

## Microplate를 이용한 포도당비발효 그람음성간균의 동정법

어 영, 조현미, 장인호, 윤갑준, 서동민\*

연세대학교 원주의과대학 임상병리학교실, 전산실\*

### Identification System of Nonfermentative Gram Negative Bacilli Using Microplate

Young Uh, Hyun Mi Cho, In Ho Jang, Kap Jun Yoon, and Dong Min Seo\*

Departments of Clinical Pathology and Medical Information Development\*,  
Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

**Background:** The accurate and rapid identification (ID) of nonfermentative gram-negative bacilli (NFB) is essential for diagnostic and therapeutic purposes and for epidemiologic studies of hospital infections. Commercial identification systems of NFB are easy to use but too expensive. The aim of the study was to develop a simple system for the identification of NFB species which are frequently isolated from clinical specimens.

**Methods:** Eighteen biochemical tests used in NFB microplate ID system were pyocyanin in Tech media; pyoverdine in Flo media; glucose fermentation, acid formation from glucose, maltose, lactose, sucrose, and mannitol in oxidation-fermentation media; Nitrate and nitrite reduction in nitrate media; ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, and arginine dihydrolase in Moeller decarboxylase media; acetamide, urease, citrate, 42°C growth, and oxidase test. For the establishment of NFB's biochemical data in microplate ID system, 175 consecutive isolates of NFB from clinical specimens isolated during the period of April 2000 were simultaneously tested by microplate method and API 32GN.

**Results:** Ninety-two percent of clinical isolates of NFB were identified to the species level by NFB microplate ID system.

**Conclusions:** The NFB microplate ID system is simple to use, rapid and economical. Further modification are needed to improve the accuracy and identification rate of NFB isolates.

(Korean J Clin Microbiol 2002;5(1):26-34)

**Key words:** Nonfermentative gram-negative bacilli, Microplate, Identification

## 서 론

포도당비발효 그람음성간균(NFB, nonfermentative gram-negative bacilli)은 임상검체에서 분리되는 그람음성

간균의 16%를 차지하며, 최근에는 병원감염의 주요 원인 균일 뿐만 아니라 다약제 내성(multi-drug resistance)을 갖고 있는 경우가 많고 균종별로 약제 내성 양상이 다르다 [1-5]. 그러므로 임상검체에서 분리되는 NFB의 신속하고 정확한 동정은 환자의 치료 방침을 결정하는데 도움을 줄 수 있으며, 병원감염의 역학적 연구에도 이용될 수 있다. NFB의 동정 방법으로는 생화학 성상을 이용하거나 분자생물학적 또는 세포지방산 분석법 등이 있다. 분자생물학적 방법은 정확한 동정 결과를 얻을 수 있다고 하지만 특수 장비와 고가의 시약이 필요하므로 아직까지는 연구목적으로 사용하는 측면이 강하며, 생화학 성상을

\* 이 연구는 2000년도 연세대학교 원주의과대학 교수연구비로 이루어 졌음.

접수번호 : CM 5-01-07

교신저자 : 어 영

(220-701)강원도 원주시 일산동 162

원주기독병원 임상병리과

Tel : 033) 741-1593 Fax : 033) 731-0506

E-mail : u931018@wonju.yonsei.ac.kr

이용한 동정법은 전통적 방법과 상품화된 제품을 이용한 방법이 있다. NFB는 다양한 종류의 그람음성간균의 집합으로서 다른 균종에 비해 생화학 활성이 약하므로 균종간의 감별동정이 매우 어렵고, 배양시간에 따라 생화학 시험 결과의 차이가 많기 때문에 정확한 동정을 위해서는 20개이상의 생화학 시험이 필요하다. 그러므로 NFB 분리수가 많고 다양한 균종이 분리되는 병원에서는 상품화된 동정법을 주로 사용한다[1,2]. 그러나, 상품화된 동정법은 가격이 비싼 단점이 있으며 일부 NFB 균종에서는 부정확한 결과를 보일 때도 있다[1,2]. 전통적인 방법을 이용한 NFB 동정은 생화학시험 종목수가 많기 때문에 일반 검사실에서 통상적으로 사용하기에는 어려움이 있으나, 임상검체에서 분리되는 NFB는 10종류의 균종이 전체 분리주의 90% 이상을 차지하며, NFB 중 가장 흔히 분리되는 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* 등 몇가지 균종은 독특한 생화학 특징이 있어서 간단한 시험으로 비교적 정확하게 동정할 수 있다. 그러므로 병원에 따라서는 몇가지 시험으로 특징적인 NFB 균종을 동정하거나 비슷한 세균의 무리로 구별한 후 필요한 시험을 추가하는 이분법적인 방법을 사용하기도 한다[1-5]. 그러나, 이러한 간략 동정법은 균종별로 특징적인 성상을 보이지 않을 경우에는 결과보고가 지연되는 문제점이 있다.

이에 본 연구에서는 임상검체에서 분리되는 대부분의 NFB 균종을 동정할 수 있는 생화학 시험으로 구성된 microplate 법을 고안한 후 그 유용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배지 및 지시제의 제조

NFB 동정용 microplate 법은 microplate에서 시험하는 pyocyanin과 pyoverdin의 색소시험, glucose 발효와 산화 시험, maltose, lactose, sucrose 및 mannitol 산화(분해) 시험, nitrate 및 nitrite 환원 시험, ornithine decarboxylase (ORD로 약함), lysine decarboxylase (LDC로 약함), arginine dihydrolase (ARD로 약함) 시험, acetamide deamination 시험, urease 시험, citrate 이용능과 42℃ 성장 유무 및 oxidase 시험의 18가지로 구성하였다.

