

기초임상미생물학 실험

그람양성 막대균 동정

L. monocytogenes E.
rhusiopathiae

황유연



학습 내용

- 그람양성 막대균의 분류를 설명할 수 있다
 - *Bacillus anthracis*와 *Bacillus cereus*의 다른 점을 설명할 수 있다
 - *Corynebacterium diphtheriae*의 동정방법을 설명할 수 있다
 - *Listeria monocytogenes*의 동정방법을 설명할 수 있다
 - *Erysipelothrix rhusiopathiae*의 동정방법을 설명할 수 있다
 - *Nocardia* spp. 의 동정방법을 설명할 수 있다.
-

호기성 그람양성 막대균 분류

| 균속 | CATALASE | 균종 | 감염증 |
|-----------------|----------|------------------|----------|
| Bacillus | 양성 | B. anthracis | 탄저 |
| | | B. cereus | 식중독, 패혈증 |
| Corynebacterium | 양성 | C. diphtheriae | 디프테리아 |
| Listeria | 양성 | L. monocytogenes | 패혈증, 수막염 |
| Nocardia | 양성 | N. asteroides | 폐렴, 농양 |
| Erysipelothrix | 음성 | E. rhusiopathiae | 유단독 |
| Lactobacillus | 음성 | | |

Bacillus spp.

Bacillus anthracis

- 혈액천에 잘 자람
- 비용혈, 불규칙한 원형으로 형태가 다양
- 물결모양의 가장자리, 불투명
- 백금이로 집락을 들어올리면 점조성이 있어 휘저은 달걀흰자처럼 끓어 올려진다.
- comma형태, 해파리모양 medusa head를 닮은 곱슬머리 curled hair 모양

탄저병

운동성 -

Penicillin S



Bacillus cereus

- 베타 용혈, 녹색, 원형, 젓빛 유리모양
- Bacillus anthracis에 비해 작음
- 구토형: heat stable toxin(emetic toxin), 오염된 볶은 쌀 요리 등
- 설사형: heat labile enterotoxin, 오염된 육류, 채소, 소스 등,
- 음식을 정량배양(>10⁵CFU/1g 식중독 판정, 집단감염)

식중독, 패혈증

운동성 +

Penicillin R



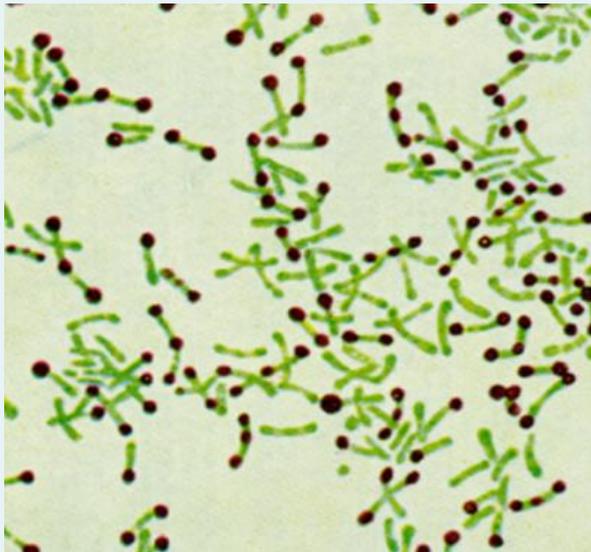
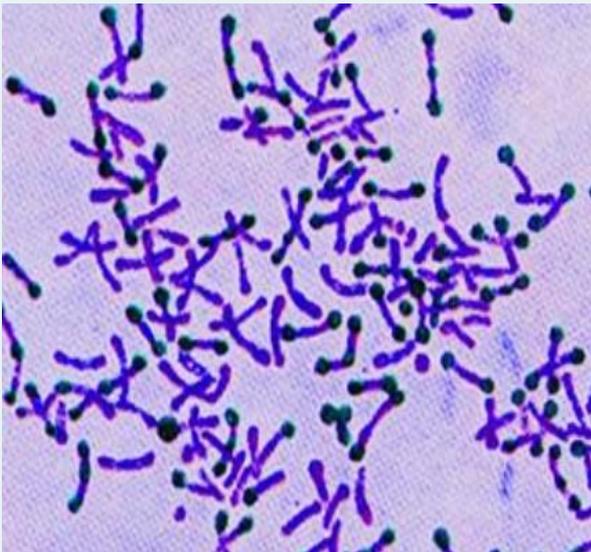
Bacillus spp.

| | | Bacillus anthracis | Bacillus cereus | Bacillus subtilis |
|----------------------|----------|--------------------|-----------------|-------------------|
| 병원성 | | 탄저균 | 식중독 | 고초균 |
| Nitrate, Citrate, VP | | + | + | + |
| Hemolysis | | - | β | 약한 β |
| Capsule | | + | - | - |
| Motility | | - | + | + |
| Lecithinase | | + | + | - |
| Gelatin 액화능 | | - | + | + |
| PEA 발육능 | | - | + | + |
| 50°C Growth | | 42~45°C G | NG | G |
| 당분해능 | Glucose | + | + | + |
| | Lactose | - | - | - |
| | Sucrose | + | + | + |
| | Maltose | + | + | |
| | Xylose | - | - | |
| | Mannitol | - | - | + |
| | Salicin | - | + | |

