

Identification of the Bacteria Isolated from Oral Cavities in Korea

Mi-Hwa Choi, 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 February 26, 2015; revised March 14, 2015; accepted March 17, 2015)

The aim of this study was to identify bacteria isolated from the oral cavities and to determine their antimicrobial susceptibility against eight antibiotics. The bacterial strains were obtained from the Korean Collection for Oral Microbiology (KCOM). The bacteria were identified by comparing 16S rDNA sequences at the species level. The data showed that 77 bacterial strains were predominantly identified as streptococci (49.4%) and staphylococci (14.3%). Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using a broth dilution assay to test the sensitivity of the bacterial strains. The MIC values of the oral bacterial strains against antibiotics were different. Streptococci were sensitive to clindamycin, cefuroxime axetil, and vancomycin, and they were resistant to tetracycline. Staphylococci also were sensitive to clindamycin, cefuroxime axetil, and vancomycin, and they were resistant to penicillin antibiotics. Gram-negative bacterial strains were sensitive to tetracycline and were resistant to clindamycin. These results suggest that the antimicrobial susceptibility test is necessary in deciding the prescription for antibiotics, to prevent the misuse or abuse of antibiotics.

Key words: 16S rDNA, antibiotics, oral bacteria, identification, MIC

서 론

사람 구강 내 세균은 치아, 치은, 타액선, 협점막 및 혀로 구성된 특수한 환경에서 서식하고 있으며, 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA) 핵산염기서열비교 결정법에 의해 약 500-1,200 여 종(또는 taxa)의 세균이 존재하고, 이들 중 현재 배양된 세균 종은 약 380 종으로 알려져 있다[1-3]. 즉, 800 여 종은 아직 배양이 되지 않은 상태이다. 이들 세균들은 숙주의 면역력 및 구강 위생 상태에 따라 치아우식증, 치주질환, 치수 및 치근단 질환, 악골 골수염 등의 다양한 구강 질환의 주요한 병인 인자이다[4-7]. 또한 구강 내 세균들은 치주질환에 의한 치은조직 파괴에 의해 이차적으로 혈관을 통해 전신으로 전이되어 동맥경화증, 심내막염을 포함하는 심혈관 질환, 당뇨병, 세균성 폐렴, 골수염, 유산 등과 같은 전신 질환의 직접 혹은 간접적인 원인으로 작용하는 것으로 알려졌다[8-12].

구강 내에 세균성 감염 질환의 치료 목적으로 항생제가 임상에서 자주 사용되어지고 있다. 국내 대부분의 치과병원에서는 항생제 처방을 목적으로 감염 병소에서 세균을 분리 배양하고 항생제 내성 검사를 하지 않고 경험적으로 항생제를 처방하는 경우가 대부분이다. 이러한 이유로 항생제 오남용의 결과 항생제 내성을 갖는 세균들의 출현이 사회적 문제로 대두되고 있다[13,14]. 그러므로 치과 영역에서도 구강 감염성 질환의 치료를

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, 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: +82-62-236-2734 E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

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.

목적으로 항생제를 처방하는 경우 항생제 감수성 검사가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

구강 내에 존재하는 세균 종은 인종과 지리학적 위치에 따라 다르고, 균주에 따라 숙주의 구강 조직 세포에 대한 병원성의 차이가 있다[15,16]. 그러므로 한국인 구강에 존재하는 임상균주의 구강 내 세균 분포와 다양한 세균 종의 생리학적 특성, 항생제 감수성 검사 및 세균-숙주간의 상호작용 등의 연구가 필요하다. 본 연구에서는 구강 내 세균 감염 병소에서 분리되어 중 수준으로 동정되지 않은 상태로 한국구강미생물자원은행(KCOM, Korean Collections of Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에 기탁된 균주들을 분양받아 16S rDNA 핵산염기서열 비교 분석법을 이용하여 동정하였다. 또한 유사한 구강

질환으로 내원한 환자의 항생제 처방에 대한 자료를 얻고자 임상에서 빈번하게 사용되고 있는 8 종 항생제에 대한 감수성 검사를 시행하였다.

실험재료 및 방법

세균 및 세균 배양

본 연구에서 사용된 모든 균주들은 한국구강미생물자원은행에서 분양 받아 사용하였다. 이들 균주들은 한국인의 구강 내에서 호기성 배양 상태에서 분리되어 중 수준으로 동정 되지 않은 상태로 한국구강미생물자원은행에 기탁된 것들이었다(Table 1).