Pyocyanin 색소시험은 Tech 배지(BBL, Cockeysville, Md., USA), pyoverdin 색소시험은 Flo 배지(BBL)를 이용하였고 두 배지에는 glycerol을 첨가하였다. Glucose 발효, glucose 산화 및 maltose, lactose, sucrose 및 mannitol 분해 시험 배지는 OF basal medium (BBL)에 당 용액을 syringe filter로 여과한 후 최종 당농도가 1%가 되도록 제조하였다. Nitrate 및 nitrite 환원시험은 Nitrate broth 배지(Difco, Detroit, Mich. USA)에 한천(BBL)를 첨가한 배지를 사용하였다. ORD, LDC 및 ARD 시험은 Moeller decarboxylase

broth base (BBL)에 한천과 L-ornithine (Merck Co., NJ, USA), L-lysine (Sigma, St. Louis, Mo., USA), L-arginine (Sigma)이 0.5% 농도가 되도록 제조한 배지를 이용하였고, 기질이 첨가되지 않은 Moeller decarboxylase broth base 배지를 탈탄산화 시험의 대조배지로 사용하였다. Acetamide deamination 시험은 배지 1 L에 acetamide (Sigma) 10 g, 한천 15 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.39 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.73 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, phenol red 0.012 g을 첨가한 후 배지의 pH를 6.9로 맞추었다. Urease 시험은 Urea agar base 배지(BBL)로 만든 urea 용액을 syringe filter로 여과하여 한천배지(BBL)에 첨가한 배지를 사용하였고, citrate 시험은 Simmons citrate agar 배지(BBL)를 이용하였다. 각 배지는 제조회사의 권장방법대로 제조한 후 pH를 보정하여 8개의 microplate well이 한 줄씩 날개로 구성된 96 well microplate (Nunc, Denmark)에 250 µL씩 분주한 뒤 테이프로 밀봉한 다음 비닐 주머니에 넣어 4℃ 냉장고에 보관하였다. 42℃ 성장 시험은 Mueller Hinton 배지를 이용하였고 oxidase 시험은 Kovacs 시약을 이용하였다.

Nitrate 시험을 위한 지시제는 0.6%의 dimethyl- $\alpha$ -naphthylamine 용액과 0.8% sulfanilic acid 용액 및 zinc dust (Sigma)를 사용하였다.

### 2. 접종과 판독방법

평판배지에 그람음성간균이 순수 분리될 경우에는 4지 접종 칩을 이용하여 microwell에 접종하였으며, 평판배지에 집락이 섞여 있을 경우에는 일반적인 접종 칩을 이용하여 접종한 후 glucose 발효 시험 배지, 탈탄산화 시험의 대조배지, ORD, LDC, ARD 배지 및 urease 시험 배지에는 oil을 두세 방울 떨어뜨린 다음 30℃ 호기성 배양기에서 2일동안 배양하면서 매일 판독하였다. Microplate 밑에는 습도를 유지하기 위하여 물을 적신 거즈를 놓았다.

Microplate 배지의 pyocyanin과 pyoverdin 시험은 색소를 형성하면 양성, 무색이면 음성으로 판독하였고 OF 배지에서의 당분해시험은 노란색 또는 황색이면 양성, 청색이면 음성으로 판독하였다. Nitrate 및 nitrite 환원 시험은 nitrate 지시제인 0.6% dimethyl- $\alpha$ -naphthylamine 용액과 0.8% sulfanilic acid 용액을 동시에 한방울씩 넣고 5분내에 적색을 보이면 nitrate 환원 양성, nitrite 환원 음성으로 판독하고, 색변화가 없으면 zinc 알갱이 5-10개를 넣고 5분내에 색변화가 있는지를 관찰하여 적색으로 변하면 배지내에 nitrate가 남아있음을 의미하므로 nitrate 및 nitrite 환원 음성으로 판독하였으며, 색변화가 없으면 nitrate 및 nitrite 환원 양성으로 판독하였다. ORD, LDC 및 ARD 시험은 탈탄산 대조 배지와 비교하여 자색이면 양성, 노란색이나 황색이면 음성으로 판독하였다. Acetamide와 urease 시험은 적색을 띄면 양성, 무색이면 음성으로 판독하였고, citrate 시험은 청색이면 양성, 녹색이면 음성으로 판독하였다. 42℃ 성장시험은 Mueller Hinton 한천배지에

서 충분한 증식이 있을 때 양성으로 판독하였으며 oxidase 시험은 Kovac 시약을 떨균 후 15초내에 자색이 되면 양성으로 판독하였다. Microplate 동정법의 정도관리를 위하여 배지 및 시약을 새로 제조할 때마다 ATCC 25608 *Burkholderia cepacia*와 ATCC 27853 *P. aeruginosa* 표준균주로 시험하였다.

### 3. Microplate 동정법의 구축

#### A. 1차 구축

2000년 4월에 임상검체에서 분리된 포도당비발효 그람음성간균 175주를 대상으로 microplate 법과 상품화된 동정제품인 API 32 GN (bioMérieux sa, Marcy-l'Étoile, France)을 동시에 시험한 후 API 32 GN의 균동정 정확률이

90%이상인 균종명을 기준으로 microplate법의 1일배양 및 2일배양후의 균종별 생화학 시험 양성률을 구하였다 (Table 1). Microplate법의 NFB 동정 프로그램은 18가지의 전통적 생화학시험 결과를 양성은 +, 음성은 -로 입력한 후 동정확인란을 누르면 균종명이 확인되도록 화면을 구성하였고, 이를 프로그램으로 처리하기 위하여 양성결과는 1, 음성은 0으로 전환한 후 시험순서대로 3개씩 묶어 0-7까지의 1자리 숫자로 바꾸어 모두 6자리의 숫자로 된 균종별 동정코드목록(bionumber code book)을 작성하였다. Microplate 법에 의한 NFB의 균종별 동정코드목록은 각 균종의 생화학 반응 양성률과 음성률이 90%이상이면 각각 1과 0으로 정하고 11-89%사이의 양성 반응은 1과 0을 각각 부여하였다. 또한, 균종별로 중복되는 동정코드는 제외하였다.