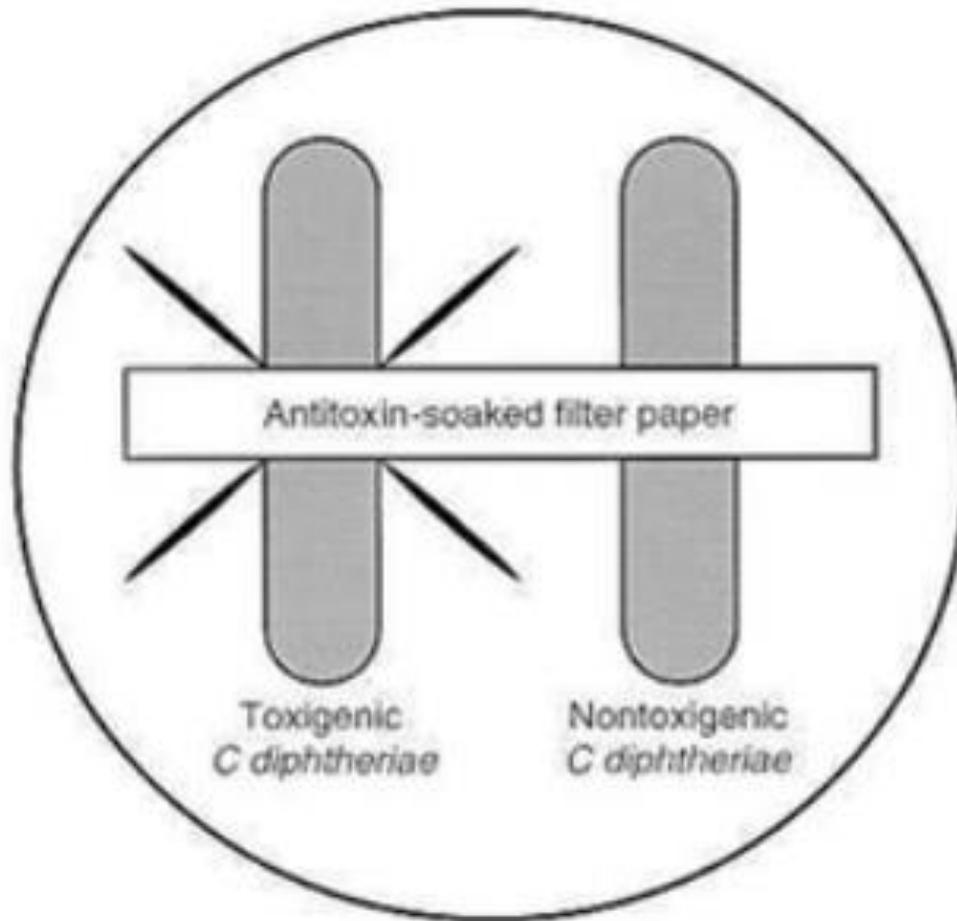
Corynebacterium diphtheriae

- 무아포, 산소성 그람양성 막대균, Catalase(+), 운동성(-), 외독소
- Catalase(+), 운동성(-)
- Corynebacterium diphtheriae의 Gram 염색성과 형태
- 그람양성 막대 균이며 곤봉모양의 막대 균이다.
- 균의 배열은 L이나 V자 모양의 특징이 있다.
- Elek 젤 확산법: 독소생성시험(최종 동정시험)
- Elek 배지를 녹여 항독소 여과지를 넣고 배지를 부어 굳힌다. 이에 C. diphtheriae 균을 획선 배양한다. 여과지와 획선 배양 사이에 침강선이 형성된다.
- 외독소(exotoxin) 생성
- Elek 젤 확산법 시험 배지 : Loeffler serum medium

Corynebacterium diphtheriae

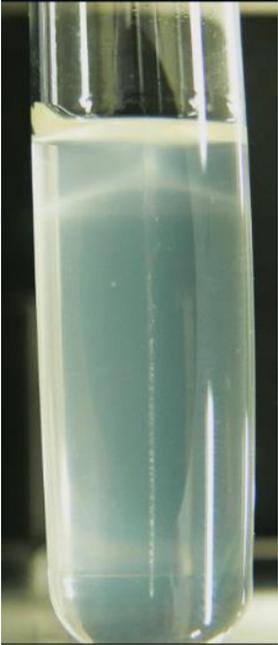
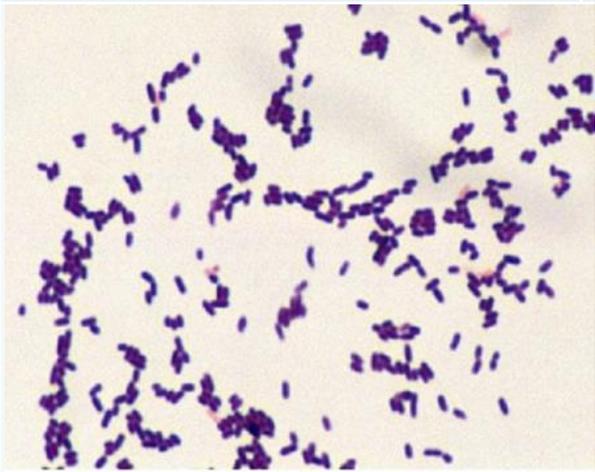
| Gram stain | Metachromatic granule stain | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Albert's Stain | Neisser's Stain |
| <ul style="list-style-type: none">▪ Straightly Bacilli▪ Club Shaped(곤봉모양)▪ V,W,X,Y자 배열 | <ul style="list-style-type: none">▪ 이염소체 : Violet green▪ Cell Body : Greenish yellow | <ul style="list-style-type: none">▪ 이염소체 : Black▪ Cell Body : Brown black |
|  |  |  |

Corynebacterium diphtheriae



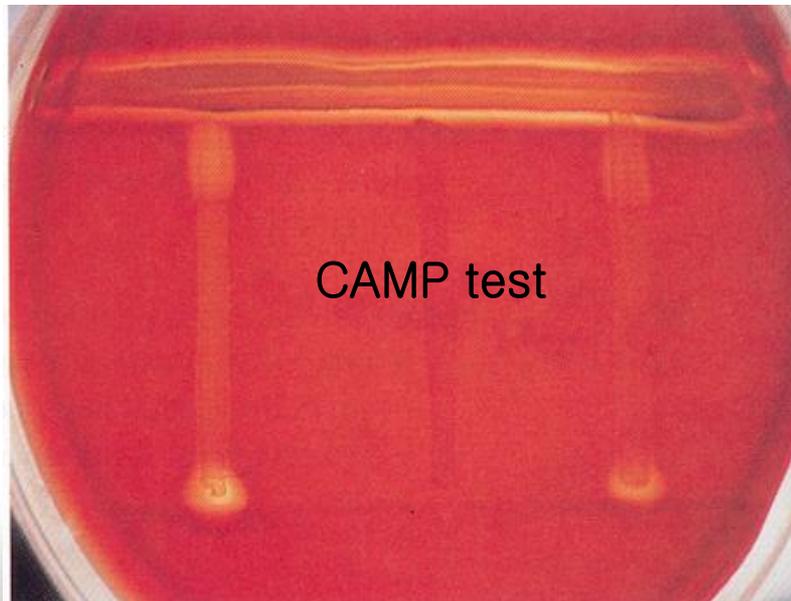
Elek 젤 확산법 시험 배지 : Loeffler serum medium

Listeria monocytogenes

| Gram stain | Semisolid agar | Blood agar plate |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 그람 양성 막대균 | <p>실온에서 Umbrella type의 운동성</p>  | <ul style="list-style-type: none">• Tiny, pinpoint colonies, β-hemolysis• β-streptococci와 구분은 그람염색 양상과 catalase 로 확인• 4°C에서도 증식• β-hemolysis groundglass 모양• Penicillin S |
|  | |  |

