

Nested 중합효소 연쇄반응법을 이용한 화상 환자에서의 녹농균 검출 — 혈액 배양법과의 비교 —

한림대학교 의과대학 한강성심병원 외과학교실

임민균 · 김동건 · 김정진 · 김종현 · 김이수 · 우영민 · 김 성 · 윤대원 · 최창식

Identification of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Patients by Nested Polymerase Chain Reaction

— Special reference to comparison with conventional blood culture —

Min-Gyun Im, M.D., Dong-Kun Kim, M.D., Jung-Jin Kim, M.D., Jong-Hyun Kim, M.D., Lee-Soo Kim, M.D., Young-Min Woo, M.D., Sung-Kim, M.D., Dai-Won Yoon, M.D. and Chang-Sig Choi, M.D.

Purpose: *Pseudomonas aeruginosa* has emerged as one of the most problematic bacteria in modern hospital settings, and this organism is increasingly isolated as a nosocomial pathogen. Burn patients are particularly susceptible to *Pseudomonas* infection. Therefore, the accurate and sensitive microbiologic tests are needed for strict management of this prevalent microorganism.

Methods: A nested polymerase chain reaction test based on consecutive amplification of the lipoprotein genes, *oprL* and *oprI*, was designed and evaluated, in comparison with the conventional blood culture, for its ability to detect *Pseudomonas aeruginosa* in clinical materials of burn patients.

Results: Positive results of PCR based on *oprL* gene were observed only for *Pseudomonas aeruginosa*. All other bacteria ($n=4$) tested by this amplification method were negative. Also the lowest detection level was 1×10^1 bacteria per ml of blood samples. In addition, PCR afforded a significantly higher detection rate for *Pseudomonas aeruginosa* than the conventional blood culture technique in clinical materials of burn patients (25.9% vs. 8.6%).

Conclusion: This study suggests that the nested PCR technique is highly specific and sensitive test for detection

of *Pseudomonas aeruginosa*, and therefore it may be a useful adjunct tool, in combination with other conventional techniques, for detection of *Pseudomonas aeruginosa* infection. (*J Korean Surg Soc* 2001;60:16-22)

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Polymerase chain Reaction

중심 단어: 녹농균, 중합효소 연쇄반응법

Department of Surgery, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

녹농균은 기회 감염을 일으키는 가장 흔한 균주의 하나로서 면역 기능이 떨어지는 화상 환자에서 녹농균에 의한 감염은 폐렴이나 패혈증 등의 치명적인 합병증을 초래할 수 있으며, 특히 화상 환자를 관리하는 화상 중 환자실의 경우 녹농균에 의한 오염이 빈번하여 이에 대한 대책이 필요하다.(1)

더욱이 녹농균은 세포 외막의 지질 단백에 의한 세포 투과성 및 유출 전달 체계의 변화에 의하여 일반 항균제에 대한 내성을 가지게 되며 살균제에서도 생존할 수 있다고 알려져 있어 녹농균 감염에 대한 치료 또한 쉽지 않은 실정이다. 따라서 녹농균에 의한 기회 감염을 효과적으로 줄이기 위해서는 신속하고도 정확한 녹농균의 동정이 선행되어야 하며 이들 녹농균에 의한 기회 감염을 예방하기 위해서는 임상적 측면뿐만 아니라 역학적 측면에서 이들 녹농균주에 대한 연속적이고 엄격한 관리가 이루어져야 할 것이다.

화상 환자에서 녹농균 감염의 진단에는 조직 생검 및 조직 배양이나 혈액 배양을 이용한 세균 검사 방법이 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 이들 검사법은 균의 동정을 위한 조직 및 혈액 배양에 최소한 2~3일이 소요되고, 항균제를 사용하는 경우 녹농균 검출률이 낮아지며 녹농균주(*pseudomonadaceae*) 사이의 분별도(*discriminatory power*)가 떨어지는 것으로 되어 있어 실질적으로 녹농균 진

책임저자: 김동건, 서울시 영등포구 영등포동 94-200
☎ 150-020, 한림의대 한강성심병원 일반외과
Tel: 02-2639-5442, Fax: 02-678-4386

접수일 : 1999년 10월 26일, 게재승인일 : 2000년 12월 5일
본 논문은 1999년도 한림대학교 의료원 연구비 지원으로 이루어진 것임.