Table 1. Biochemical reactions of NFB isolates during the period of April 2000

Biochemical Tests	% positivity of biochemical tests											
	PAE (82)	PPU (5)	PFL (1)	BCE (20)	CAC (1)	SMA (17)	ABA (42)	AJO (1)	MLA (2)	AXX (1)	CIN (2)	MY- (1)
PCY	34[43]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PVE	34[42]	80	100	0	0	0	0	0	0[50]	0	0	0
GLF	2[28]	40[80]	0	85[90]	0	0[6]	12[57]	0	0	0	0	0
GLO	74[99]	100	0[100]	100	0	6[71]	100	0	0[50]	0[100]	0[100]	0
MAL	0	0	0	55[95]	0	88[100]	0	0	50	0	0	0
LAC	0	0	0	75[95]	0	0[12]	19[74]	0	0[50]	0	0	0
SUC	0	0	0	90	0	0[6]	0	0	0	0	0	0
MAN	13[45]	0	0	10[20]	0	0[6]	0	0	0[50]	0	0	0
NO <sub>3</sub>	92	20	0	45	100	29	0	100	100	100	0	0
NO <sub>2</sub>	66	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ORD	0	0	0	20[25]	0	0	0	0	0	0	0	0
LDC	0	0	0	80[95]	0	100	0	0	0	0	0	0
ARD	88[92]	100	100	0	0	0	2[7]	0	50	0	0[100]	0
ACE	83[92]	40	0	70[75]	100	0	5[10]	0	50	0	0	0[100]
URE	35[82]	0	0	0[40]	0	0	0[5]	0	0[50]	0	50	100
CIT	91[96]	100	100	90[95]	0[100]	59[71]	91[93]	0	50	100	0	0
42G	100	0	0	0	0	0	93	0	0	0	0	0
OXI	96	100	100	70	100	0	0	0	100	100	50	100

The number in ( ) means the number of isolates.

The number in [ ] means the % positivity of biochemical reactions at 48 hr incubations.

Abbreviations: PAE, *Pseudomonas aeruginosa*; PPU, *Pseudomonas putida*; PFL, *Pseudomonas fluorescens*; BCE, *Burkholderia cepacia*; CAC, *Comamonas acidovorans*; SMA, *Stenotrophomonas maltophilia*; ABA, *Acinetobacter baumannii*; AJO, *Acinetobacter johnsonii*; MLA, *Moraxella lacunata*; AXX, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*; CIN, *Cryseobacterium indologenes*; MY-, *Myroides* spp.; PCY, pyocyanin; PVE, pyoverdine; GLF, glucose fermentation; GLO, glucose oxidation; MAL, maltose; LAC, lactose; SUC, sucrose; MAN, mannitol; NO<sub>3</sub>, nitrate reduction; NO<sub>2</sub>, nitrite reduction; ORD, ornithine decarboxylase; LDC, lysine decarboxylase; ARD, arginine dihydrolase; ACE, acetamide; URE, urease; CIT, citrate; 42G, 42°C growth; OXI, oxidase.

**B. 2차 구축**

Microplate법에 의한 NFB 동정률을 평가하기 위하여 2000년 8월부터 2001년 3월까지 임상검체에서 분리된 NFB를 대상으로 microplate 법을 시행한 후 24시간 배양에서 동정코드목록에 없는 균종이 분리될 경우에는 API 32 GN과 함께 microplate를 2일간 배양한 후 API 32 GN의 결과와 microplate 법의 24시간과 48시간 배양후의 동정 결과를 기록하였다. 주말과 공휴일에 분리된 균종 중 microplate법에서 24시간배양후에 동정되지 않는 균종은

API 32 GN의 동정 결과만을 기록하였다. 상품화 제품의 동정결과는 %ID가 90%이상일 경우에 최종 균종명으로 하였고 %ID가 90%미만인 균주는 NFB로 처리하였다. 표 3의 48시간 배양후의 생화학 성상 양성률은 24시간 배양보다 5%이상 차이가 있는 경우만 표시하였다.

**결 과**

**1. Microplate 동정법의 1차 구축**

Table 2. NFB isolates between August 2000 and March 2001

Organisms	No.(%) of isolates	
	API 32 GN	Microplate method
PAE	937(43.6)	927 (43.1)
PPU	22(1.0)	16 (0.7)
PFL	11(0.5)	10 (0.5)
PSZ	2 (0.1)	2 (0.1)
PLU	1(0.0)	1 (0.0)
BCE	193(9.0)	168 (7.8)
RPI	4(0.2)	1 (0.0)
CAC	9(0.4)	9 (0.4)
CTS	1(0.0)	0 (0.0)
BVE	2(0.1)	2 (0.1)
SMA	287(13.3)	287 (13.3)
ABA	515(24.0)	509 (23.7)
AHA	2(0.1)	1 (0.0)
AJU	19(0.9)	6 (0.3)
AJO	5(0.2)	1 (0.0)
ALW	3(0.1)	2 (0.1)
AFA	5(0.2)	3 (0.1)
AXX	16(0.7)	12 (0.6)
ADE	1(0.0)	0 (0.0)
CIN	6(0.3)	4 (0.2)
CME	1(0.0)	1 (0.0)
MLA	10(0.5)	5 (0.2)
MOS	5(0.2)	2 (0.1)
SPU	4(0.2)	4 (0.2)
SPT	4(0.2)	4 (0.2)
NFB	85(4.0)	173 (8.0)
Total	2,150(100)	2,150 (100)