Listeria monocytogenes

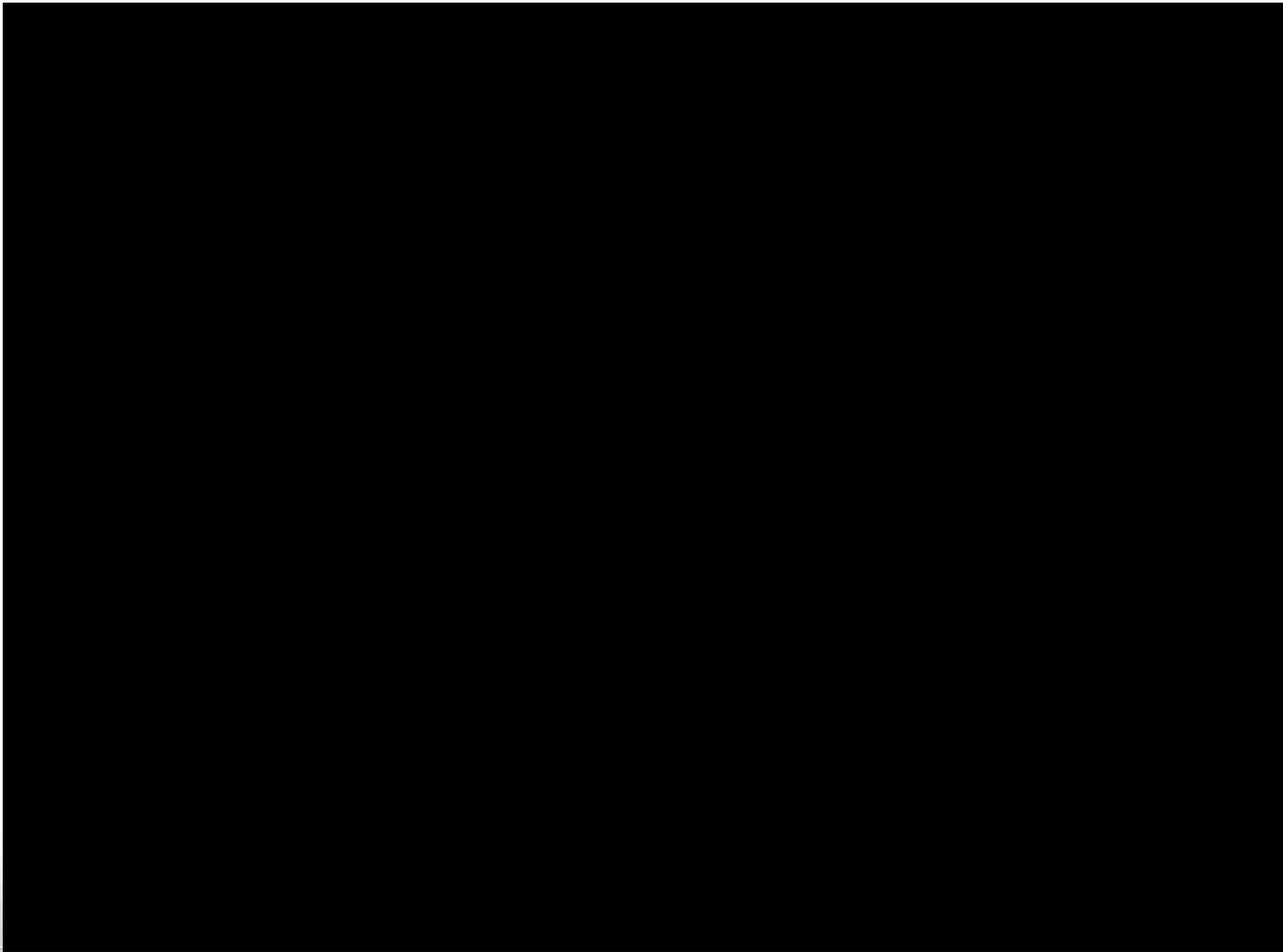
- Listeria spp. 중 L. monocytogenes만 병원성 임
- CAMP +, Hippurate +, Bile-esculin +, VP +
- 패혈증, 수막염
- 25 °C 에 6시간 액체 배양: 구르는 듯한(tumbling) 운동(BHI, TSB)



- *Listeria monocytogenes* (양성)
- *Erysipelothrix rhusiopathiae* (음성)
- *S. agalactiae*와 같은 큰 삼각형 용혈대 없음
- 버섯모양 둥근 용혈 항상 보임

Listeria monocytogenes

25°C에 6시간 액체 배양: 구르는 듯한(tumbling) 운동



Erysipelothrix rhusiopathiae

- Listeria와 형태가 비슷한 균
- 그람양성 막대균으로 곧거나 약간 굽고 가는 막대 균이며 크기는 $0.2\sim 0.4 \times 0. \sim 2.5 \mu\text{m}$
- 긴 필라멘트상으로 보이기도 함
- 비운동성, 비아포
- 조건무산소성으로 포도당을 분해하여 산은 생성하지만 가스는 생성하지 않음
- 카탈라아제 음성
- 동물, 조류, 생선에 인수공통감염
- 동물을 취급하는 사람의 직업병으로서 유단독을 일으킨다.(피부감염)
- Vancomycin 에 자연내성, Penicillin으로 치료
- KIA성상으로 구분 : A/A, H₂S+(미량)

Erysipelothrix rhusiopathiae



동물, 조류, 생선에 인수공통감염



Erysipelothrix rhusiopathiae

Gram stain

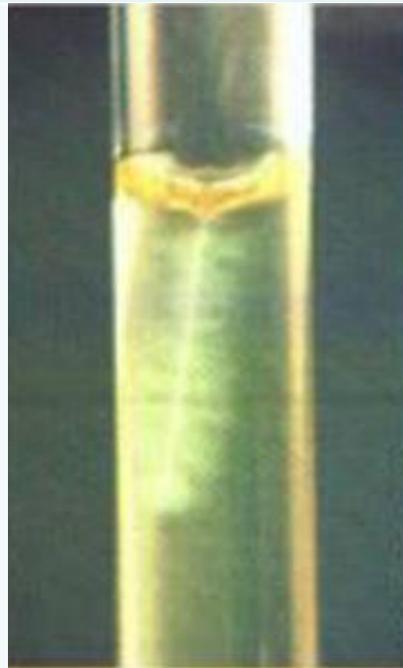
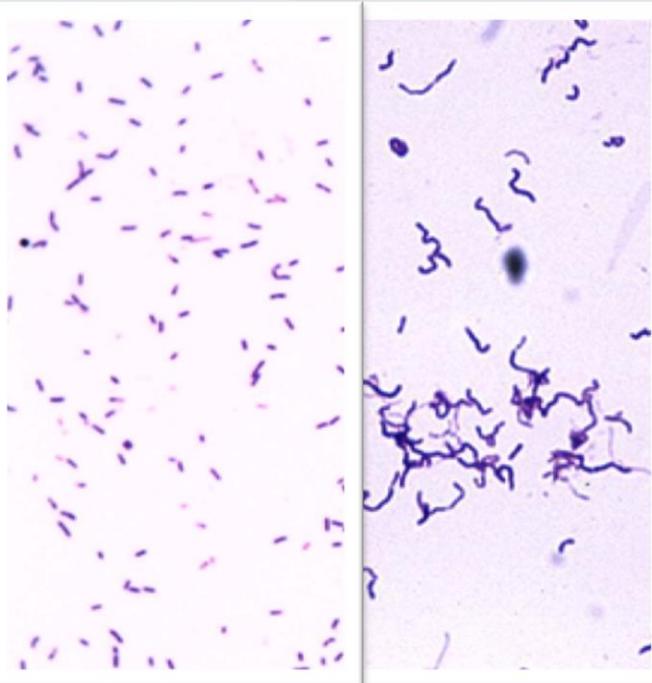
그람 양성이지만 쉽게 탈색될 수 있고 구슬모양을 보인다. 매끄러운(smooth) 집락을 염색하면 막대균과 구간균이 보이고 조면상(rough) 집락을 염색하면 긴 막대균으로 보인다.