Table 1. Bacterial strains used in this study

Patients' No.	Sources	Strains
5	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1621,
9	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1661
11	Odontogenic keratocyst	KCOM 1663, KCOM 1664, KCOM 1665, KCOM 1666
14	Chronic osteomyelitis	KCOM 1673
18	Pericoronitis	KCOM 1674, KCOM 1675, KCOM 1679
19	Postoperative maxillary cyst	KCOM 1686, KCOM 1687, KCOM 1688, KCOM 1690, KCOM 1691, KCOM 1692, KCOM 1693, KCOM 1694, KCOM 1696, KCOM 1697, KCOM 1698, KCOM 1699, KCOM 1701
21	Postoperative infection	KCOM 1718, KCOM 1719, KCOM 1720, KCOM 1722, KCOM 1723
22	Maxillary chronic osteomyelitis	KCOM 1727, KCOM 1728
23	Subgingival plaque	KCOM 1729, KCOM 1730, KCOM 1731, KCOM 1732, KCOM 1733, KCOM 1734, KCOM 1735, KCOM 1737
25	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1751, KCOM 1752, KCOM 1753, KCOM 1754, KCOM 1755, KCOM 1756, KCOM 1757, KCOM 1758, KCOM 1759, KCOM 1760, KCOM 1761, KCOM 1762, KCOM 1763
26	Maxillary chronic osteomyelitis	KCOM 1791
27	Dentigerous cyst	KCOM 1796, KCOM 1797, KCOM 1798
28	Chronic osteomyelitis	KCOM 1813
29	Subcutaneous actinomycosis	KCOM 1816
30	Infected radicular cyst	KCOM 1820, KCOM 1823, KCOM 1825
31	cheek & submandibular space abscess	KCOM 1826
35	Osteomyelitis	KCOM 1860
36	Osteomyelitis	KCOM 1866
37	Cementoblastoma	KCOM 1869, KCOM 1870, KCOM 1871, KCOM 1873, KCOM 1874, KCOM 1875, KCOM 1876, KCOM 1877, KCOM 1879,
38	ND	KCOM 1884, KCOM 1885, KCOM 1886, KCOM 1887
39	Mandibular osteomyelitis	KCOM 1907

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

ND, Not diagnosed

이들 균주들은 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratory, Detroit, MI, U.S.A.)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 포함된 배지에 접종하여, 37°C 세균 배양기에서 배양하였다.

PCR 증폭물의 클로닝

세균의 지놈 DNA들은 CTAB method에 따라 추출하였다[17]. 본 연구에서 분석하고자 하는 16S rDNA 유전자를 PCR법으로 증폭하기 위해 27F (5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3') 및 1492R (5'-TAG GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머들을 사용하였다[18]. 이들 프라이머는 Bioneer 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 이 때 PCR의 조건은 선행 논문에서 기술된 방법을 이용하였다[19]. 최종 반응물은 2 µl씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭여부를 확인하였다.

PCR 증폭물은 pGEM-T easy vector (Promega Co., Madison, WI, USA)에 클로닝하여 *E.coli* DH5α를 형질전환시켰다. 재조합 플라스미드는 바이오니아 사의 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit를 이용하여 추출하였다.

핵산염기서열 결정

핵산염기서열 결정은 코스모진텍사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 이때, 사용되는 프라이머는 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')이며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 7.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다. 위에서 결정된 핵산염기서열은 EzTaxon 프로그램(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 상동성 검색을 하였고, 그 결과 98% 이상 상동성을 보이는 표준 균주의 종과 같은 종으로 판정하였다.

Table 2. Interpretive standards for dilution susceptibility testing [21]

Antibiotics	MIC (µg/ml)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin G			
Staphylococci	≤ 0.12	-	≥ 0.25
Streptococci	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Amoxicillin			
Staphylococci	≤ 0.25	-	≥ 0.5
Streptococci	≤ 0.25	0.5-4	≥ 8
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Amoxicillin+clavulanic acid			
Staphylococci	≤ 4	-	≥ 8
Streptococci	≤ 0.25	0.5-4	≥ 8
Enterococci	≤ 8	-	≥ 16
Tetracycline			
Staphylococci	≤ 4	8	≥ 16
Streptococci	≤ 2	4	≥ 8
Enterococci	≤ 4	8	≥ 16
Cefuroxime axetil			
Staphylococci	≤ 4	8-16	≥ 32
Streptococci	≤ 1	2	≥ 4
Clindamycin			
Staphylococci	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Streptococci	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Oxacillin			
Staphylococci	≤ 2	-	≥ 4
Vancomycin			
Staphylococci	≤ 2	4-8	≥ 16
Streptococci	≤ 1	-	-
Enterococci	≤ 4	8-16	≥ 32
Polymyxin B			
Staphylococci	≤ 2	-	≥ 4

항생제 감수성 실험

Penicillin G (페니실린 G), amoxicillin (아목사실린),

cefuroxime axetil (세프록심 아세틸), tetracycline (테트라싸이클린), clindamycin (클린다마이신), oxacillin (옥사실

Table 3. The strains used in this study and accession numbers for nucleotide sequences of 16S rDNA