Abbreviations: PLU, *Pseudomonas luteola*; RPI, *Ralstonia pickettii*; PSZ, *Pseudomonas stutzeri*; BVE, *Brevundimonas vesicularis*; CTS, *Comamonas testosteroni*; AHA, *Acinetobacter haemolyticus*; AJU, *Acinetobacter junii*; ALW, *Acinetobacter lwoffii*; AFA, *Alcaligenes faecalis*; ADE, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*; CME, *Chryseobacterium meningosepticum*; MOS, *Moraxella osloensis*; SPU, *Sphingomonas paucimobilis*; SPT, *Shewanella putrefaciens*; NFB, Glucose non-fermentative gram-negative bacilli.

Other abbreviations: see Table 1.

2000년 4월동안 시험한 175균주는 모두 12균종으로서 이 중 *P. aeruginosa* (47%), *A. baumannii* (24%), *B. cepacia* (11%), *Stenotrophomonas maltophilia* (10%), *Pseudomonas putida* (3%)의 5균종이 전체 분리균종의 95%를 차지하였다(Table 1). 동정코드 목록은 *Chryseobacterium indologenes*와 *Myroides* spp.에서 중복된 000044코드와 *Pseudomonas fluorescens*와 *P. putida*에서 중복된 210015 코드를 제외하였으며 분리균주수가 3균주이하인 균종들의 동정코드목록은 제외하여 *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*의 4 균종에 대한 63가지의 동정코드를 구축하였다.

## 2. Microplate 동정법의 2차 구축

2000년 8월부터 2001년 3월까지 임상검체에서 분리된 NFB 균종은 1,988명의 환자에서 2,150 균주가 분리되었으며, 이 중 microplate 법의 1차 동정코드목록에 의하여 동정되었던 균종은 1,776균주로서 82.5%의 동정률이었다. 2차 동정코드목록은 균종별로 중복되거나 NFB로 판정된 동정코드를 제거한 후 최종적으로 245가지의 균종별 동정코드목록을 작성하였다. Microplate 법의 2차 동정코드목록은 전체 분리균주의 92.0%(1,977/2,150)를 균종수준까지 동정할 수 있을 것으로 예측되었다(Table 2). Microplate 법에서의 pyocyanin 생성은 *P. aeruginosa*에서 만 관찰되었으나 양성률이 17%로 매우 낮았으며 pyoverdin 생성은 *P. fluorescens*, *P. putida*와 *P. aeruginosa*에서 각각 64%, 41% 및 20%의 양성률이었으며 *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* 1균주(6%)가 양성반응이었고 다른 균종은 모두 음성이었다. *P. putida*와 *P. fluorescens*는 대부분의 생화학 성상이 유사하였으나 mannitol 분해시험에서 *P. putida*는 모두 음성이었고 *P. fluorescens*는 82%에서 양성이었다(Table 3). *B. cepacia*는 maltose, lactose, sucrose, LDC, acetamide 및 citrate 시험등의 양성률이 77%이상으로서 다른 균종과의 감별이 쉬웠으나 상품화된 동정제품에 비해 균종명을 확인할 수 없는 경우가 25균종(1.2%)으로 가장 많았다(Table 2, Table 3). *S. maltophilia*는 maltose 분해와 LDC 시험이 각각 99%, citrate 시험은 91%의 양성률이었으며 다른 시험은 대부분이 음성이었다. *A. baumannii*는 glucose, citrate, 42°C 성장 시험에서 98%이상, lactose 분해시험 55%의 양성률이었으며 다른 시험은 대부분이 음성이었다(Table 3).

## 고 찰

NFB는 여러 이질적인 균속의 집합체로서 16S rRNA 염기서열의 상동성에 따라 분류와 균종명의 변화가 빈번하고 새로운 균종이 계속 추가되는 혼란스러운 균종들이다. NFB의 가장 대표적인 *Pseudomonas*는 rRNA의 상동성에 따라 5개의 *Pseudomonas* 상동성 군(homology group)

