *A. actinomycetemcomitans* 이외의 여러 균종들이 자라나고, *A. actinomycetemcomitans*의 분리율은 매우 적었다. 또한, TSBV 배지에서 *A. actinomycetemcomitans* 이외의 어떤 세균종들이 자라는 지에 대한 연구는 미미하다. 그러므로 본 연구는 TSBV 배지에서 자라나는 *A. actinomycetemcomitans* 이외의 균주들을 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 핵산염기서열 비교분석법을 이용하여 종 수준에서 동정하기 위해 시행하였으며, 그 결과를 토대로 향후 연구에서 최대한 *A. actinomycetemcomitans*만을 분리할 수 있는 새로운 *A. actinomycetemcomitans* 선택 배지 개발의 기초 자료로 이용하고자 한다.

실험 재료 및 방법

세균 및 세균배양

본 연구에 이용된 균주들은 TSBV 배지에서 분리되었지만, 종 수준으로 동정이 되지 않은 것으로 한국구강미생물 자원은행(KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology,

Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다(Table 1). 이들 균주들은 한국인의 치은염 부위, 치주염 부위 그리고 임플란트 주위염의 치은연하 치면세균막을 비롯해 치주질환이 발생하지 않은 사람의 치은연하 치면세균막과 혀 부위에서 분리된 것들 이었다.

모든 균주들은 TSBV (tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin) 한천배지(tryptic soy agar, 1% yeast extract, 10% horse serum, 75 µg/ml bacitracin 및 5 µg/ml vancomycin)에 도말하여 혐기성(N₂, 5% CO₂, 5% H₂) 조건이 제공된 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 24-48시간 동안 배양하여 사용하였다.

16S rDNA 클로닝

본 연구에 사용된 균주들의 종 수준에서 동정은 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 핵산염기서열 비교분석법을 이용하여 시행하였다. 균주들의 16S rDNA를 중합효소연쇄반응 증폭을 위해서 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머들[26]을 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 94°C에서 2분간 전변성(predenaturation)을 실시하고 94°C에서 1분간 변성(denaturation), 55°C에서 30초간 결합(annealing), 72°C에서 1분간 중합(extension) 과정을 30회 반복하여 시행하고, 마지막 중합과정은 72°C에서 10분간 시행하였다. 최종 중합효소연쇄반응 용액 중 2 µl씩을 채취하여 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동을 실시하여 중합효소연쇄반응 산물의 증폭 여부를 확인하였다. 중합효소연쇄반응 증폭물은 AccuPrep® PCR Purification Kit(Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였고, pGEM-T easy vector (Promega Co., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 결합(ligation)시키고, 이를 *E. coli* DH5α에 형질전환 하여 16S rDNA를 함유한 재조합 플라스미드로 형질전환된 균주를 얻었다. 재조합 플라스미드는 AccuPrep® Plasmid Extraction Kit (Bioneer Co.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

16S rDNA 핵산염기서열 결정 및 상동성 검색

재조합 플라스미드에 함유된 각 균주에서 클로닝한 16S rDNA의 핵산염기서열의 결정은 ChDC-GEM-F (5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3')와 ChDC-GEM-R (5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3') 프라이머들을 이용하여 dideoxynucleotide chain termination 법을 이용하여 바이오니아 사(Korea)에 의뢰하여 시행하였다.