Strains	Spices	GeneBank accession no.	Strains	Spices	GeneBank accession no.
KCOM 1621	<i>Streptococcus rubneri</i> ^a	KF733658	KCOM 1752	<i>Staphylococcus warneri</i> ^a	KF733696
KCOM 1661	<i>Proteus vulgaris</i> ^b	KF733657	KCOM 1753	<i>Micrococcus yunnanensis</i> ^a	KF733697
KCOM 1663	<i>Streptococcus constellatus</i> ^a	KF733659	KCOM 1754	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	KF733698
KCOM 1664	<i>Streptococcus constellatus</i> ^a	KF733660	KCOM 1755	<i>Streptococcus oralis</i> ^a	KF733699
KCOM 1665	<i>Staphylococcus hominis</i> ^a	KF733661	KCOM 1756	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733700
KCOM 1666	<i>Klebsiella</i> sp. ^b	KF733662	KCOM 1757	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733701
KCOM 1673	<i>Streptococcus oralis</i> ^a	KF733663	KCOM 1758	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733702
KCOM 1674	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733664	KCOM 1759	<i>Streptococcus sinensis</i> ^a	KF733703
KCOM 1675	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733665	KCOM 1760	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733704
KCOM 1679	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ^a	KF733672	KCOM 1761	<i>Streptococcus sinensis</i> ^a	KF733705
KCOM 1686	<i>Citrobacter braakii</i> ^b	KF733666	KCOM 1762	<i>Streptococcus sinensis</i> ^a	KF733706
KCOM 1687	<i>Citrobacter freundii</i> ^b	KF733667	KCOM 1763	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ^a	KF733707
KCOM 1688	<i>Citrobacter freundii</i> ^b	KF733668	KCOM 1791	<i>Actinomyces oris</i> ^a	KF733708
KCOM 1690	<i>Citrobacter freundii</i> ^b	KF733669	KCOM 1796	<i>Staphylococcus warneri</i> ^a	KF733709
KCOM 1691	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733670	KCOM 1797	<i>Staphylococcus warneri</i> ^a	KF733710
KCOM 1692	<i>Citrobacter braakii</i> ^b	KF733673	KCOM 1798	<i>Streptococcus constellatus</i> ^a	KF733711
KCOM 1693	<i>Streptococcus infantis</i> ^a	KF733674	KCOM 1813	<i>Streptococcus</i> sp. ^a	KF733714
KCOM 1694	<i>Streptococcus mitis</i> ^a	KF733675	KCOM 1816	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	KF733712
KCOM 1696	<i>Rothia mucilaginosa</i> ^a	KF733676	KCOM 1820	<i>Gemella haemolysans</i> ^a	KF733713
KCOM 1697	<i>Actinomyces odontolyticus</i> ^a	KF733677	KCOM 1823	<i>Gemella haemolysans</i> ^a	KF733715
KCOM 1698	<i>Citrobacter freundii</i> ^b	KF733678	KCOM 1825	<i>Gemella haemolysans</i> ^a	KF733716
KCOM 1699	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ^a	KF733679	KCOM 1826	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733717
KCOM 1701	<i>Citrobacter freundii</i> ^b	KF733680	KCOM 1860	<i>Streptococcus</i> sp. ^a	KF733718
KCOM 1718	<i>Streptococcus oralis</i> ^a	KF733671	KCOM 1866	<i>Micrococcus yunnanensis</i> ^a	KF733719
KCOM 1719	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ^a	KF733681	KCOM 1869	<i>Neisseria</i> sp. ^b	KF733720
KCOM 1720	<i>Streptococcus sanguinis</i> ^a	KF733682	KCOM 1870	<i>Neisseria subflava</i> ^b	KF733721
KCOM 1722	<i>Streptococcus gordonii</i> ^a	KF733683	KCOM 1871	<i>Streptococcus</i> sp. ^a	KF733722
KCOM 1723	<i>Neisseria oralis</i> ^b	KF733684	KCOM 1873	<i>Streptococcus intermedius</i> ^a	KF733723
KCOM 1727	<i>Burkholderia anthina</i> ^b	KF733685	KCOM 1874	<i>Streptococcus intermedius</i> ^a	KF733724
KCOM 1728	<i>Burkholderia anthina</i> ^b	KF733686	KCOM 1875	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ^a	KF733725
KCOM 1729	<i>Streptococcus dentisani</i> ^a	KF733687	KCOM 1876	<i>Streptococcus</i> sp. ^a	KF733726
KCOM 1730	<i>Streptococcus</i> sp. ^a	KF733688	KCOM 1877	<i>Rothia mucilaginosa</i> ^a	KF733727
KCOM 1731	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733689	KCOM 1879	<i>Streptococcus intermedius</i> ^a	KF733728
KCOM 1732	<i>Streptococcus australis</i> ^a	KF733690	KCOM 1884	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	KF733729
KCOM 1733	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733691	KCOM 1885	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	KF733730
KCOM 1734	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ^a	KF733692	KCOM 1886	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	KF733731
KCOM 1735	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733693	KCOM 1887	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	KF733732
KCOM 1737	<i>Streptococcus anginosus</i> ^a	KF733694	KCOM 1907	<i>Streptococcus constellatus</i> ^a	KF733733
KCOM 1751	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	KF733695			

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; ^a, Gram-positive bacterium; ^b, Gram-negative bacterium.

린), vancomycin (반코마이신, 그람 양성 세균에만 사용),
 polymyxin B (폴리마이신 B, 그람 음성 세균에만 사용)

는 Sigma 사(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.
 그람 음성 세균인 경우 반코마이신에 대한 내성이 높기

Table 4. Minimal inhibitory concentration of antibiotics for Gram-positive bacterial strains