으로 나뉘었으며 각 상동성 군은 새로운 균속인 *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*로 분류되었고, 이전에 *Pseudomonas* 균종이었던 *P. putrefaciens*, *P. mesophilica*와 *P. paucimobilis*는 각각 *Shewanella*, *Methylobacterium* 및 *Sphingomonas* 균속으로 재분류되었으며, *Chryseomonas luteola*와 *Flavimonas oryzihabitans*는 *Pseudomonas*에 재편되었다[2-4]. *P. aeruginosa*는 임상검체에서 분리되는 NFB의 절반을 차지하는 균종으로서[1] NFB 균종 중 pyocyanin을 생성하는 유일한 균종이므로[6], pyocyanin 양성이면 *P. aeruginosa*로 동정할 수 있다. *P. aeruginosa*의 pyocyanin 생성 균주의 비율은 시험 배지의 종류와 배양기간[6-8], 균주 특성[9,10], 항균제 사용 유무[11] 등에 따라 달라져 58-98%이다[6-8,12,13]. 자연계에 존재하는 phenazine 색소는 50종류 이상으로서 대부분은 수용성으로 배지에 쉽게 확산되며, 육안적 색깔에 따라 청색 색소(pyocyanin), 초록색소(chlororaphine) 자줏빛 색소(iodinin), 노란색소(phenazine-1,6-decarboxylic acid), 주황색소(2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid), 붉은색소(pyorubin)로 나뉜다[14]. 세균이 생성하는 phenazine 색소는 세포 성장에는 관여하지 않으나 산화환원과정에 관여하며 독성 산소 잔기를 생성하여 항균 작용을 함으로써 환경 및 인체내에서의 생존력이 높아지는 역할을 한다[14]. *P. aeruginosa*의 pyocyanin (1-hydroxy-5-methylphenazine) 생성은 균주가 활발히 증식할 때와 배지내 포도당과 같이 쉽게 이용할 수 있는 당성분과 배지내 phosphate에 의해 억제되며, 세포분열이 적을 때와 배지내에 적정량의 magnesium chloride, potassium sulfate, sodium citrate에 의해 증가되므로 배지의 종류와 배양기간에 따라 pyocyanin 양성률이 달라진다[7,8,14]. Pyocyanin은 알칼리수용액에서는 청색을 띄지만 산성용액에서는 붉은색을 띄며, 환원에 의해 무색으로 변할 수 있고, 처음의 청색 pyocyanin이 시간이 경과하면 노란색의 1-hydroxyphenazine으로 화학구조가 바뀌어 청녹색으로 변한다[14]. 또한 점액성 집락의 *P. aeruginosa*는 pyocyanin을 생성하지 않는 경우가 많으므로 이러한 균주의 분리 비율이 높으면 pyocyanin 양성률이 낮아지게 되며[2,8], 계대배양을 반복하면 색소형성이 증가된다[10,13]. 최소 억제농도이하의 erythromycin 계열 항균제의 투여는 pyocyanin 생성을 억제하며[11,14], 특히 azithromycin은 8 mg/L의 농도에서도 pyocyanin 생성을 완전히 억제시킨다[11]. 본 연구에서 *P. aeruginosa*의 pyocyanin 양성률이 17%로 매우 낮은 이유는 균집중시 배지와외의 접촉면이 좁고 배양시간이 짧으며 항균제를 사용하고 있는 입원환자에서 분리된 균주가 많은 점 등이 원인으로 생각되었다.

Pyoverdin (fluorescein)은 수용성의 황색 색소로서 자외선을 비추면 형광을 내는 색소이다. Pyoverdin은 세균의 철 흡수 기능을 하는 siderophore의 일종으로서 병독성에 관여하며 화학구조적으로는 40종류가 있다[15,16].

Table 3. Biochemical reactions of NFB isolates between August 2000 and March 2001

Tests	% positivity of biochemical tests by organisms																											
	PAE (937)	PPU (22)	PFL (11)	PSZ (2)	PLU (1)	BCE (193)	RPI (4)	CAC (9)	CTS (1)	BVE (2)	SMA (287)	ABA (515)	AHA (2)	AJU (19)	AJO (5)	ALW (3)	AFA (5)	AXX (16)	ADE (1)	CIN (6)	CME (1)	MLA (10)	MOS (5)	SPU (4)	SPT (4)			
PCY	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PVE	20	41	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GLF	1	55[69]	82[91]	0	100	81	0	0	0	0	0	29	0	16[21]	0	0	0	13[38]	0	0[17]	0	0	0	0	0	0	0	0
GLO	88	64	82	50	100	84	25	0	0	0[100]	4	99	0	16[26]	0	0	0	44[56]	0	50	100	10[20]	0	0	0	0	0	
MAL	0	0	0	0[100]	100	78	0	0	0	0[100]	99	0	0	0[5]	0	0	0	0[6]	0	0[17]	100	0	0	0	0	0	0	
LAC	0	0	0	0	0[100]	81	0	0	0	0	1	55	0	5[22]	0	0	0	0[6]	0	0	0[100]	0[10]	0	0	0	0	0	
SUC	0	0	36	0	0	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0[6]	0	0	0	0	0	0	0	0		
MAN	58	0	73[82]	0[50]	100	3	0	11[56]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0[100]	0[30]	0	0	0	0	0	
NO <sub>3</sub>	98	14	9	100	100	13	25	89	100	0	22	1	100	5	20	68	0	88	0	33	0	20	20	0	0	50		
NO <sub>2</sub>	70	5	9	50	0	2	0	0	0	0	1	0	100	0	20	67	0	0	0	17	0	10	20	0	0	0		
ORD	0	0[5]	0	0	0	5	0	0[11]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6[16]	0	0	0	0	0	0	0	0		
LDC	0	0[5]	0[18]	50	0	77	0	11[27]	0	0	99	0	0	0	0	0	20	19[38]	0	0	0	0	0	20	0	0		
ARG	99	64	82	50	0[100]	3	25	22[33]	0	0	1	1	0[50]	11[16]	0	0[33]	20	19[31]	0	0[17]	0	0[20]	0	0	0	0		
ACE	97	14[32]	0[9]	0	0	77	25	67[78]	0	0[50]	4	1	0	16	0	0	80	13[50]	0[100]	0[33]	0	0[10]	0	0	0	0		
URE	43	0	0	0	0	2	0[25]	0[22]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	50[83]	0	10[20]	0	0	0	0		
CIT	99	68	82	50	100	84	25	78[100]	0	0	91	98	100	47	40	33	100	88[94]	0	17[67]	0	10[30]	0	0	0	0		
42G	99	5	0	100	100	1	25	11	100	0	0	98	100	16	0	0	60	44[50]	0	0	0	10	0	0	0	50		
OXI	100	100	100	100	0	95	100	100	100	0	0	0	0	20	0	0	67	100	0	100	100	100	100	100	100	100		

The number in ( ) means the number of isolates.