각 균주들의 16S rDNA 핵산염기서열들은 EzTaxon 프로그램(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 상동성 검색을 하였고, 그 결과 98.7% 이상의 상동성을 보

Table 1. Bacterial strains used in this study

Patients' No.	Source	Strains
PD 1	Subgingival dental plaque (normal)	KCOM 2171 (ChDC A1)
YB 1	Subgingival dental plaque (gingivitis)	KCOM 2172 (ChDC A2), KCOM 2647 (ChDC PV-A89), KCOM 2659 (ChDC PV-A101)
YB 2	Periimplantitis	KCOM 2668 (ChDC PV-A122)
YB 4	Subgingival dental plaque (gingivitis)	KCOM 2177 (ChDC A7), KCOM 2178 (ChDC A8), KCOM 2179 (ChDC A9), KCOM 2186 (ChDC A16), KCOM 2187 (ChDC A17), KCOM 2188 (ChDC A18) KCOM 2191 (ChDC A21), KCOM 2915 (ChDC A7-2)
	Tongue	KCOM 2651 (ChDC PV-A93), KCOM 2652 (ChDC PV-A94), KCOM 2653 (ChDC PV-A95), KCOM 2660 (ChDC PV-A102), KCOM 2661 (ChDC PV-A103)
YB 5	Tongue	KCOM 2600 (ChDC PV-A42), KCOM 2601 (ChDC PV-A43), KCOM 2602 (ChDC PV-A44)
YB 10	Subgingival dental plaque (gingivitis)	KCOM 2663 (ChDC PV-A105), KCOM 2664 (ChDC PV-A106)
YB 13	Tongue	KCOM 2604 (ChDC PV-A46), KCOM 2605 (ChDC PV-A47)
YB 14	Tongue	KCOM 2606 (ChDC PV-A48), KCOM 2607 (ChDC PV-A49) KCOM 2609 (ChDC PV-A51), KCOM 2610 (ChDC PV-A52), KCOM 2639 (ChDC PV-A81), KCOM 2655 (ChDC PV-A97), KCOM 2656 (ChDC PV-A98)
YB 15	Tongue	KCOM 2611 (ChDC PV-A53), KCOM 2612 (ChDC PV-A54)
YB 16	Subgingival plaque (gingivitis)	KCOM 2618 (ChDC PV-A60)
YB 17	Tongue	KCOM 2620 (ChDC PV-A62)
YB 18	Tongue	KCOM 2566 (ChDC PV-A8), KCOM 2642 (ChDC PV-A84), KCOM 2657 (ChDC PV-A99)
YB 19	Subgingival dental plaque (gingivitis)	KCOM 2623 (ChDC PV-A65), KCOM 2624 (ChDC PV-A66), KCOM 2625 (ChDC PV-A67)
	Tongue	KCOM 2567 (ChDC PV-A9), KCOM 2568 (ChDC PV-A10) KCOM 2569 (ChDC PV-A11), KCOM 2570 (ChDC PV-A12) KCOM 2571 (ChDC PV-A13), KCOM 2626 (ChDC PV-A68), KCOM 2627 (ChDC PV-A69), KCOM 2628 (ChDC PV-A70) KCOM 2572 (ChDC PV-A14), KCOM 2573 (ChDC PV-A15), KCOM 2574 (ChDC PV-A16), KCOM 2575 (ChDC PV-A17), KCOM 2576 (ChDC PV-A18), KCOM 2577 (ChDC PV-A19), KCOM 2578 (ChDC PV-A20), KCOM 2579 (ChDC PV-A21), KCOM 2580 (ChDC PV-A22), KCOM 2581 (ChDC PV-A23), KCOM 2582 (ChDC PV-A24), KCOM 2583 (ChDC PV-A25), KCOM 2584 (ChDC PV-A26), KCOM 2585 (ChDC PV-A27), KCOM 2586 (ChDC PV-A28)
YB 20	Subgingival plaque (gingivitis)	KCOM 2587 (ChDC PV-A29), KCOM 2588 (ChDC PV-A30), KCOM 2589 (ChDC PV-A31)
	Subgingival dental plaque (gingivitis)	KCOM 2629 (ChDC PV-A71), KCOM 2645 (ChDC PV-A87) KCOM 2590 (ChDC PV-A32), KCOM 2591 (ChDC PV-A33), KCOM 2594 (ChDC PV-A36), KCOM 2595 (ChDC PV-A37), KCOM 2596 (ChDC PV-A38), KCOM 2597 (ChDC PV-A39), KCOM 2598 (ChDC PV-A40), KCOM 2630 (ChDC PV-A72) KCOM 2646 (ChDC PV-A88)
YB 21	Subgingival dental plaque (periodontitis)	KCOM 2635 (ChDC PV-A77), KCOM 2636 (ChDC PV-A78), KCOM 2637 (ChDC PV-A79)
	Tongue	
YB 22	Subgingival dental plaque (gingivitis)	
	Tongue	