단이 어려울 뿐만 아니라 이에 대한 신속한 처치가 어려울 수 있겠다.(2)

그러나 최근 들어 세균이 가지는 고유의 핵산을 이용하는 여러 가지 분자생물학적 검사 기법, 즉 유전자형별 (genotyping)을 사용한 검사기법이 실험실 연구의 수준을 벗어나 임상 미생물학 분야에 실질적으로 응용되기 시작하면서 기존의 진단 방법이 갖는 단점을 보완할 수 있는 것으로 인정받아 왔다.(3) Daniel De Vos 등(4)은 녹농균의 세포외막 지질 단백 유전인자 *oprL* 및 *oprI*에 근거한 Multiplex PCR을 이용한 진단법이 기존의 검사 방법에 비하여 녹농균 검출에 높은 민감도와 특이도를 보이며, 특히 *oprL*은 현재까지 알려진 20종 이상의 녹농균 중 *Pseudomonas aeruginosa*에 특이한 유전인자로 보고하고 있어 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 감염 빈도가 비교적 높은 화상 환자에서 임상적으로 매우 유용한 가치가 있으리라고 판단된다.

본 연구는 화상 환자로부터 얻은 혈액에 대하여 *Pseudomonas aeruginosa* 고유의 *oprL* gene에 근거한 nested 중합효소 연쇄반응법을 이용한 녹농균 검출을 시도함으로써 첫째, 분자생물학적 기법의 하나인 중합효소 연쇄반응을 이용한 검출 방법의 모델을 확립하고, 둘째 이와 같이 확립된 중합효소 연쇄반응기법이 실제 임상적으로 녹농균에 의한 감염 여부를 파악할 수 있는 진단 방법으로 활용될 수 있는지를 통상적인 혈액 배양법과 비교하여 알아보고자 하였다.

방 법

1) 혈액 채취 및 혈액 배양

1998년 5월부터 1999년 4월까지 한림대학교 의과대학 한강성심병원 화상센터 중환자실에 입원하였던 환자 중 1) 분당 맥박수 120회 이상, 2) 분당 호흡수 20회 이상, 3) 체온 38.5°C 이상, 그리고 백혈구수 12,000/mm³ 이상인 환자의 정맥혈을 최소 30분 간격으로 2회에 걸쳐 각각 6 ml 씩 무균적으로 채취하여 5 ml은 통상적인 방법으로 호기성 배양을 시행하고 나머지 1 ml은 EDTA-bottle에 담아 항응고처리한 뒤, 멸균 소독된 eppendorf tube에 분주하여 -20°C에 냉동보관하였다.

2) 혈액으로부터의 DNA 분리

냉동 보관된 전혈중 0.25 ml을 멸균 소독된 eppendorf tube에 넣고 Tri reagent BD (Molecular Research Center, Inc., Cat. No: TR-118) 0.75 ml를 혼합하여 흔든 뒤 상층액을 제거하였다. 100% ethanol 0.4 ml를 첨가하여 2,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후 얻은 pellet에 0.25 ml의 DNAzol (Molecular Research Center, Inc., Cat. No: DN-127)을 첨가하여 pellet을 용해하였다. 이어서

100% ethanol 0.2 ml를 첨가한 뒤 실온에서 2~5분간 두었다가 2,000 g에서 3분간 원심 분리하였다. 침전된 DNA pellet을 95% ethanol 1 ml로 두 번 세척하고 원심 분리한 후 얻은 DNA pellet을 8 mM NaOH 0.025 ml에 혼합하여 용해시킨 후 중합효소 연쇄반응의 template DNA로 사용하기 위하여 -20°C에 냉동 보관하였다.