The number in [ ] means the % positivity of biochemical reactions at 48 hr incubations.

Abbreviations: See Table 1 and Table 2.

Pyoverdinin은 식물병인균에서도 관찰되지만 임상검체에서 분리되는 NFB 균종 중 pyoverdinin을 생성하는 균종은 *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*와 *P. putida*가 대부분이므로, pyoverdinin 시험은 이들 세 균종의 동정에 매우 유용하다 [2]. 즉, pyocyanin을 생성하지 않는 NFB 균종이 pyoverdinin을 생성했을 때에는 집락의 특성과 냄새 및 42°C 성장으로 *P. aeruginosa*를 동정할 수 있다. 또한 *P. fluorescens*와 *P. putida*는 병독성이 낮아 임상적 의의가 적은 경우가 많으므로 감별동정하지 않고 *P. fluorescens/P. putida*로 묶어서 보고할 수도 있기 때문이다[1,2]. 그러나, *P. fluorescens*는 오염된 혈액의 수혈후 발생하는 균혈증과 가성균혈증의 원인균으로 알려져 있고, *P. putida*는 카테터 연관성 균혈증의 원인균으로서[2] 다약제 내성 균주가 분리되고 있으므로[17], 두 균종의 감별이 필요한 경우가 증가하고 있다[18]. *P. fluorescens*와 *P. putida*의 감별동정은 4°C 성장유무와 gelatin 분해시험으로 가능하다고 하지만 두 시험 모두 4일 이상의 배양기간이 필요한 경우가 많기 때문에[2,18] 임상 검사실에서 사용하기에는 무리가 있다. 본 연구에서의 *P. fluorescens*, *P. putida*와 *P. aeruginosa*의 pyoverdinin 생성률은 각각 64%, 41% 및 20%로서 Kista 및 Gilligan[2]의 96%, 93% 및 65%보다 매우 낮았다. 세균의 pyoverdinin 생성은 배지내의 phosphate 농도 증가, proteose peptone No. 3 첨가 및 실온 배양, 알칼리성 pH에서 증가되므로 배지 성분과 배양방법에 따라 양성률이 달라진다[1,7,8,19]. 본 연구에서 pyoverdinin 양성률이 낮은 것도 pyocyanin과 비슷한 원인이 작용하는 것으로 생각되었으나 정확한 원인은 알 수 없었다. 본 연구에서 *P. fluorescens*와 *P. putida*의 감별력이 가장 높은 시험은 mannitol 분해시험으로서 *P. fluorescens*는 82%에서 양성이었고 *P. putida*는 모두 음성이었다. 외국에서 보고된 *P. fluorescens*와 *P. putida*의 mannitol 양성률은 Kista 및 Gilligan[2]이 53%와 23%로, Johnsen 등[20]은 100%와 0%로서 대상 균주와 연구자에 따른 차이가 있었다.

*Burkholderia* 균속은 *Pseudomonas* 상동성 II 군에 속하는 균종들의 집합으로서 임상검체에서 분리되는 균종은 *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. mallei* 및 *B. pseudomallei*의 4 균종이 있으며 [2], 임상검체에서 분리되는 대부분은 *B. cepacia*이다[1]. *B. cepacia*는 다른 NFB 균종에 비해 성장속도가 매우 느리므로 분리가 어렵고 특히, 상재균이 많은 검체에서는 다른 균종의 과성장으로 검출이 더욱 어렵기 때문에 선택배지 사용여부 등에 따라 분리율이 달라진다[21]. *B. cepacia*는 xylose, lactose, sucrose, maltose 및 mannitol에서 산을 생성하며 LDC 양성 반응이므로 다른 균종과의 감별이 비교적 쉬운 것으로 인식하기 쉽다 [2]. 그러나 *B. cepacia*는 5개 이상의 유전형으로 분류되며 생화학 성상의 유사성에 따라 I, III 및 IV 유전형은 *B. cepacia*, 유전형 II는 *B. multivorans*, 유전형 V는 *B. vietnamiensis*의 세 개의 균종으로 나뉘어지고, 유전형 III의 *B. cepacia*는 다시 세 가지 종류의 생물형(biovar)으로

세분된다[22]. 최근에는 *B. cepacia*의 유전형 종류가 7가지 이상인 것으로 알려져 있고, IV 유전형에 속하는 *B. cepacia*는 *B. stabilis*로, VII 유전형은 *B. ambifaria*로 제안되고 있다[23]. 이처럼 *B. cepacia*는 다양한 생화학 성상을 가지고 있는 이질적인 세균들의 집합체이므로 균주에 따라 감별 동정이 쉽지 않은 경우가 많으며 당을 이용하지 않는 III 유전형의 c형 생물형은 동정이 안되거나 *Alcaligenes* 또는 *Comamonas*로 동정될 가능성이 높다 [21,24]. 또한 *B. cepacia*의 생화학 성상 반응 속도도 균주별로 차이가 많다. Henry 등[25]에 의하면 *B. cepacia*의 glucose와 sucrose의 당분해시험은 배양 3일 이내에 대부분 양성을 보이지만 이외의 당성분은 배양기간을 연장함에 따라 양성률이 증가하였고, 환자와 검체종류에 따라서 낭포성섬유증 환자에서 분리된 균주의 maltose, lactose, mannitol, sucrose 및 xylose 양성률은 각각 63, 77, 66, 81 및 87%였으나 비낭포성섬유증 환자의 각각의 당성분 양성률은 95, 100, 88, 72 및 63%로 차이가 있었으며, 병원 환경과 병원이외의 환경에서 분리된 균종간에도 차이가 많았다. *P. cepacia*의 환자 종류와 검체에 따른 생화학 성상의 차이는 정확히는 알 수 없으나 세균증식에 필요한 영양 성분이 많을 경우에 생화학 성상이 변화된 변이종이 선택되었기 때문인 것으로 추측된다[26]. 본 연구에서 *B. cepacia*의 glucose, maltose, lactose, sucrose의 당분해 양성률은 Henry 등[25]의 결과와 유사하였으나 mannitol 양성률은 다른 보고자[2,25]에 비해 매우 낮았다.