Species (Gram Positive)	Strain name	Concentration (µg/ml)							
		PEN	AMX	AUG	TET	CMX	CLI	OXA	VAN
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	KCOM 1697	1	1	4 ^S	16	1 ^S	>32	4	0.5 ^S
<i>Actinomyces oris</i>	KCOM 1791	0.12 ^S	<0.12 ^S	0.5 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	0.12 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	KCOM 1753	<0.06 ^S	<0.12 ^S	0.25 ^S	<0.12 ^S	0.25 ^S	0.12 ^S	1 ^S	0.25 ^S
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	KCOM 1866	<0.06 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	0.12 ^S	1 ^S	0.12 ^S
<i>Rothia mucilaginosa</i>	KCOM 1696	<0.06 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	0.25 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Rothia mucilaginosa</i>	KCOM 1877	<0.06 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	2 ^S	<0.12 ^S	>32	0.25 ^S	1 ^S
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCOM 1884	>32	>64	>64	0.25 ^S	2	<0.06 ^S	1 ^S	1 ^S
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCOM 1885	>32	>64	>64	0.25 ^S	2	<0.06 ^S	1 ^S	1 ^S
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCOM 1886	>32	>64	>64	0.25 ^S	2	<0.06 ^S	1 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCOM 1887	1	<0.12 ^S	1 ^S	2 ^S	>64	>32	>32	0.12 ^S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCOM 1751	>32	32	64	64	0.5 ^S	0.12 ^S	0.25 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCOM 1754	32	8	16	64	0.5 ^S	0.12 ^S	0.5 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCOM 1816	1	0.5	8	1 ^S	0.5 ^S	<0.06 ^S	0.25 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus hominis</i>	KCOM 1665	1	2	8	32	1 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	KCOM 1752	0.5	0.5	2 ^S	64	0.5 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus warneri</i>	KCOM 1796	1	1	8	0.25 ^S	0.5 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S	2 ^S
<i>Staphylococcus warneri</i>	KCOM 1797	0.25	<0.12 ^S	0.5 ^S	4 ^S	0.5 ^S	0.12 ^S	2 ^S	32
<i>Streptococcus anginosus</i>	KCOM 1731	<0.06 ^S	<0.12 ^S	0.5	0.25 ^S	0.25 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus anginosus</i>	KCOM 1756	<0.06 ^S	0.25 ^S	1	64	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus anginosus</i>	KCOM 1826	0.12 ^S	0.5	2	>64	0.5 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus australis</i>	KCOM 1732	0.12 ^S	0.5	4	32	<0.12 ^S	<0.06 ^S	0.25 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus australis</i>	KCOM 1734	0.12 ^S	0.5	2	32	<0.12 ^S	0.5	0.5 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus constellatus</i>	KCOM 1663	<0.06 ^S	0.25 ^S	0.5	0.5 ^S	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus constellatus</i>	KCOM 1798	<0.06 ^S	<0.12 ^S	1	0.5 ^S	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus constellatus</i>	KCOM 1907	0.12 ^S	0.5	2	0.25 ^S	0.5 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus gordonii</i>	KCOM 1722	<0.06 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	0.12 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus infantis</i>	KCOM 1693	0.5	0.5	1	8	2	>32	4	0.5 ^S
<i>Streptococcus intermedius</i>	KCOM 1873	<0.06 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	0.25 ^S	1 ^S
<i>Streptococcus mitis</i>	KCOM 1694	0.25	0.5	4	64	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus oralis</i>	KCOM 1718	0.25	<0.12 ^S	0.25 ^S	0.25 ^S	1 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus dentisani</i>	KCOM 1729	0.25	0.5	2	32	0.5 ^S	<0.06 ^S	4	1 ^S
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1813	2	4	16	32	8	<0.06 ^S	8	0.5 ^S
<i>Streptococcus oralis</i>	KCOM 1673	4	8	16	32	8	>32	8	0.5 ^S
<i>Streptococcus oralis</i>	KCOM 1755	0.5	0.5	2	16	1 ^S	>32	8	0.5 ^S
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	KCOM 1719	0.5	1	4	64	0.5 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	KCOM 1875	0.25	1	4	64	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KCOM 1679	<0.06 ^S	0.25 ^S	0.5	>64	0.25 ^S	0.25 ^S	1 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KCOM 1699	0.25	0.5	4	0.25 ^S	0.25 ^S	<0.06 ^S	1 ^S	0.25 ^S
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	KCOM 1763	0.5	1	8	32	1 ^S	>32	8	0.25 ^S
<i>Streptococcus rubneri</i>	KCOM 1621	0.25	0.5	2	32	0.5 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus sanguinis</i>	KCOM 1720	1	1	4	32	1 ^S	<0.06 ^S	8	0.5 ^S
<i>Streptococcus sinensis</i>	KCOM 1759	<0.06 ^S	<0.12 ^S	0.25 ^S	0.5 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1730	0.12 ^S	<0.12 ^S	0.5	0.25 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1860	0.5	2	4	32	0.5 ^S	>32	32	0.5 ^S
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1871	<0.06 ^S	<0.12 ^S	0.5	0.25 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	0.25 ^S
<i>Streptococcus sp.</i>	KCOM 1876	0.25	1	2	32	0.25 ^S	<0.06 ^S	2 ^S	0.5 ^S

PEN, Penicillin G; AMX, Amoxicillin; AUG, Augmentin; TET, Tetracycline; CMX, Cefuroxime axetil; CLI, Clindamycin; OXA, oxacillin; VAN, Vancomycin; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; ^S, susceptible to each antibiotic.