3) 균주로부터의 DNA 분리

화상환자의 가검물로부터 채취하여 배양한 *Pseudomonas aeruginosa* 균주와 *Acinetobacter* 균주, *Enterobacter* 균주, *Klebsiella* 균주, *Staphylococcal* 균주, *E. coli* 균주를 임상병리과에서 제공받아 확보하였다. 이들 각각의 균주를 일정 비율로 희석한 뒤 각각 0.25 ml당 Tri reagent BD (Molecular research center, inc., Cat. No: TR-118) 0.75 ml를 혼합한 뒤 5분간 실온 저장하였다. 여기에 0.2 ml chloroform을 첨가하여 15초 동안 섞은 후 10분간 실온에 방치한 뒤 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 100% ethanol 0.3 ml를 첨가하여 혼합하였다. 다시 2,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 DNA pellet을 얻었다. DNA pellet을 1 ml의 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol로 30분간, 2 ml 75% ethanol로 두 번 세척한 뒤 얻은 DNA pellet을 0.5 ml의 8 mM NaOH로 용해한 뒤 12,000 g, 4°C, 5분간 원심 분리하여 상층액만 사용하여 HEPES 완충액으로 pH를 맞추고 중합효소 연쇄반응의 template DNA로 이용하기 위하여 -20°C에 냉동 보관하였다.

4) 중합효소 연쇄반응

Nested 중합효소 연쇄반응을 위하여 각각의 primer (Pharmacia-Biotech) PAL1, PAL2 및 PAL3, PAL4를 사용하였으며 각각의 염기 배열은 다음과 같다.

PAL1, 5'-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3' (a 21-mer corresponding to the beginning of the open reading frame of *oprL*)

PAL2, 5'-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3' (a 21-mer corresponding to the end of the open reading frame of *oprL*)

PAL3, 5'-CGACCCGAACGCAGGCTATG-3'

PAL4, 5'-CGACCGGACGCTCTTACCA-3'

중합효소 연쇄반응 thermocycler는 PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 2400을 사용하였으며 중합효소연쇄반응은 primer mix (0.5 μM의 PAL1, PAL2) 10 μl template DNA 10 μl, Taq DNA polymerase 2.5 U, dNTP 250 μM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM를 혼합하고 나머지를 DEPC water를 이용, 50 μl을 만들어 사용하였다. 증폭시키는 program은 denaturation 94°C, 40초, annealing 55°C, 40초, extension 72°C, 40초, final extension 72°C, 7분간 25 cycles 시행하였으며, nested 중합효

소 연쇄반응은 제 1차 중합효소 연쇄반응에서 얻어진 산출물 50 μ l에서 10 μ l 사용하는 것과 primer로 primer mix (0.5 μ M의 PAL3, PAL4) 10 μ l를 사용하는 것 이외에는 제 1차 중합효소 연쇄반응과 동일한 조건에서 시행하였다.

균주 및 혈액으로부터 얻어진 증폭된 DNA와 marker를 각각 10 μ l씩 1.5% TAE-agarose gel에 loading한 뒤 1.5% TAE buffer에 담가 3~5 V/cm (100 V, 60분)로 전기영동을 시행하고 ethidium bromide (Ultra Pure, Cat. No: 155582-026)로 염색한 뒤 UV transilluminator를 이용하여 사진을 찍은 후 506 bp (first PCR for *oprL*), 335 bp (nested PCR for *oprL*) 및 249 bp (PCR for *oprI*)의 띠를 확인하였다.

5) 녹농균의 최저 검출 개수

Agar plate로부터 얻은 녹농균을 일정한 비율로 희석한 뒤 spectrophotometer를 이용하여 optical density (이하 O.D.로 약칭) 값을 측정하는 한편, 녹농균 희석액을 맥콩키 배지에서 24시간 동안 37°C에서 항온처리하여 형성된 집락군(colony)을 계수하여 O.D. 값과 colony 수와의 상관계수를 구하였다. 이어서 이 상관 계수를 이용, 얻어진 일정한 숫자의 녹농균으로부터 DNA를 추출, 일정한 비율로 희석하였다. 이들 일정한 비율로 희석된 DNA를 이용, 중합효소 연쇄반응법을 시행하여 검출 가능한 DNA의 최저 농도를 확인하였다.