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

이는 표준균주와 같은 종으로 판정하였다. 각 균주의 16S rDNA 핵산염기서열과 98.7% 이상의 상동성을 보이는 세균종이 2개 이상인 경우 종-수준으로의 판정은 보류하였다. 16S rDNA 핵산염기서열과 상동성이 기존의 세균 종들의 표준균주의 것과 98.0% 미만인 균주들은 새로운 균종이라 판정하였다.

결 과

본 연구에서 사용된 균주들의 16S rDNA 핵산염기서열을 결정하여 EzTaxon 프로그램(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 상동성 검색한 결과 가장 높거나, 97% 이상의 상동성을 보이는 세균 종의 표준균주와의 상동성을 Table 2에 정리하였다. 본 연구에서 사용된 균주들의 16S rDNA 핵산염기서열과 98.7% 이상의 상동성을 보이는 표준

균주가 2개 이상일 경우 종-수준으로의 동정은 보류하고, 속(genus)-수준으로만 동정을 하였다(Table 3). 그 결과 13개 세균 종(*Aggregatibacter aphrophilus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Capnocytophaga ochracea*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Leptotrichia wadei*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella dispar*)과 종-수준으로 동정이 안 된 4-5개 속(*Capnocytophaga* sp., *Neisseria* sp., *Neisseria* sp./*Morococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.)에 속하는 균주들이 TSBV 배지에서 자라는 것으로 확인하였다.

기존의 표준균주들과 16S rDNA 핵산염기서열 상동성이 98.0% 미만인 균주들 중에는 *Capnocytophaga* spp. 7 균주가 존재하였다(Table 3).

Table 2. Identification of clinical isolates by nucleotide sequence of 16S rDNA

KCOM No.	Genus or species match [GenBank Accession No.]	Similarity (%)
KCOM 2171	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ATCC 33389 ^T [AEWB01000034]	98.97
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.7
KCOM 2172	<i>Nesseeria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.66
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.96
KCOM 2647	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.63
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.7
KCOM 2659	<i>Nesseeria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.66
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.59
KCOM 2668	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T	96.72
	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> NCTC 8618 ^T [CP009913]	99.8
KCOM 2177	<i>Streptococcus vestibularis</i> ATCC49124 ^T [GL831116]	99.66
	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC19258 ^T [AY188354]	99.52
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.85
KCOM 2178	<i>Neisseria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.79
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.73
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.85
KCOM 2179	<i>Neisseria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.79
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.73
	<i>Morococcus cerebrosus</i> CIP 81.93 ^T [JUFZ01000072]	99.79
KCOM 2186	<i>Neisseria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.66
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.66
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301] [AJ239301]	99.63
KCOM 2187	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301] [AJ239301]	99.7
	<i>Neisseria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.66
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.59
KCOM 2188	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301] [AJ239301]	99.78
	<i>Neisseria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.73
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.66
KCOM 2191	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	97.57

Table 2. (continued in previous page)