때문에 그람 음성세균에 대한 항균능이 높은 폴리마이신 B를 사용하였다. Augmentin (amoxicillin + clavulanic acid, 5:1, 오그멘틴)은 일성제약주식회사(Seoul, Korea)의 것을 사용하였다. 여러 항생제에 대한 최소성장억제농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)는 Murray와 Jorgensen의 방법[20]에 따라 액체배지 희석법으로 측정하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 항생제의 농도가 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0 µg/ml인 액체배지 0.1 ml를 96-well plate well에 분주하였다. 여기에 600 nm의 파장에 대한 흡광도가 0.05로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml씩 접종하였다. 그리고 항생제와 세균을 반응시킨 96-well plate는 37°C 세균 배양기에서 24시간 배양한 후, Microplate Autoreader (Model; EL311SX, BIO-TEX Instruments Inc., Cortland, NY, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 세균을 접종하지 않은 배지의 흡광도 값과 비교하여 세균이 자라지 않은 항생제 농도를 MIC 값으로 결정하였다. 감수성 여부 농도는 Clinical and Laboratory Standards Institute [21]에서 권고한 해석 표준에 따랐다(Table 2).

결 과

구강 병소에서 분리된 세균 동정

한국구강미생물자원은행에서 분양받은 21명의 환자로 부터 분리된 77개 임상균주들의 16S rDNA를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하였으며, EzTaxon 프로그램을 이용하여 종 수준으로 동정하였다 (Table 3). 그 결과 그람 양성 세균은 55균주(71.4%), 그람 음성 세균은 22균주(28.6%)로 확인되었다(Table 3). 그람 양성 세균들 중에서는 연쇄구균(49.4%)과 포도구균(14.3%)들이, 그람 음성 세균들의 경우 *Neisseria* 속 균주(10.4%) 및 *Citrobacter* 속 균주(9.1%)들이 주를 이루었다(Table 3).

구강세균들의 수종 항생제에 대한 최소성장억제농도

본 연구에서 동정된 균주들의 8종 항생제에 대한 MIC 값은 Table 4와 Table 5에 정리하였다. 동정된 77 균주 중 같은 환자에서 분리된 균주들은 동일한 균주라 생각

Table 5. Minimal inhibitory concentration of antibiotics for Gram-negative bacterial strains

Species (Gram Negative)	Strain name	Concentration (µg/ml)							
		PEN	AMX	AUG	TET	CMX	CLI	OXA	PMB
<i>Citrobacter braakii</i>	KCOM 1686	>32	>64	>64	2 ^S	8	>32	>32	4
<i>Citrobacter braakii</i>	KCOM 1692	>32	>64	>64	1 ^S	4	>32	>32	2 ^S
<i>Citrobacter freundii</i>	KCOM 1687	>32	>64	>64	1 ^S	2	>32	>32	8
<i>Citrobacter freundii</i>	KCOM 1688	>32	>64	>64	1 ^S	4	>32	>32	4
<i>Citrobacter freundii</i>	KCOM 1690	>32	>64	>64	1 ^S	4	>32	>32	2 ^S
<i>Citrobacter freundii</i>	KCOM 1698	>32	>64	>64	1 ^S	4	>32	>32	1 ^S
<i>Citrobacter freundii</i>	KCOM 1701	>32	>64	>64	2 ^S	8	>32	>32	<0.06 ^S
<i>Klebsiella</i> sp.	KCOM 1666	>32	>64	>64	1 ^S	4	>32	>32	1 ^S
<i>Neisseria oralis</i>	KCOM 1723	<0.06 ^S	<0.12 ^S	0.25 ^S	0.25 ^S	<0.12 ^S	<0.06 ^S	<0.06 ^S	>32
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1674	0.5	0.5	2 ^S	1 ^S	2	32	32	>32
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1691	0.25	0.25 ^S	2 ^S	0.5 ^S	4	32	32	0.12 ^S
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1869	1	0.5	2 ^S	0.5 ^S	8	32	32	0.25 ^S
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1675	0.5	0.5	2 ^S	2 ^S	4	>32	>32	2 ^S
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1757	1	0.5	2 ^S	1 ^S	8	16	>32	0.25 ^S
<i>Neisseria</i> sp.	KCOM 1760	2	0.5	2 ^S	1 ^S	8	32	>32	0.25 ^S
<i>Neisseria subflava</i>	KCOM 1870	2	0.5	4 ^S	0.5 ^S	8	16	>32	0.25 ^S
<i>Proteus vulgaris</i>	KCOM 1661	>32	>64	>64	64	>64	>32	>32	>32

PEN, Penicillin G; AMX, Amoxicillin; AUG, Augmentin; TET, Tetracycline; CMX, Cefuroxime axetil; CLI, Clindamycin; OXA, Oxacillin; PMB, Polymyxin B; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; ^S, susceptible to each antibiotic.