6) 혈액 배양 및 중합효소 연쇄반응을 이용한 녹농균 검출

혈액 배양에서 녹농균 균주가 동정된 혈액에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 녹농균 검출이 되는지를 알아보기 위하여 우선 통상적인 혈액 배양에서 녹농균이 검출된 화상 환자의 혈액을 대상으로 중합효소 연쇄반응을 시행하여 녹농균 검출을 확인하였다. 이어서 임상적으로 패혈증이 의심되는 환자의 혈액을 이용하여 통상적인 혈액 배양 검사 및 중합효소 연쇄반응법을 이용한 녹농균 검출 빈도를 비교 분석하였다.

결 과

1) 혈액 배양 및 중합효소 연쇄반응을 이용한 녹농균의 검출 빈도

화상 환자의 혈액 배양 검사에서 녹농균이 검출된 혈액을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*에 해당되는 335 bp에서의 띠를 확인할 수 있었던 반면(Fig. 1, 2), 화상 환자에서 빈번하게 검출되는 *E. coli*, *Acinetobacter* 균주, *Staphylococci* 균주 및 *Klebsiella* 균주에서는 띠를 확인할 수 없었다(Fig. 3).

혈액 배양 검사에서 동정된 균주로는 포도상 구균이 가장 많이 검출되었으며, 그 다음이 *Pseudomonas aeruginosa*

순이었다.

한편 패혈증이 의심되었던 81명 화상 환자에서 시행한 혈액 배양검사 중 7예에서 녹농균이 검출되었으며 중합효소 연쇄반응검사에서는 21예에서 녹농균에 대한 양성반응을 보였다(Table 1).

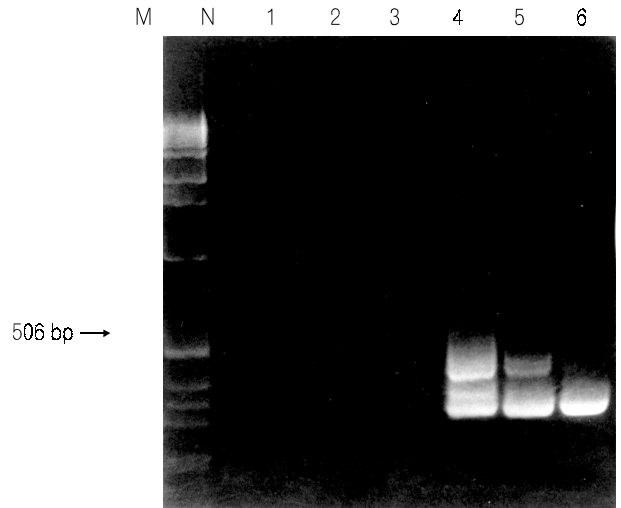


Fig. 1. PCR amplified products from various concentration of *Pseudomonas aeruginosa* DNA. 1. 248 ng/ μ l, 2. 24.8 ng/ μ l, 3. 2.48 ng/ μ l: primary PCR; 4. 248 ng/ μ l, 5. 24.8 ng/ μ l, 6. 2.48 ng/ μ l: nested PCR. M: marker (1kb), N: negative control.

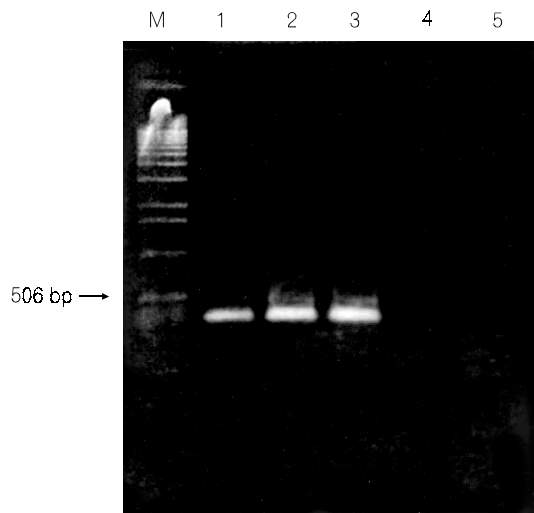


Fig. 2. Nested PCR amplified products from samples (DNA extracted from blood samples). 1. *Pseudomonas aeruginosa*, positive control, 2. blood culture-positive blood sample, 3. *Pseudomonas* inoculated blood sample, 4. blood culture-negative blood sample, 5. negative control, M: marker (1 kb).