KCOM No.	Genus or species match [GenBank Accession No.]	Similarity (%)
KCOM 2915	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T [L37603]	99.86
	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 ^T [AF041361]	99.36
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.78
KCOM 2651	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.7
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.59
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.11
	<i>Veillonella dispar</i> ATCC 17748 ^T [ACIK02000021]	99.8
KCOM 2652	<i>Veillonella parvula</i> DSM 2008 ^T [CP001820]	98.99
	<i>Veillonella tobetsuensis</i> B16 ^T [AB679109]	98.92
	<i>Veillonella denticariosa</i> RBV106 ^T [EF185167]	98.92
KCOM 2653	<i>Fusobacterium periodonticum</i> ATCC 33693 ^T [ACJY01000002]	99.93
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.63
KCOM 2660	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.56
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.45
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	98.97
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.7
KCOM 2661	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.63
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.52
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.04
KCOM 2600	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.85
	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	98.82
KCOM 2601	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.93
KCOM 2602	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.85
KCOM 2663	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.85
KCOM 2664	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2604	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.63
KCOM 2605	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.78
	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.7
KCOM 2606	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.52
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.11
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.63
	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.56
KCOM 2607	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.45
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	98.97
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.56
KCOM 2610	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2639	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.56
KCOM 2655	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2656	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2611	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.63
KCOM 2612	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2618	<i>Veillonella dispar</i> ATCC 17748 ^T [ACIK02000021]	99.8
KCOM 2620	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.93
KCOM 2566	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	98
	<i>Neisseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.85
	<i>Neisseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.63
KCOM 2642	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.24
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	98.97

Table 2. (continued in previous page)

KCOM No.	Genus or species match [GenBank Accession No.]	Similarity (%)
KCOM 2657	<i>Nesseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.93
	<i>Nesseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.7
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.24
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.04
KCOM 2623	<i>Nesseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.7
	<i>Nesseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.63
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.52
KCOM 2624	<i>Nesseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.7
	<i>Nesseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.48
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.03
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	98.82
KCOM 2625	<i>Nesseria mucosa</i> M5 ^T [AJ239279]	99.93
	<i>Nesseria perflava</i> U15 ^T [AJ239295]	99.7
	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 ^T [L06168]	99.31
	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.04
KCOM 2567	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ATCC 33389 ^T [AEWB01000034]	99.79
KCOM 2568	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ATCC 33389 ^T [AEWB01000034]	100
KCOM 2569	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236 ^T [DQ174168]	99.55
KCOM 2570	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ATCC 33389 ^T [AEWB01000034]	99.93
KCOM 2571	<i>Campylobacter rectus</i> ATCC 33238 ^T [L04317]	99.57
KCOM 2626	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2627	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.78
KCOM 2628	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.93
	<i>Nesseeria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.79
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.73
KCOM 2572	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.32
KCOM 2573	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.47
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99.93
KCOM 2574	<i>Nesseeria macacae</i> ATCC 33926 ^T [AFQE01000146]	99.86
	<i>Nesseeria sicca</i> ATCC 29256 ^T [ACKO02000016]	99.79
KCOM 2575	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	97.5
KCOM 2576	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.16
KCOM 2577	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	98.82
KCOM 2578	<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897 ^T [AWZZ01000008]	99.93
KCOM 2579	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236 ^T [DQ174168]	99.55
KCOM 2580	<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897 ^T [AWZZ01000008]	99.79
KCOM 2581	<i>Campylobacter rectus</i> ATCC 33238 ^T [L04317]	99
KCOM 2582	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.39
KCOM 2583	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	97.61
KCOM 2584	<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897 ^T [AWZZ01000008]	99.86
KCOM 2585	<i>Leptotrichia wadei</i> LB16 ^T [AY029802]	99.09
KCOM 2586	<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897 ^T [AWZZ01000008]	99.86
KCOM 2587	<i>Campylobacter showae</i> CCUG 30254 ^T [DQ174155]	99.78
KCOM 2588	<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897 ^T [AWZZ01000008]	99.79
KCOM 2589	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	98.12
KCOM 2629	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC 33392 ^T [GL872342]	99.25

Table 2. (continued in previous page)