되어 그들 중 한 균주만 항생제 내성검사를 실시하였다. 즉, KCOM 1664 (KCOM 1663과 동일), KCOM 1733, KCOM 1735, KCOM 1737 (이상 KCOM 1731과 동일), KCOM 1758 (KCOM 1756과 동일), KCOM 1761, KCOM 1762 (이상 KCOM 1759와 동일), KCOM 1874, KCOM 1879 (KCOM 1873과 동일) 균주들은 제외하였다. 또한 5 균주들(KCOM 1727, KCOM 1728, KCOM 1820, KCOM 1823, KCOM 1825)은 한천배지에서 자라나지만 액체배지에서는 배양이 되지 않아 항생제 내성 검사에서 제외하였다. 항생제 감수성 검사에는 그람 양성 세균 46 균주와 그람 음성 세균 17 균주를 사용하였다. 그 결과 그람 양성 세균 중 연쇄구균은 반코마이신에 100%, 세프록심 아세틸에 89.7%, 클린다마이신에 79.3%의 균주가 감수성을 보였다. 테트라사이클린은 62.1%로 내성이 가장 높은 항생제로 나타났다(Table 4). 그람 양성 세균 중 4균주의 *Staphylococcus aureus*가 분리되었는데 4균주 중 1균주(KCOM 1887)가 옥사실린에 내성을 나타냄으로써 MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*)로 판정되었다(Table 4). 또한 포도구균은 페니실린에 100% 내성을 보였으며, 아목사실린에는 81.8% 균주가 내성을 보였고, 오그멘틴에는 72.7%가 내성을 보여 페니실린 계 항생제에 높은 내성을 나타냈다. 그리고 클린다마이신, 반코마이신, 세프록심 아세틸에는 각각 90.9%, 81.8%, 63.6% 균주가 감수성을 나타내었으며, 테트라사이클린에는 63.6% 균주가 감수성을, 36.4% 균주가 내성을 보였다(Table 4). 그람 음성 세균은 테트라사이클린에 94.1%, 폴리마이신 B에 64.7% 균주가 감수성을 보였고, 클린다마이신에 94.1%, 페니실린, 아목사실린, 오그멘틴에 각각 52.9% 균주가 내성을 보였다. *Neisseria oralis*인 KCOM 1723 균주는 폴리마이신 B를 제외한 항생제에 감수성을 보였고 *Proteus vulgaris*인 KCOM 1661는 모든 항생제에 대해 내성을 보였다(Table 5).

고 찰

본 연구 결과, 21명의 한국인 구강으로부터 분리된 세균 77균주들의 16S rDNA 핵산염기서열 비교분석법을 통한 세균 종 수준으로 동정한 결과 *Streptococcus* 속 38균주, *Staphylococcus* 속 11균주, *Neisseria* 속 8균주, *Citrobacter* 속 7균주, *Gemella* 속 3균주, *Actinomyces* 속 2균주, *Micrococcus* 속 2균주, *Rothia* 속 2균주, *Burkholderia* 속 2균주, *Proteus* 속 1균주, 및 *Klebsiella* 속 1균주를 얻었다. 본 연구 결과 다양한 세균 종이 검출되었으나, 여러 구강 세균성 감염질환의 주요 병원체로 알려진 *Porphyromonas*

gingivalis 등과 같은 혐기성 세균이 동정되지 않았다. 이는 본 연구에서 사용되었던 균주들이 호기성 조건에서 배양되었던 균주들이었기 때문이다. 검출된 세균 중에 *Actinomyces*, *Gemella*, *Neisseria* 및 *Rothia* 속 균주는 구강 정상 세균총의 일종이지만 *Gemella haemolysans*은 심근내막염, 내수막염, 골수염을 유발하고[22-25], *Rothia dentocariosa*는 심근내막염[26,27]을 유발하며, *Actinomyces neuii*와 *Actinomyces naeslundii*은 골수염[28,29]을 유발한다고 보고되었다. 또한, *P. vulgaris*는 장내 세균으로 골수염과 연관이 있다는 연구 보고가 있다[30]. 이러한 균주들은 악골골수염 등과 같은 일종의 기회감염성 구강질환에서 분리된 점을 고려한다면, 이들균주들은 각 질환의 발병 및 진행에 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 높은 빈도로 검출된 연쇄구균은 정상 세균총에 속하며 골수염과 직접적인 관련이 있다는 연구 결과는 없다. 그러나 *S. pneumoniae*와 같은 mitis 군 연쇄구균은 이차적 감염으로 인해 심각한 전신질환을 일으키는 중요 병원체로 알려져 있다. 연쇄구균은 16S rDNA 핵산염기서열을 기준으로 *anginosus*, *mitis*, *mutans*, *salivarius*, *bovis*, 및 *pyogenis* 군으로 나뉘는데[31] 본 연구에서는 *anginosus*, *mitis*, *salivarius* 군에 속하는 종이 검출되었다. *Anginosus* 군 연쇄구균에 속하는 *Streptococcus constellatus*와 *Streptococcus intermedius* 종은 16S rDNA 핵산염기서열 바탕으로는 구별이 어려우나 Park 등[32]의 연구에서 사용된 PCR primer를 이용하여 두 종간의 구별을 할 수 있었다(data not shown). Mitis 군 연쇄구균은 임상균주의 16S rDNA 핵산염기서열과 EzTaxon database의 핵산염기서열을 비교하여 상동성이 가장 높은 결과로 균주의 종을 우선적으로 결정하였다. 그 결과 *Streptococcus mitis* (1 균주), *Streptococcus pseudopneumoniae* (3균주), *Streptococcus oralis* (3균주), *Streptococcus sanguinis* (1균주), *Streptococcus parasanguinis* (3균주), *Streptococcus australis* (1균주), *Streptococcus gordonii* (1균주), *Streptococcus sinensis* (1균주), *Streptococcus infantis* (1균주), *Streptococcus rubneri* (1균주), *Streptococcus dentisani* (1균주)로 동정되었다. 하지만, 이들 mitis 군 연쇄구균 균주들의 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성이 99% 이상이기 때문에 향후 연구에서 이들 균주들에 대한 재동정의 필요성은 남아 있다고 생각된다.