Gelatin media

Gelatin 배지에 천자 접종하여 22°C에서 배양했을 때 “파이프 클리너” 병뚜는 솔 같은 모양으로 자란다

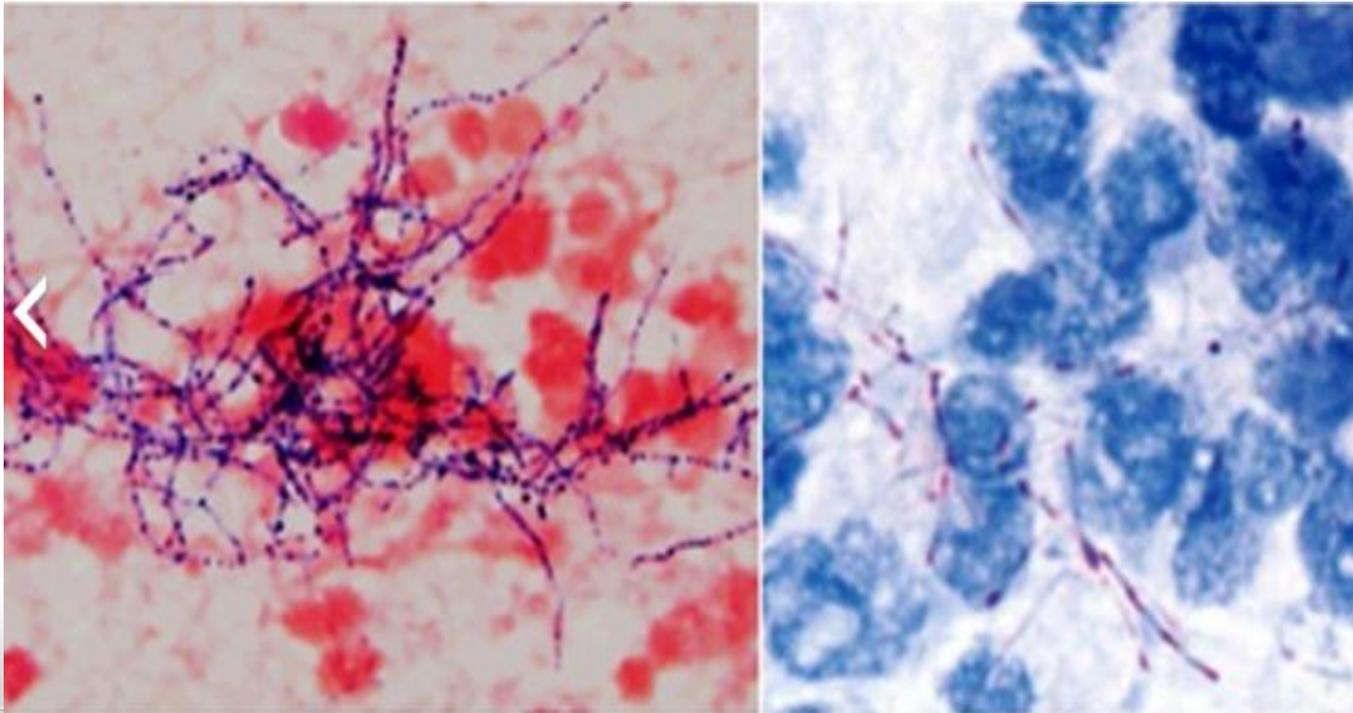
TSI, Triple sugar Iron

KIA성상 : A/A, H₂S +(미량)



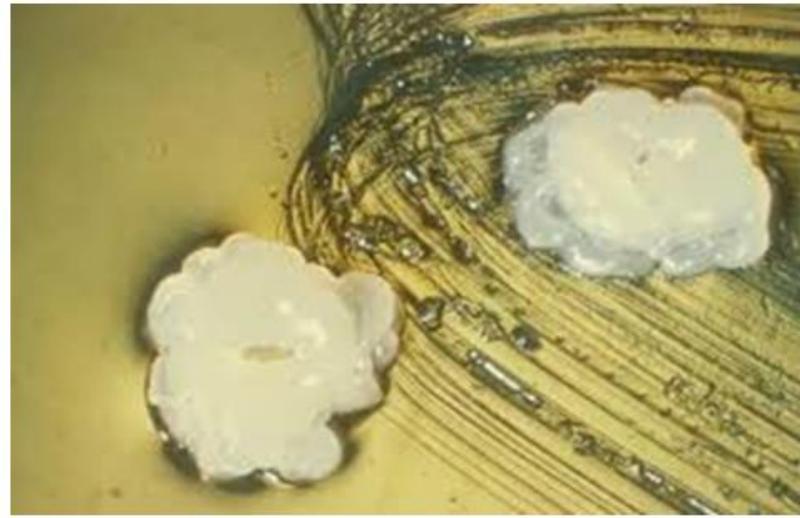
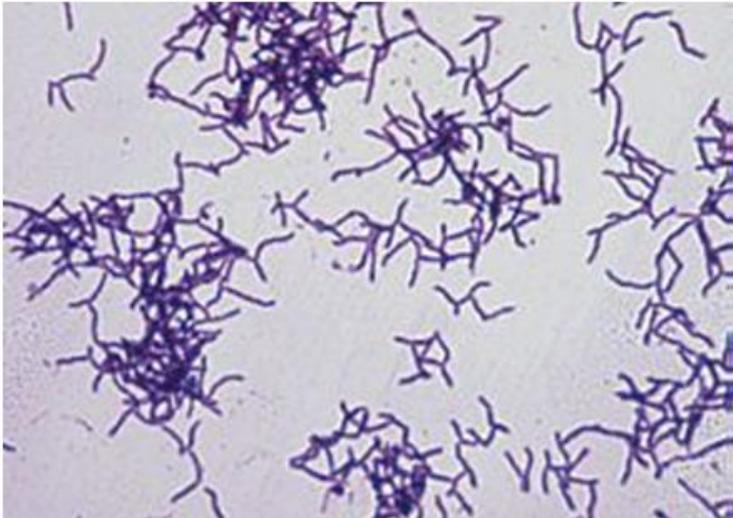
Nocardia spp.