*Ralstonia pickettii*는 1995년 이전까지는 *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *pickettii*로 분류하였던 균종으로서 세 가지 생물형으로 나뉘지며, 생물형 3은 *R. mannitolilytica*로 제안되었다[27,28]. *R. pickettii* 생물형 1은 lactose와 maltose에서 당을 분해하는 것이 생물형 2와의 차이점이며, *R. mannitolilytica*는 mannitol과 arabitol을 분해하고 nitrate 환원시험 음성 결과로 생물형 1과 2와 감별된다[27,28]. *R. mannitolilytica*는 *B. multivorans* (*B. cepacia* 유전형 II)와는 대부분의 생화학 성상이 유사하지만 *R. mannitolilytica*는 pyrrolidonyl arylamidase 양성 반응인 점이 *B. multivorans*와의 차이이다[27]. 본 연구에서는 *R. pickettii* 4균주 중 3균주가 대부분의 생화학 시험에서 반응이 없었는데 이는 *R. pickettii*의 생화학 반응이 다른 NFB 균종보다 느리게 반응하기 때문인 것으로 생각되었다.

*Pseudomonas* 상동성 군 III에 속하는 균종은 1991년이후로 *Comamonas*와 *Acidovorax* 균속을 포함하는 *Comamonadaceae* 과로 분류되었고, 여기에 속하는 균종은 임상검체에서의 분리빈도가 낮고 비병원성인 경우가 대부분이다[2]. *Comamonas* 균속에는 *C. acidovorans*와 *C. testosteroni*의 두 균종이 있으며 42°C 성장시험과 mannitol 분해시험으로 감별이 가능하다. 본 연구에 의하면 *C. acidovorans*의 acetamide 양성 반응이 매우 강하게 나타났다.

*S. maltophilia*는 oxidase 음성, glucose와 maltose 분해, LDC 및 DNase 양성인 특징이 있으므로 다른 균종과 쉽게 감별할 수 있다. 그러나 glucose 산 생성은 다소 늦게 나타나므로 1일 배양제에는 음성인 경우가 대부분이었다(Table 1, Table 2).

Oxidase 음성 그람음성구균인 *Acinetobacter* 균속에는 21가지의 유전형이 있으며 표현형으로는 16가지로 구분되고 각 균속에는 다양한 생물형이 존재한다[2]. 이처럼 *Acinetobacter* 균속은 생화학 성상이 유사한 다양한 균종들의 집합체이므로 전통적인 생화학 시험으로는 정확한 감별동정이 매우 어렵다. 그러나 *Acinetobacter* 균속 중 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 *A. baumannii*는 glucose를 분해하고 42℃에서 성장하는 특징을 갖고 있으므로 다른 균종과의 감별이 쉽다.

*Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* 및 *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*는 예전에 *Alcaligenes* 균속에 함께 포함되었던 균종들로서 oxidase 음성이며 대부분 당을 분해하지 못하므로 감별 동정이 어려우나 nitrate 환원시험이 감별에 도움이 된다[2]. *Chryseobacterium* 균속은 이전의 *Flavobacterium* 균속으로서 임상검체에서 분리되는 대부분은 *C. indologenes*와 *C. meningosepticum*이며, 색소 종류, DNase 및 mannitol 시험으로 쉽게 감별할 수 있다[2-4]. *Moraxella*는 oxidase 양성인 구형의 NFB 균종으로서 산을 분해하지 않으며 생화학 성상이 늦게 발현되거나 약하며 균종간의 생화학 성상이 유사하므로 균종수준까지 동정하기가 매우 어렵다[2-5]. *Sphingomonas* 균속에는 16 균종이 있으나 임상검체에서 분리되는 균종은 *S. paucimobilis*가 대부분이다[2]. *S. paucimobilis*는 citrate 양성인 균주로 알려져 있으나 본 연구에서 분리된 균주는 모두 음성이었다[29]. *Shewanella*는 NFB 균종중 H<sub>2</sub>S를 생성하는 유일한 균속으로서 ODC 양성, nitrate 환원, DNase 양성의 특징을 갖고 있으므로 동정이 쉽다. *Shewanella putrefaciens*는 4개이상의 유전형 또는 3종의 생물형으로 나뉘지며 유전형 II는 *S. baltica*로 제안되었고, 유전형 IV(생물형 2)는 *S. alga*로 명명되었다. 임상검체에서 분리되는 대부분은 *S. alga*로서 ribose를 제외하면 대부분의 당을 분해하지 못하며 42℃에서 성장하는 것이 *S. putrefaciens*와의 차이점이다. *S. putrefaciens*는 주로 수자원, 흙, 어류, 가축, 유제품 등의 다양한 환경에서 분리되며 생화학 성상이 다양하여 3가지 생물형으로 분류된다[2,30]. 본 연구에서 분리된 *Shewanella* 4균주중 2균주는 *S. alga*로 추측되었다.