KCOM No.	Genus or species match [GenBank Accession No.]	Similarity (%)
KCOM 2645	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.56
KCOM 2590	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	97.22
KCOM 2591	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T [AABF01000026]	98.67
KCOM 2594	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.47
KCOM 2595	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 ^T [ABTH01000001]	97.15
KCOM 2596	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.47
KCOM 2597	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.24
KCOM 2598	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T [X55402]	99.24
KCOM 2630	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.63
KCOM 2646	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.63
KCOM 2635	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7
KCOM 2636	<i>Veillonella dispar</i> ATCC 17748 ^T [ACIK02000021]	99.87
KCOM 2637	<i>Neisseria subflava</i> U37 ^T [AJ239291]	99.7

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

Table 3. The summary of the identification of the bacteria which were isolated from TSBV medium in this study

Genus and species	No.	strains
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	4	KCOM 2171, KCOM 2567, KCOM 2568, KCOM 2570
<i>Campylobacter gracilis</i>	2	KCOM 2569, KCOM 2579
<i>Campylobacter rectus</i>	2	KCOM 2571, KCOM 2581
<i>Campylobacter showae</i>	1	KCOM 2587
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1	KCOM 2577
<i>Capnocytophaga</i> sp.	7	KCOM 2191*, KCOM 2668*, KCOM 2575*, KCOM 2583*, KCOM 2589*, KCOM 2590*, KCOM 2595*
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	9	KCOM 2576, KCOM 2597, KCOM 2598, KCOM 2572, KCOM 2573, KCOM 2582, KCOM 2591, KCOM 2594, KCOM 2596
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1	KCOM 2653
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	KCOM 2629
<i>Leptotrichia wadei</i>	1	KCOM 2585
<i>Neisseria flava</i>	1	KCOM 2663
<i>Neisseria</i> sp.	19	KCOM 2178, KCOM 2179, KCOM 2187, KCOM 2188, KCOM 2651, KCOM 2660, KCOM 2661, KCOM 2606, KCOM 2607, KCOM 2566, KCOM 2642, KCOM 2657, KCOM 2623, KCOM 2624, KCOM 2625, KCOM 2628, KCOM 2574, KCOM 2172, KCOM 2659
<i>Neisseria</i> sp./ <i>Morococcus</i> sp.	1	KCOM 2186
<i>Neisseria subflava</i>	22	KCOM 2600, KCOM 2601, KCOM 2602, KCOM 2664, KCOM 2604, KCOM 2605, KCOM 2609, KCOM 2610, KCOM 2639, KCOM 2655, KCOM 2656, KCOM 2611, KCOM 2612, KCOM 2620, KCOM 2626, KCOM 2627, KCOM 2645, KCOM 2630, KCOM 2646, KCOM 2635, KCOM 2637, KCOM 2647
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	KCOM 2578, KCOM 2580, KCOM 2584, KCOM 2586, KCOM 2588
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	KCOM 2915
<i>Streptococcus</i> sp.	1	KCOM 2177
<i>Veillonella dispar</i>	3	KCOM 2652, KCOM 2618, KCOM 2636
Total	82	

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

*, Candidate of new species.

Table 4. Summary of the bacterial strains of same species isolated from same patients