- 가지가 있는그람양성 막대균, 염색성이 다양, 크기는 0.5-1.2 μm
- 짧거나 또는 긴 곁가지 모양의 기중균사를 형성
- 아포가 없으며 비운동성
- 성장단계에 따라 약 항산성으로 염색
- 영양우무에 발육, 산소성, 카탈라아제 양성



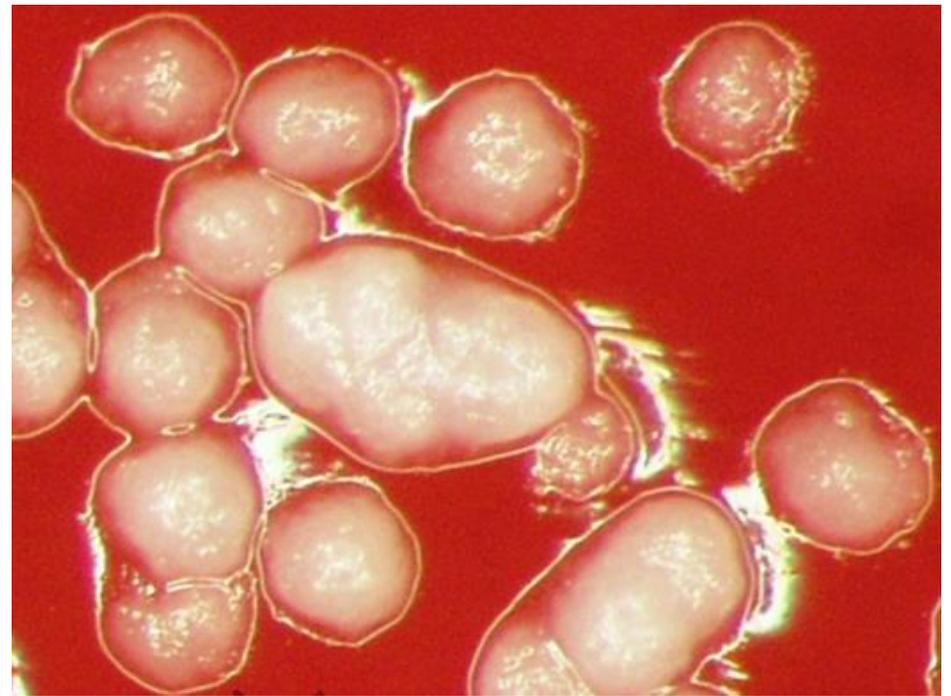
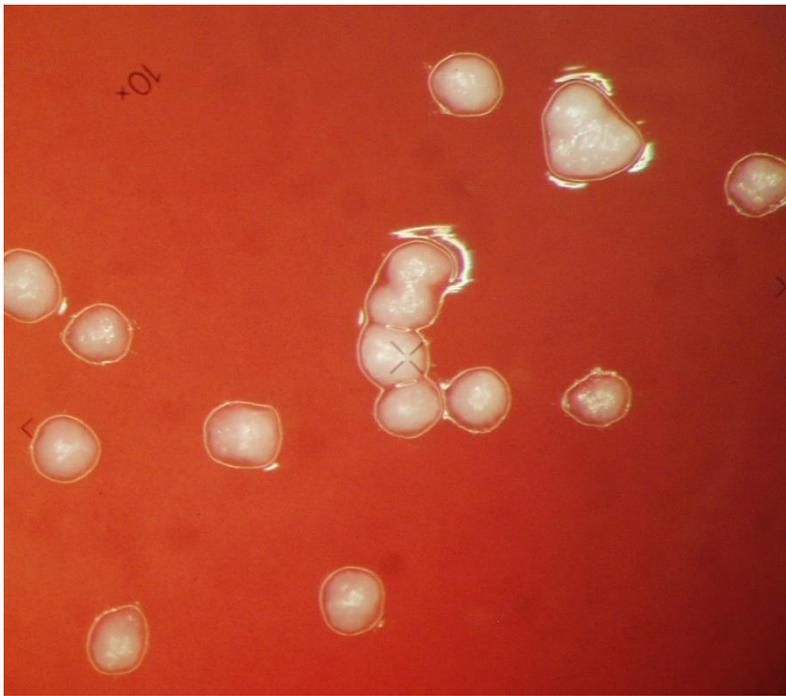
Actinomyces spp.

- 가지가 있고 가늘고 곧거나 약간 굽은 그람양성막대 균, 크기는 $0.2-1.0 \times 2-5 \mu\text{m}$ 이지만 길이가 $10-50 \mu\text{m}$ 나 되는 필라멘트상의 모양을 하기도 함
- 아포가 없으며 편모가 없어 비운동성, 카타라아제 음성
- Y, V, T 모양의 배열을 하거나 철책상(palisades) 배열을 하기도 한다.
- 조건무산소성 이지만 무산소적으로 잘 발육하며 배양을 할 때에 CO_2 를 증가시키면 잘 발육한다.



Actinomyces spp.

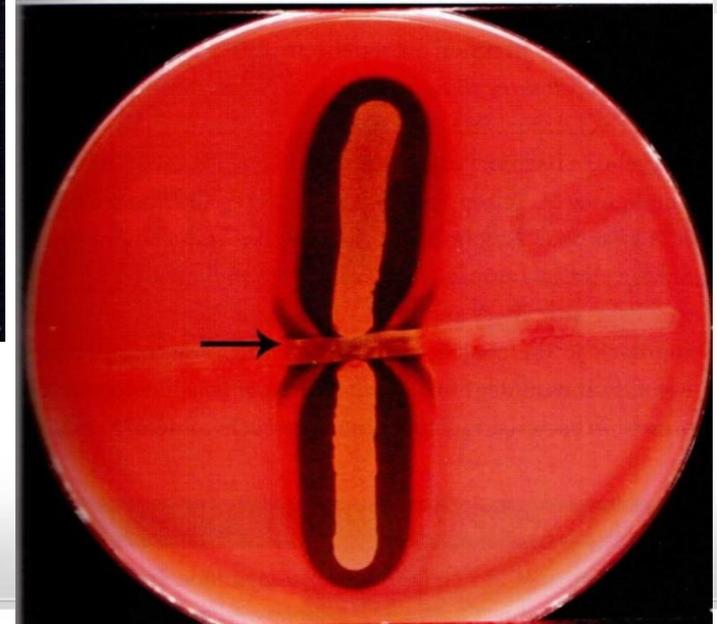
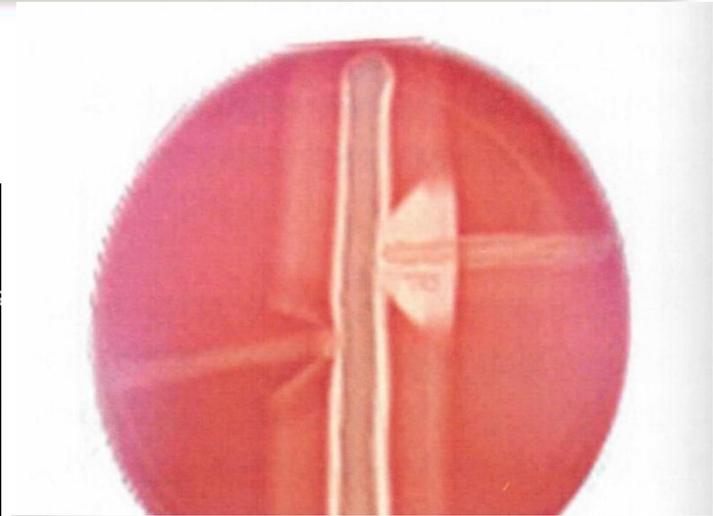
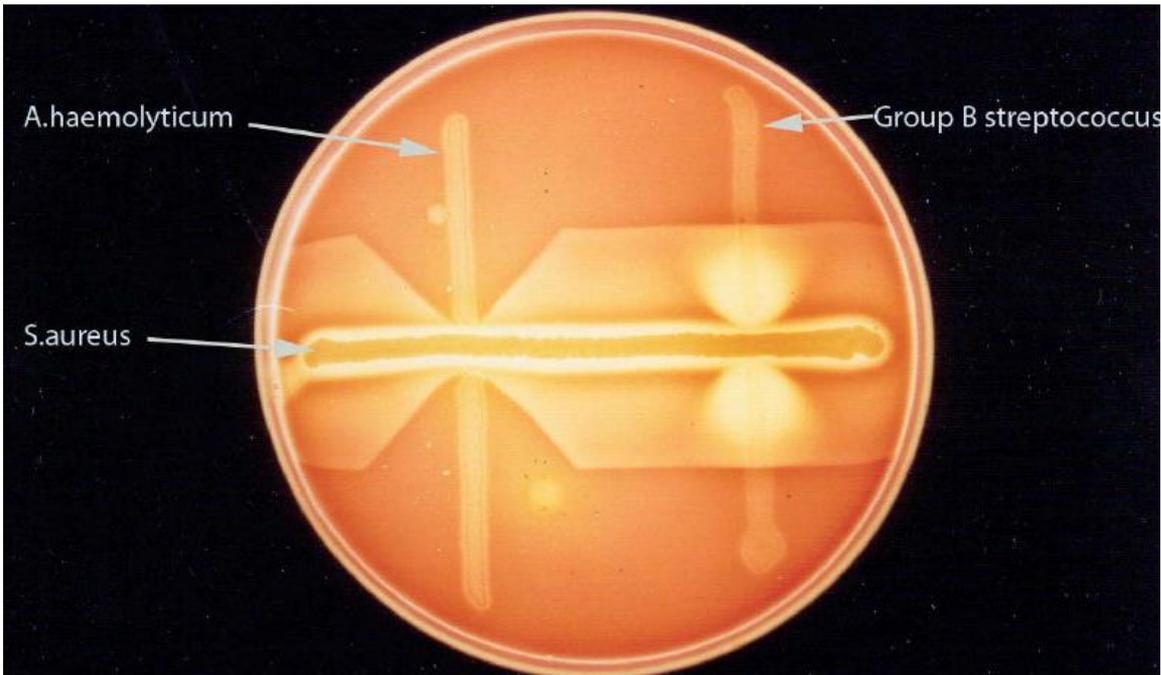
Actinomyces israelii