한국인의 구강에서 분리 동정된 균주의 수종 항생제 감수성 검사 결과, 균주 대부분이 한 가지 항생제에 내성을 갖기보다는 다양한 항생제에 내성을 갖고 있었다(Table 4와 5). 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 균주들의 숙주인 환자들이 여러 항생제들에 노출된 경험이 많기 때문인 것으로 생각된다.

폴리펩타이드 계 항생물질은 세균의 세포막에 장애를

일으키는 물질로 그람 양성 세균과 그람 음성 세균에 작용하는 물질로 나뉜다. 반코마이신은 그람 양성 세균에 작용하는 항생제로 본 연구결과에서는 연쇄구균과 포도구균이 반코마이신에 각각 100%, 81.8% 감수성을 보여 이를 뒷받침 하였다. 이는 Băncescu 등[33]에 의한 연구와 일치하는 결과였다. 폴리마이신 B는 그람 음성 세균에 강력한 살균작용을 하는 항생제로 본 결과에서도 대부분의 그람 음성 세균이 폴리마이신 B에 감수성을 보였다. 페니실린 계 항생제는 β -lactam 고리를 갖고 있으며, 세포벽의 합성을 방해하여 살균작용을 일으킨다[34]. 페니실린에 대한 내성은 내성균주가 β -lactam 구조를 파괴시키는 β -lactamase의 유전자를 가지고 있어 항생제의 효능이 없어지기 때문에 생기는 것이다[35]. 페니실린은 일반적으로 연쇄구균, 포도구균에 효과적이며, 그 외에 다양한 그람 음성 세균에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 시간이 지나면서 페니실린에 대한 내성을 나타내는 세균들을 보고하는 연구가 증가하고 있다[36,37]. 본 연구결과 포도구균, 그람 음성 세균 (*Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* sp., *P. vulgaris*)들이 페니실린 계 항생제에 내성을 갖고 있는 것으로 확인되었다(Table 4와 5). 이처럼 페니실린 내성을 해결하기 위하여 β -lactamase 억제제인 clavulanic acid가 개발되었는데 이 물질은 β -lactam 고리를 파괴시키는 β -lactamase와 결합하여 활성을 억제한다. 현재 β -lactamase를 생산해 내는 포도구균이나 그람 음성 세균 감염에는 페니실린 계 물질인 아목사실린과 clavulanic acid를 혼합하여 오그멘틴이라는 제품으로 개발되어 처방되고 있다[38]. 그럼에도 본 연구 결과 오그멘틴에 내성을 보이는 세균들이 있는데, 이는 β -lactamase 억제제에 대한 β -lactamase의 결합력이 떨어져서 생긴 결과라 생각되지만[39]. 항 후 연구를 통해서 그 기전을 밝히고자 한다. 리코사미드 계 항생물질인 클린다마이신은 50S ribosomal subunit에 결합함으로써 단백질 합성을 억제하여 항균 작용을 나타낸다. 장내구균을 제외한 연쇄구균, 포도구균 및 대부분의 혐기성 세균에 효과적이거나 출혈성 대장염을 일으키는 경우가 있어서 페니실린 계 항생제에 알레르기가 있거나 내성이 있는 경우 제한적으로 사용된다. 본 연구결과 장내세균을 제외한 연쇄구균(79.3%)과 포도구균(90.9%)에 높은 감수성을 보였다.

테트라사이클린은 ribosomal의 30S 또는 50S unit에 작용함으로써 단백질 합성을 억제하는 항생제로 사람이나, 동물, 양식장 등 광범위하게 사용되는 항생제이다[40,41]. 본 연구결과 테트라사이클린에 내성을 갖는 균주들이 다수 검출되었는데, 환경에 존재하는 대부분의 세균들이 테트라사이클린에 노출되고 있기 때문에 내성

을 갖게 될 확률이 높아진 것으로 생각해 볼 수 있다. 테트라사이클린에 대한 내성균주는 일반적으로 *tetM*이라는 내성 유전자를 가지고 있는데 Villedieu 등[42]의 연구에 따르면 내성 균주 중에 따라 *tetM* 이외의 다양한 내성 유전자가 존재한다는 연구 결과가 있었다. 본 연구에서 테트라사이클린에 내성을 갖는 균주들은 향후 분자생물학적 방법을 이용하여 중에 따른 내성 유전자에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 세균 배양법과 분자생물학적 분석을 통해 한국인 21명의 구강으로부터 분리된 세균을 동정할 수 있었고, 이들의 본 연구에 사용한 8종 항생제에 대한 내성 유무를 확인할 수 있었다. 하지만, 구강에 존재하는 세균종이 1,200 여 종이나 되기 때문에 본 연구의 결과로 한국인에 존재하는 세균들의 항생제 내성에 대한 대표 자료라고 할 수 없다. 그러므로 항 후 연구를 통하여 더 많은 한국인 유래 구강 세균들을 분리 동정하여 항생제 내성 검사를 실시한다면, 우리나라 국민들의 구강 세균 감염성 질환의 치료에 항생제 내성 검사 전 항생제 처방의 기본 자료를 제공할 수 있을 것이라 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

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721-5732. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
2. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183:3770-3783. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001.
3. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J*