Patients' No.	Species (strains)
YB 1	<i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2172, KCOM 2659)
YB 4	<i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2178, KCOM 2179, KCOM 2187, KCOM 2188, KCOM 2651, KCOM 2660, KCOM 2661)
YB 5	<i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2600, KCOM 2601, KCOM 2602)
YB 13	<i>Neisseria subflava</i> (KCOM 2604, KCOM 2605)
YB 14	<i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2606, KCOM 2607)
YB 15	<i>Neisseria subflava</i> (KCOM 2609, KCOM 2610, KCOM 2639, KCOM 2655, KCOM 2656)
YB 16	<i>Neisseria subflava</i> (KCOM 2611, KCOM 2612)
YB 19	<i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2566, KCOM 2642, KCOM 2657, KCOM 2623, KCOM 2624, KCOM 2625)
YB 20	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> (KCOM 2567, KCOM 2568, KCOM 2570) <i>Neisseria</i> sp. (KCOM 2626, KCOM 2627, KCOM 2628)
YB 21	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (KCOM 2572, KCOM 2573, KCOM 2582, KCOM 2576) <i>Capnocytophaga</i> sp. (KCOM 2575, KCOM 2577, KCOM 2583, KCOM 2589) <i>Propionibacterium acnes</i> (KCOM 2578, KCOM 2580, KCOM 2584, KCOM 2586, KCOM 2588) <i>Capnocytophaga</i> sp. (KCOM 2590, KCOM 2595)
YB 22	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (KCOM 2591, KCOM 2594, KCOM 2596, KCOM 2597, KCOM 2598) <i>Neisseria subflava</i> (KCOM 2630, KCOM 2646, KCOM 2635, KCOM 2637)

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

같은 환자에서 분리된 세균 중 같은 종에 속하는 균주들은 Table 4에 정리하였다. 그 결과 11명의 환자에서 분리된 균주들 중에는 같은 종에 속하는 균주들이 2개 이상 존재하였다. 이들 균주들은 대부분 *Neisseria* spp.에 속하였다.

고찰

본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans* 선택배지인 TSBV 배지를 이용하여 한국인의 치면세균막 및 타액에서 분리된 82 균주를 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법에 의해 중수준으로 동정한 결과 이들 균주들은 13개 종 및 종 수준에서 동정이 되지 않은 4-5개 속에 속하는 것임을 알 수 있었다. 본 연구에서 사용된 82 균주들 중 *Capnocytophaga* spp., *Neisseria* spp., *Fusobacterium* spp. 및 *A. aphrophilus*들이 각각 8, 42, 10 및 4 균주들이었는데, 이러한 결과는 기존의 TSBV 배지에서 자라는 *A. actinomycetemcomitans* 이외의 세균 종에는 *Capnocytophaga* spp., *Neisseria* spp., 일부 *Aggregatibacter* spp. (*A. aphrophilus* 및 *A. segnis*)가 있다는 보고[23,24]와 일치한 것이었다. 선택배지에는 일반적으로 표적 세균 종이 잘 자랄 수 있도록 하기 위한 기본 배지 성분과 다른 세균 종의 성장을 억제하는 성분으로 구성되어 있다. 즉, TSBV 배지에는 *A. actinomycetemcomitans* 성장을 위한 기본 배지인 tryptic soy agar와 그람 연쇄구균, 포도구균 및 actinomyces 등의 양성 세균의 성장을 억제시키기 위해 bacitracin과 vancomycin

이 첨가되어 있고, hemin을 성장에 필요로 하는 *Hemophilus* spp.의 성장을 억제하기 위해 양 피(sheep blood)를 사용하는 대신 말 혈청(horse serum)을 사용하였다[23]. 하지만, 본 연구 결과 연쇄구균 및 포도구균들이 각각 1 균주씩 동정되었다. 이러한 결과는 연쇄구균 및 포도구균 균주들은 bacitracin과 vancomycin에 대한 내성을 갖는 균주들이기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 본 연구에서 동정된 *Haemophilus parainfluenzae* 종은 일반적으로 hemin이 성장에 필수적이지 않기 때문에 본 연구에서 1 균주가 동정된 것이라 생각된다. 본 연구에서 동정된 균주들은 향후 연구에서 효율적인 *A. actinomycetemcomitans* 선택배지 개발에 사용 가능할 것이라 생각된다.