Brucella agar 2일

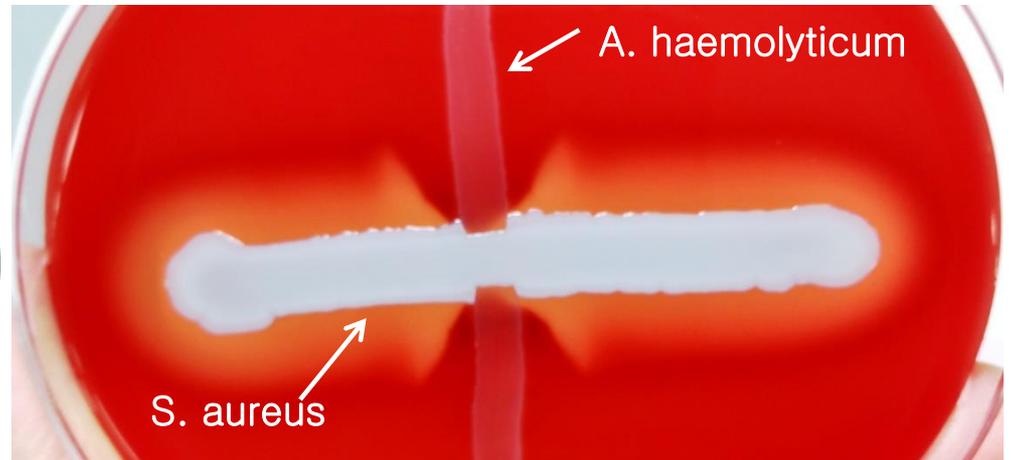
Arcanobacterium haemolyticum

Reverse CAMP test 양성, Catalase : (-)



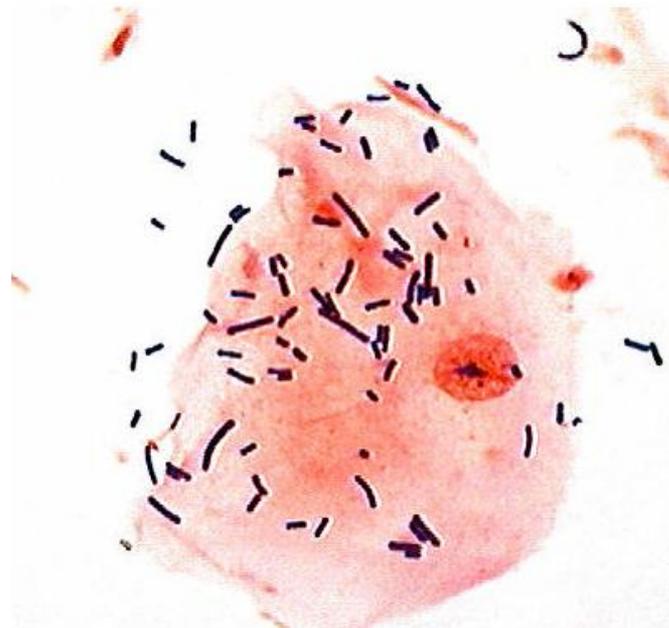
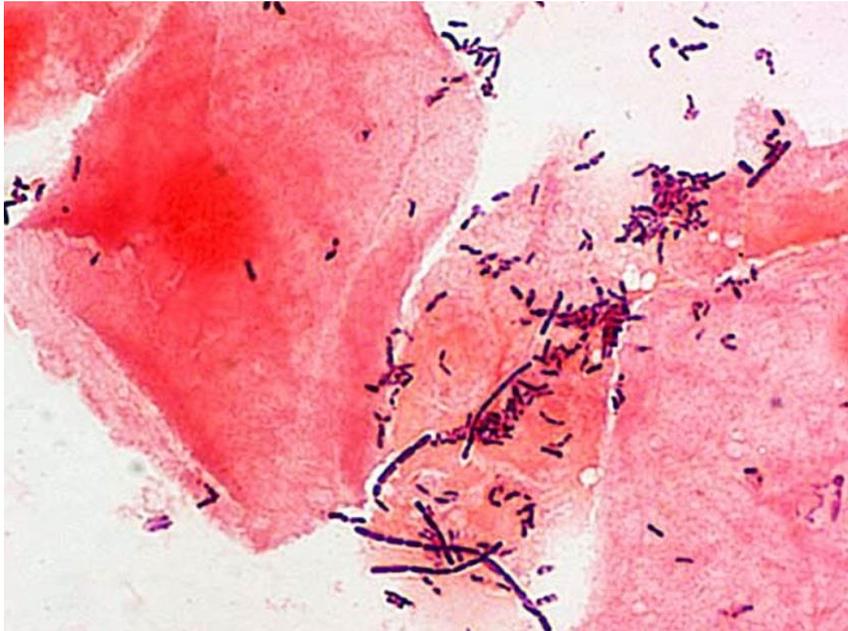
Arcanobacterium haemolyticum

Reverse CAMP test



Lactobacillus spp.