- Bacteriol. 2010;192:5002-5017. doi:10.1128/JB.00542-10.
4. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5: 78-111. doi: 10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x.
 5. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;36:14-26. doi: 10.1111/j.1600-0757.2004.03671.x.
 6. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1979;6:351-382. doi: 10.1111/j.1600-051X.1979.tb01935.x.
 7. Whaley RA, Bighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13: 195-216.
 8. Berbari EF, Cockerill III FR, Steckelberg JM. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganism. *Mayo Clin Proc*. 1997;72:532-542.
 9. Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Turkoglu O, Kose T, Dahlen G. Periodontal infections and pre-term low birth weigh: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2005;32: 174-181. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00670.x.
 10. Gupta S. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis-focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis*. 1999;143: 1-6.
 11. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*. 2000;71:1554-1560. doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1554.
 12. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR., Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*. 1998;3:233-250.
 13. Aracil B, Minambres M, Oteo J, Torres C, Gomez-Garces JL, Alos JJ. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M pheno-type) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:592-594. doi: 10.1093/jac/48.4.592.
 14. Groppo FC, Castro FM, Pacheco AB, Motta RH, Filho TR, Ramacciato JC, Florio FM, Meechan JG. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and oral streptococci strains from high-risk endocarditis patients. *Gen Dent*. 2005;53:410-413.
 15. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*. 2004;31:996-1002. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00597.x.
 16. Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent RL Jr, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005;32:33-39. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00624.x.
 17. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM & Brent Red. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience. 1990;241-245.
 18. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1985;82: 6955-6959.
 19. Kim YM, Kim JJ, Kim M, Park SN, Kim HS, Kook JK, Kim HK. Identification and antibiotic susceptibility of the bacteria from non-odontogenic infectious lesions. *Int J Oral Biol*. 2014;39:87-95. doi: <http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2014.39.2.089>.
 20. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray ER, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*, 7th Ed, ASM press, Washington, 1999;1526-1543.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 2007;7th ed. Approved standard M7-A7. Wayne, Pa, USA.
 22. La Scola B, Raoult D. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. *J Clin Microbiol*. 1998;36:866-871.
 23. May T, Amiel C, Lion C, Weber M, Gerard A, Canton P. Meningitis due to *Gemella haemolysans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12:644-645.
 24. Nonaka Y, Kiyofuji C, Takano Y, Ito K. Pyogenic vertebral osteomyelitis caused by *Gemella haemolysans*. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2000;10:980-982. doi: 10.2169/naika.89.980.
 25. van Dijk M, van Royen BJ, Wuisman PI, Hekker TA, van Guldener C. Trochanter osteomyelitis and ipsilateral arthritis due to *Gemella morbillorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18:600-602.
 26. Kong R, Mebazaa A, Heitz B, De Briel DA, Kiredjian M, Raskine L, Payen D. Case of triple endocarditis caused by *Rothia dentocariosa* and results of a survey in France. *J Clin Microbiol*. 1998;36:309-310.
 27. Larkin J, Montero J, Targino M, Powers A, Accurso C, Campbell M. *Rothia dentocariosa* Endocarditis. *Clin Microbiol News let*. 2001;23:13-15. doi: 10.1016/S0196-4399(01)89052-8.
 28. Soto-Hernandez JL, Morales VA, Lara Giron JC, Balderrama Banares J. Cranial epidural empyema with osteomyelitis caused by *actinomyces*, CT, and MRI appearance. *Clin Imaging*. 1999;23:209-214.
 29. Vandeveld AG, Jenkins SG, Hardy PR. Sclerosing osteomyelitis and *Actinomyces naeslundii* infection of surrounding tissues. *Clin Infect Dis*. 1995;20:1037-1039.
 30. Friedlander AH. *Proteus vulgaris* osteomyelitis of the mandible Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1975;40:39-44.
 31. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45:406-408.
 32. Park SN, Choi MH, Kook JK. Molecular identification of anginosus group streptococci isolated from Korean oral cavities. *Int J Oral Biol*. 2013;38:21-27. doi: <http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2013.38.1.021>.
 33. Băncescu G, Skaug N, Dumitriu S, Băncescu A. Antimicrobial susceptibility of some streptococci strains of anginosus group isolated from oral and maxillofacial infections. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 1999;58:57-63.

34. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:825-869.
35. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8:525-533. doi: 10.1016/j.mib.2005.08.016.
36. Bantar C, Fernandez CL, Relloso S, Lanza A, Bianchini H, Smayevsky J. Species belonging to the "*Streptococcus milleri*" group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2020-2022.
37. Shin KM, Choe SJ, Lee SY. Antimicrobial susceptibility of viridans streptococci plaque isolates in Korea. *Int J Oral Biol.* 2008;33:197-203.
38. Wang X, Minasov G, and Shoichet BK. The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J Biol Chem.* 2002;277:32149-32156. doi: 10.1074/jbc.M204212200.
39. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Nevot P, Krishnamoorthy R, Paul G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett.* 1994;120:75-80. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x>.
40. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65:232-260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
41. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;19: 1-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x>.
42. Villedieu A, Diaz-Torres ML, Hunt N, McNab R, Spratt DA, Wilson M, Mullany P. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:878-882. doi: 10.1128/AAC.47.3.878-882.2003.