본 연구 결과 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법에 의해서 중-수준으로 동정이 되지 않은 19개의 *Neisseria* spp.에 속하는 균주들과 7개의 *Capnocytophaga* spp. 균주들이 분리되었다. 이들 중 7개의 *Capnocytophaga* spp. 균주들은 기존의 표준균주들의 16S rDNA 핵산염기서열과 98.0% 미만의 상동성을 보여 새로운 균종이라 생각된다. 세균을 중-수준으로 동정하는 황금 기준(golden standard)은 16S rDNA 핵산염기서열 결정법과 DNA-DNA hybridization 법으로 알려져 있다[27]. 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성을 기준으로 중-수준으로 구별할 때, 사용하는 가장 높은 상동성은 연구 결과에 따라 97% 또는 98.7-99%까지 다양하게 제시되었다[27,28]. 그러므로 본 연구에는 이들 기준 중 98.7%를 선택하였다. 하지만, 세균 종에 따라서

는 16S rDNA 핵산염기서열이 서로 99% 이상이 경우가 많기 때문에 16S rDNA 핵산염기서열 비교 결정법으로는 완벽한 세균 종-수준에서의 동정이라고 할 수는 없으므로 DNA-DNA hybridization 법을 시행해야 하는 경우가 있다 [29]. 하지만, DNA-DNA hybridization 법은 연구자에 따라 매우 다양한 값을 얻을 수 있고, 편차가 크다는 단점이 있다. 최근 차세대 핵산염기서열 결정법의 눈부신 발전에 의해, 까다로운 DNA-DNA hybridization 법을 대체할 수 있는 세균 지능 ANI (average nucleotide identity) 법이 소개되었다[30,31]. 이들의 연구에 의하면, 두 세균을 다른 세균 종으로 분류할 수 있는 DNA-DNA hybridization 법의 기준이 70%에 해당하는 것이, ANI 분석에 의한 두 균주 간의 상동성이 94% 또는 95-96%라고 보고하였다[30,31]. 아직까지는 모든 세균 종들에 대한 ANI 분석에 의한 데이터가 없고, DNA-DNA hybridization 법에 비해 경제적인 측면에서 단점은 있지만, 가까운 장래에는 DNA-DNA hybridization 법을 대신하여 세균 종-수준에서의 분류에 황금기준이 될 것이라 생각된다. 향후 연구에서 본 연구에서 신종이라 생각되는 균주들의 지능 핵산염기서열 결정 및 여러 분류학적 방법을 실시하여 신종 유무를 확인하는 실험을 진행하여야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 균주들은 혐기성 조건에서 분리된 균주들이었다. 이러한 이유로 본 연구에서도 혐기성 조건에서 배양을 하여 본 실험에 사용하였다. 하지만, TSBV 배지를 이용하여 *A. actinomycetemcomitans* 균주를 배양할 경우 혐기성 조건보다는 5% CO₂가 공급되는 공기 상태에서 더 잘 자란다는 보고가 있다[32]. 그러므로 향후 연구에서 *A. actinomycetemcomitans* 균주를 선택적으로 배양하기 위해 TSBV 배지를 사용할 경우에는 5% CO₂가 공급되는 공기 상태에서 배양을 하고자 한다.

최근의 연구에 의하면, TSBV 배지를 이용하는 것보다 Dentaid-1 배지를 이용할 경우 더 많은 수의 *A. actinomycetemcomitans*를 분리할 수 있으며, 배지를 만드는 가격도 더 저렴하다는 것이 보고되었다[33]. 그러므로 현재까지 개발된 *A. actinomycetemcomitans* 선택배지 중에서는 Dentaid-1 배지를 사용하는 것을 권장할 수 있다.