- 건강한 여성의 vaginal smear
- Lactobacillus 가 pH를 조절함
- 정상무리균

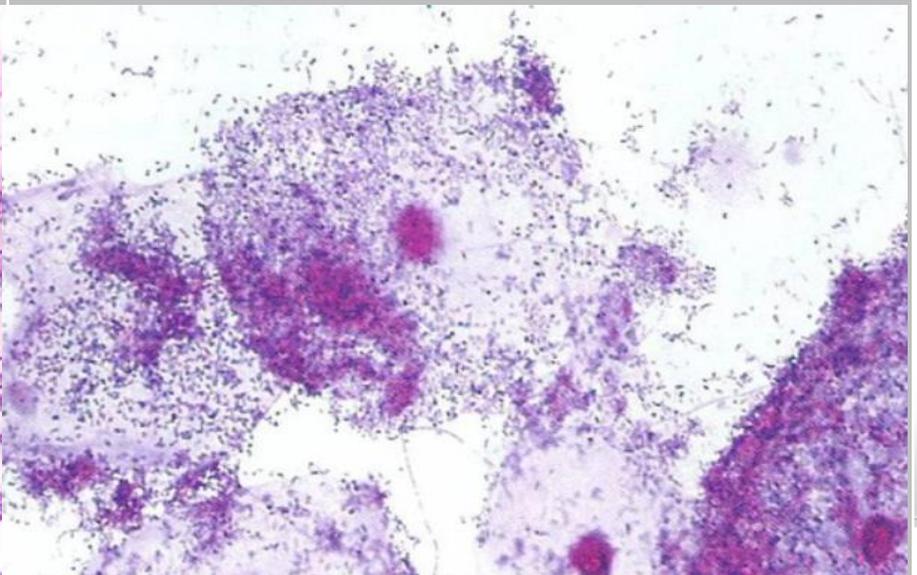


Lactobacillus spp._Gardnerella vaginalis

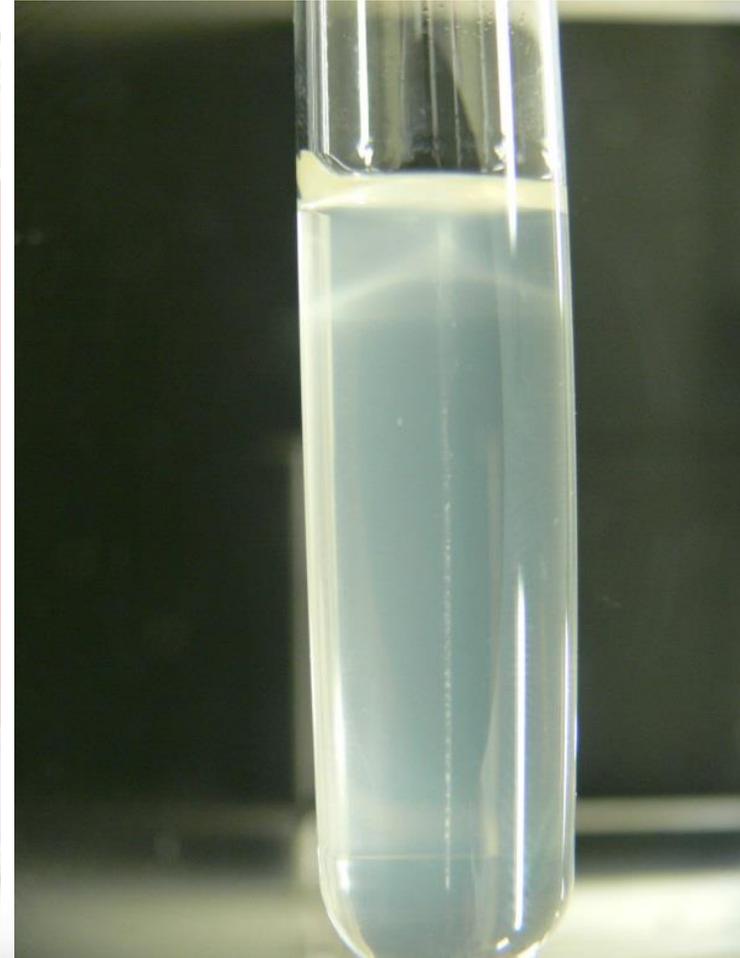
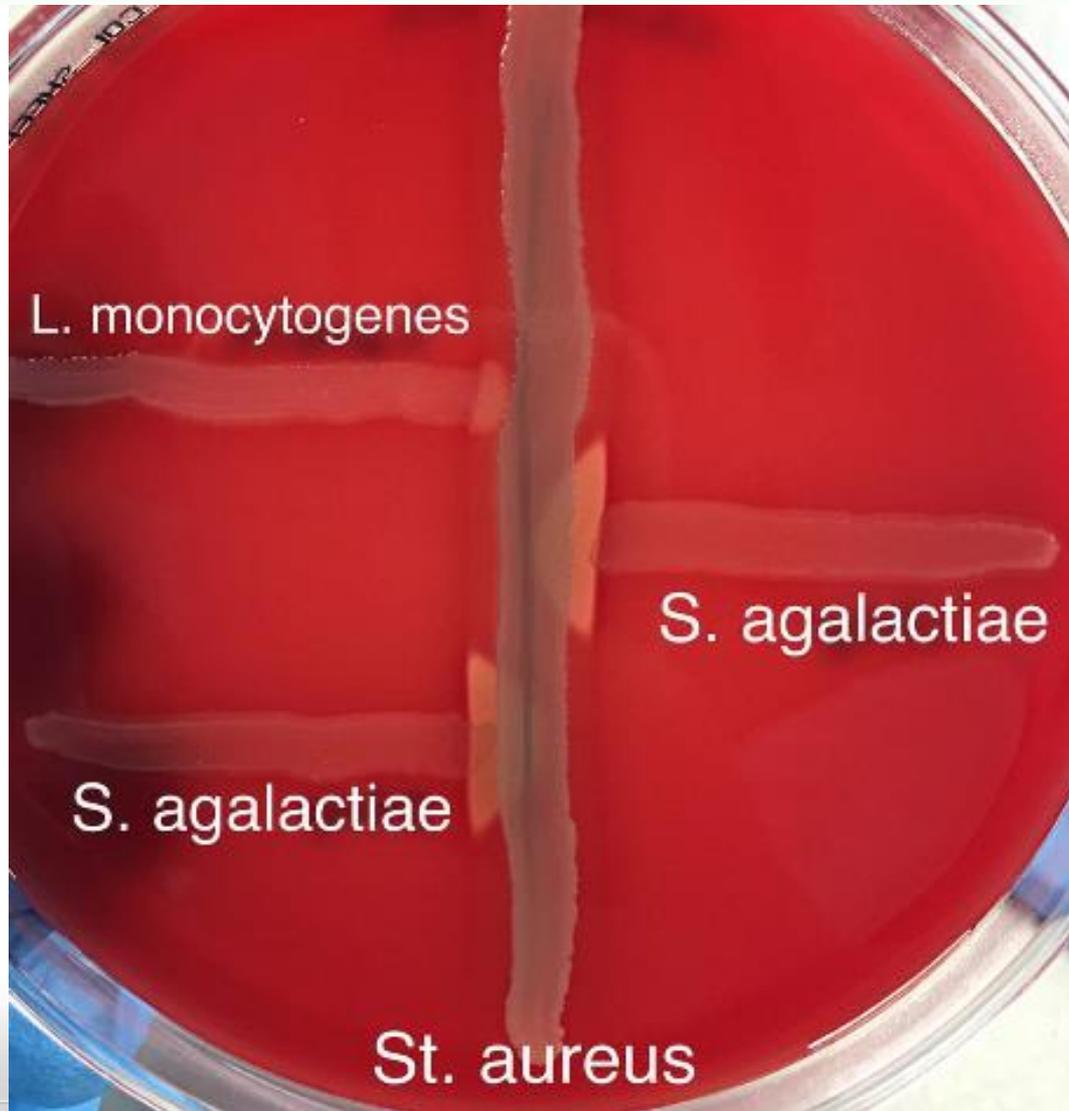
- 여성 질의 정상무리 균이지만 무산소성 세균과 함께 질염을 일으킴
- *bacterial vaginosis* 진단은 도말 염색 경검이 더 정확함으로 통상적인 배양검사는 필요하지 않다.
- 질 검체 소견
 - 점조성이 없는 분비물이 많다.
 - pH가 4.6 이상이고 10% KOH 첨가 시 생선비린내가 난다.
 - Lactobacillus 가 감소하고 상대적으로 Clue cell이 10~20% 이상 나타난다.