## 요 약

**배 경 :** 포도당 비발효 그람음성간균(NFB, nonfermentative gram-negative bacilli)의 정확하고 신속한 동정은 진단과 치료에 필수적이며 병원감염의 역학조사에도 이

용될 수 있다. NFB의 상품화된 동정방법은 사용하기에는 편리하나 가격이 비싼 단점이 있다. 이에 임상검체에서 흔히 분리되는 NFB의 동정을 위한 간략 동정법을 개발하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

**방 법 :** NFB microplate 동정시험의 종류는 pyocyanin과 pyoverdine 생성시험, oxidation-fermentation 배지의 glucose 산화와 발효 시험, maltose, lactose, sucrose 및 mannitol 산화 시험, nitrate 배지에서의 nitrate 및 nitrite 환원 시험, Moeller decarboxylase 배지에서의 ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase 시험, acetamide, urease, citrate, 42℃ 성장시험 및 oxidase 시험의 18가지로 구성하였다. NFB microplate 동정 시험의 생화학 성상 자료를 구축하기 위하여 2000년 4월에 임상검체에서 연속하여 분리된 175균주의 NFB를 대상으로 간략동정법과 API 32GN을 동시에 시험하였다.

**결 과 :** NFB microplate 동정법은 임상검체에서 분리되는 NFB의 92%를 균종수준까지 동정할 수 있는 방법이었다.

**결 론 :** NFB 동정을 위한 microplate 법은 임상검체에서 분리되는 NFB 균종을 빠르고 간편하게 동정할 수 있는 방법으로서 앞으로 동정 비율과 정확도를 높이기 위한 보완작업이 필요할 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. 정윤섭, 이경원, 김현숙, 이삼열. 최신진단미생물학. 제3개정판. 서울:서홍출판사, p235-52, 2000.
2. Kista DL and Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1999:517-25.
3. Gilligan PH and Whittier S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1999:526-38.
4. Schreckenberger P and von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1999:539-60.
5. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger P, Winn WC Jr. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997 :253-320.
6. Reyes EA, Bale MJ, Cannon WH, Matsen JM. *Identification of Pseudomonas aeruginosa by pyocyanin production on Tech agar*. *J Clin Microbiol* 1981;13:456-8.
7. Gill VJ and Stock F. *Medium for the simultaneous*

- detection of pyocyanin and fluorescein pigments of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Clin Pathol* 1987 ;88:110-2.
8. Daly JA, Boshard R, Matsen JM. *Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1984 ;19:742-3.
  9. Azuma Y and Witter LD. *Pyocyanin formation by some normally apyocyanogenic strains of Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1964;87:1254.
  10. Liu PV. *Method for in vitro conversion of rough strains of Pseudomonas aeruginosa to smooth strains*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1864.
  11. Molinari G, Guzman CA, Pesce A, Schito GC. *Inhibition of Pseudomonas aeruginosa virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics*. *J Antimicrob Chemother* 1993 ;31:681-8.
  12. Smeal BC, Bender L, Jungkind DL, Hastie AT. *Simultaneous production of rhamnolipids, 2-alkyl-4-hydroxyquinolines, and phenazines by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1308-10.
  13. Lambe DW Jr and Stewart P. *Evaluation of Pseudosel agar as an aid in the identification of Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 1972;23:377-81.
  14. Kerr JR. *Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors*. *Infect Dis Rev* 2000;2:184-94.
  15. Meyer JM. *Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species*. *Arch Microbiol* 2000;174:135-42.
  16. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. *Pyoverdinin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1996;64:518-23.
  17. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. *PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2909-13.
  18. Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW, et al. *Outbreak of Pseudomonas fluorescens bacteremia among oncology patients*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2914-7.
  19. Palumbo SA. *Role of iron and sulfur in pigment and slime formation by Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1972;111:430-6.
  20. Johnsen K, Andersen S, Jacobsen CS. *Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent Pseudomonas biovars*. *Appl Environ Microbiol* 1996 ;62:3818-25.
  21. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, et al. *Comparison of isolation media for recovery of Burkholderia cepacia complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1004-7.
  22. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. *Occurrence of multiple genomovars of Burkholderia cepacia in cystic fibrosis patients and proposal of Burkholderia multivorans sp. nov.* *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1188-200.
  23. Henry DA, Mahenthalingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. *Phenotypic methods for determining genomovar status of the Burkholderia cepacia complex*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1073-8.
  24. Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengel LC, Gaskin S, Livermore DM. *Type characterisation and antibiotic susceptibility of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland*. *J Med Microbiol* 1996;44:203-10.
  25. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. *Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium*. *J Clin Microbiol* 1997;35:614-9.
  26. Barth AL and Pitt TL. *Auxotrophy of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia from cystic fibrosis patients*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2192-4.
  27. De Baere T, Steyaert S, Wauters G, Des Vos P, Goris J, Coenye T, et al. *Classification of Ralstonia pickettii biovar 3/ thomasi strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as Ralstonia mannitolitica sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:547-58.
  28. Vanechoutte M, De Baere T, Wauters G, Steyaert S, Claeys G, Vogelaers D, et al. *One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with Ralstonia mannitolitica*. *J Clin Microbiol* 2001;39:4588-90.
  29. Yabuuchi E, Yamamoto H, Terakubo S, Okamura N, Naka T, Fujiwara N, et al. *Proposal of Sphingomonas wittichii sp. nov. for strain RWIT, known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:281-92.
  30. Khashe S and Janda JM. *Biochemical and pathogenic properties of Shewanella alga and Shewanella putrefaciens*. *J Clin Microbiol* 1998;36:783-7.