이상의 연구 결과를 종합하면, TSBV 배지에는 *A. actinomycetemcomitans* 이외에도 *A. aphrophilus*, *Campylobacter* sp., *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium* sp., *Neisseria* sp., *P. acnes*, *H. parainfluenzae*, *L. wadei*, *V. dispar* 및 bacitracin 과 vancomycin에 내성을 갖는 연쇄구균과 포도구균이 자랄 수 있음을 알 수 있었다. 향후 연구에서 본 연구 결과에서 얻은 균주들을 이용하면, 효율성이 높은 *A. actinomycetemcomitans* 선택배지 개발이 용이할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2013M3A9B8013860).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

- Potts TV, Zambon JJ, Genco RJ. Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1985;35:337-341.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? Periodontol 2000. 2010;54:78-105. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x.
- Mandell RL. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect Immun. 1984;45:778-780.
- Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. Infect Immun. 1983;40:205-212.
- Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Genco RJ, Hanuman FDE. Immune responses to oral micro organisms: Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *A. actinomycetemcomitans*. Clin Experimental Immunol. 1982;47:43-52.
- Eisenmann AC, Eisenmann R, Sousa O, Slots J. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. J Periodontol. 1983;54:712-713.
- Rahamat Langendoen JC, Van Vonderen MG, Engstrom LJ, Manson WL, Van Winkelhoff AJ, Mooi-Kokenberg EA. Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. J Clin Periodont. 2011;38:702-706. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01737.x.
- Ahamed SP, Lath S, DeGabriele GJ, Mathew VT. Cerebral abscess caused by *Aggregatibacter aphrophilus*. Neurosciences (Riyadh). 2010;15:40-42.
- Meyers BR, Bottone E, Hirschman SZ, Schneiersson SS, Gershengorn K. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Am J Clin Pathol. 1971;56:204-211.
- Pierce CS, Bartholomew WR, Amsterdam D, Neter E, Zambon JJ. Endocarditis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- serotype c and patient immune response. *J Infect Dis.* 1984;149:479.
11. Grace CJ, Levitz RE, Katz-Pollak H, Brettman LR. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* prosthetic valve endocarditis. *Rev Infect Dis.* 1988;10:922-929.
 12. Kristinsson KG, Thorgeirsson G, Holbrook WP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and endocarditis. *J Infect Dis.* 1988;157:599.
 13. van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000. 1999;20:122-135.
 14. Townsend TR, Gillenwater JY. Urinary tract infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *JAMA.* 1969;210:558.
 15. Taichman, N. S., and J. M. A. Wilton. Leukotoxicity of an extract from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* for human gingival polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1981;5:1-12.
 16. Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol.* 2002;84:337-356. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00467-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00467-9).
 17. Johansson A, Kalfas S. Oral Health Care - Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions. Zagreb:InTech. 2012;165-192. doi:
 18. Dirienzo JM, McKay TL. Identification and characterization of genetic cluster groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity. *J Clin Microbiol.* 1994;32:75-81.
 19. Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Martinez Argueta JG, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49:28-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00164.x>.
 20. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone.* 2003;33:28-37. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(03\)00086-3](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00086-3).
 21. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol.* 2007;27:466-478. doi: 10.1159/000106484
 22. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1981;52:593-598.
 23. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1982;15:606-609.
 24. Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:509-513. doi: 10.1128/JCM.39.2.509-513.2001.
 25. Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, Hirasawa M. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2008;43:544-548. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01074.x.
 26. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E and Goodfellow M, editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* New York: John Wiley and Sons; 1991. p. 115-175.
 27. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1994;44:846-849.
 28. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:249-266. doi: 10.1099/ijs.0.016949-0.
 29. Cho E, Park SN, Lim YK, Shin Y, Paek J, Hwang CH, Chang YH, Kook JK. *Fusobacterium hwasookii* sp. nov., Isolated from a Human Periodontitis Lesion. *Curr Microbiol.* 2015;70:169-175. doi: 10.1007/s00284-014-0692-7.
 30. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:81-91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0.
 31. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:19126-19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
 32. Martijn van Steenberg T, van Winkelhoff AJ, van der Mispel L, van der Velden U, Abbas F, de Graaff J. Comparison of two selective media for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1986;24:636-638.
 33. Rurenga P, Raangs E, Singadji Z, Wekema-Mulder G, Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Evaluation of three selective media for isolation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2013;48:549-552. doi: 10.1111/jre.12037.