G. vaginalis는 염색이 약하게 그람양성과 음성으로 다양하게 나타나며 막대균과 구균으로 보임. 그람염색성 때문에 이 세균은 이전에 *Corynebacterium* 또는 *haemophilus*로 분류되었었다.

Clue cell 표면에 G. Vaginalis가 다닥 다닥 붙어 있는 모습. clue cell은 세균성 질염 환자의 질 검체로 세균들로 덮인 상피세포를 말한다.



L. monocytogenes_E. rhusiopathiae

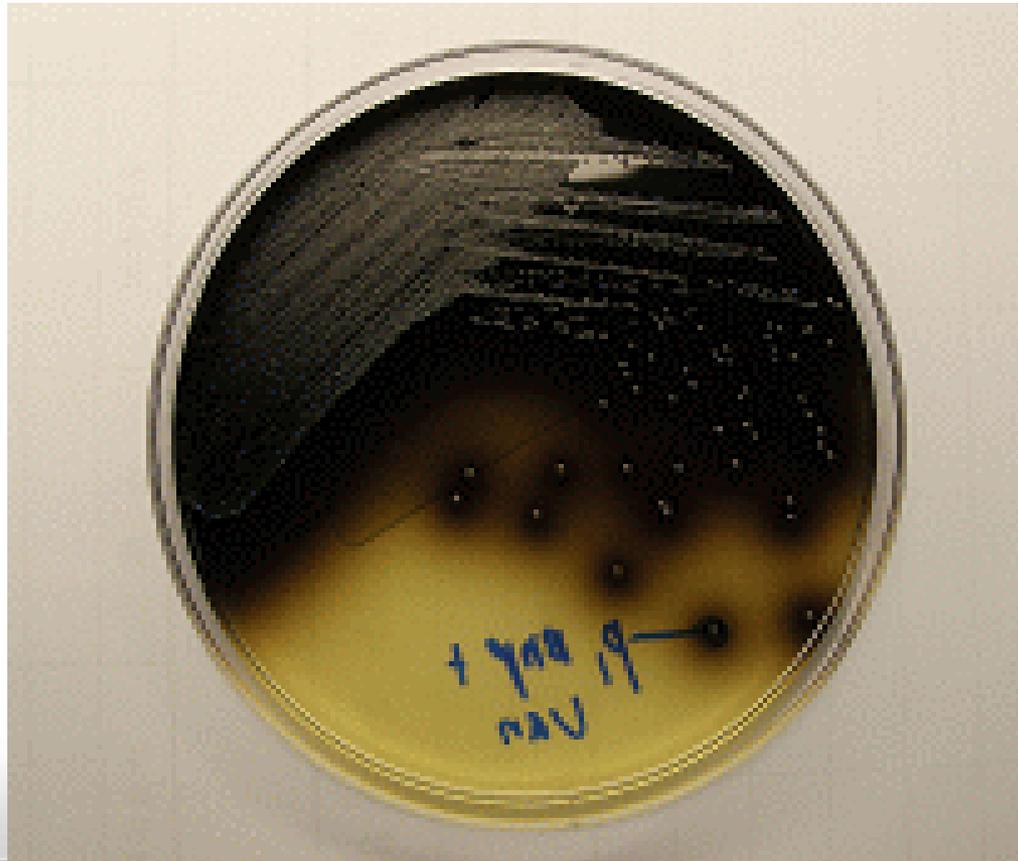


L. monocytogenes_E. rhusiopathiae, VP test

- 목적
 - *Listeria monocytogenes* (양성)와 *Erysipelothrix rhusiopathiae* (음성) 감별
- 원리
 - 세균이 Glucose를 분해, acetoin (acetylmethylcarbonyl) 생성
 - Acetoin + 40% KOH + O₂ → Diacetyl
 - Diacetyl + 0.5% α-naphthol or creatine(축매작용)→ 적색 (양성)
- 재료
 - V-P 배지, A 시약 (40% KOH), B 시약 (0.5% α-naphthol)
- 검사 방법
 - V-P배지에 균접종 35°C에서 24~48시간 배양
 - 배양된 배지 1 mL에 시약 A 0.3 mL과 시약 B 0.1 mL 넣고 세게 흔든다
- 판독
 - 양성 : 10~15분 후, 1시간 이내 적색
 - 음성 : 변화없음

L. monocytogenes_E. rhusiopathiae, Bile esculine, 6.5% NaCl

- *L. monocytogenes* (+/+)
- *Erysipelothrix rhusiopathiae* (-/-)



L. monocytogenes_E. rhusiopathiae, Bile esculine, 6.5% NaCl

| Tests | L. monocytogenes | E. rhusiopathiae | C. diphtheriae |
|------------------|------------------|------------------|----------------|
| Catalase | + | - | |
| Oxidase | - | - | |
| Motility(25°C) | + | - | |
| Hemolysis | β | -/ α | |
| CAMP | + | - | |
| 6.5% Nacl | + | - | |
| Dnase | + | - | |
| Hippurate | + | - | |
| Esculin | + | - | |
| H ₂ S | - | + | |
| Urea | not determined | not determined | + |
| Pot. tellurite | not determined | not determined | + |