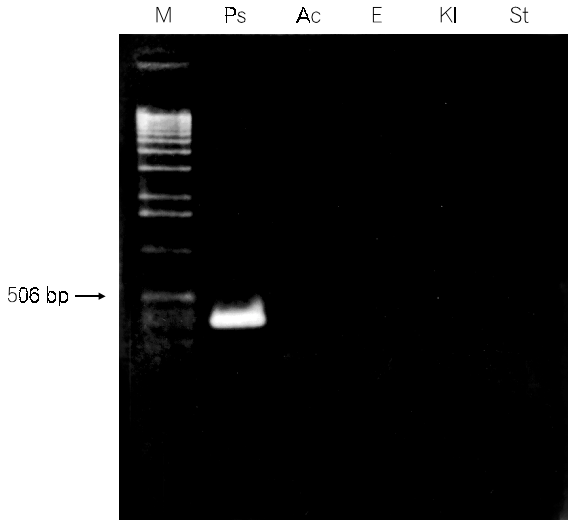


Fig. 3. Nested PCR amplified products from bacterial DNA. Ps. *Pseudomonas aeruginosa*; Ac. *Acinetobacter baumannii*; E. *E. coli*; Kl. *Klebsiella* spp.; St. *Staphylococcus* spp.

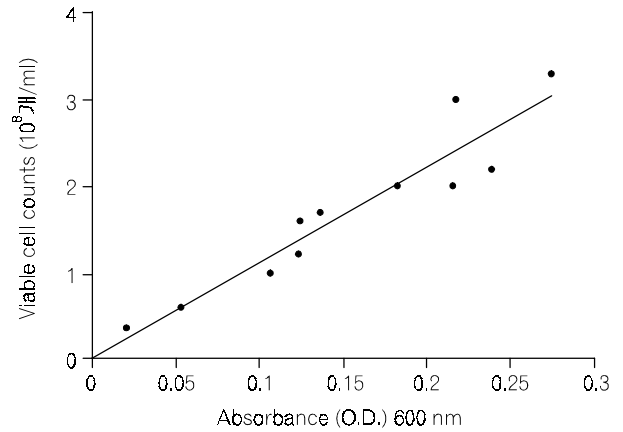


Fig. 4. The linear correlation between absorbance and viable cell number. Correlation coefficient; $y = -0.0078 + 12.65 \times R = 0.94$.

Table 1. Identification of microorganisms in 81 patients with burn

Microorganism	No. of sample	
	Blood culture	Nested PCR
<i>S. aureus</i>	7	
<i>P. aeruginosa</i>	7	21
<i>A. baumannii</i>	2	
<i>Enterococcus</i> spp.	2	
<i>Klebsiella</i> spp.	1	
Total	19	21

2) 녹농균 최저 검출 개수

분광 광도계 (spectrophotometer)를 이용한 녹농균 1×10^8 개/ml, 2×10^8 개/ml 및 3×10^8 개/ml의 O.D값은 각각 0.108, 0.184 및 0.216로 측정되었으며, 이 때의 DNA양은 각각 $0.604 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.650 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 및 $0.850 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 으로 균의 농도와 O.D. 값과의 상관계수는 Y (살아있는 균의 개수/ml) = $-0.078 + 12.65X$ (O.D.값)이었으며 $R=0.94$ 였다(Fig. 4).

위에서 구한 상관계수를 이용하여 만든 각각 1×10^8 개, 3×10^8 개 및 5×10^8 개의 녹농균을 일정한 비율로 희석한 뒤 DNA를 추출하였고 이를 nested 중합효소 연쇄반응을 이용하여 DNA를 증폭시킨 후 확인한 녹농균의 최저 검출 개수는 1 ml당 1×10 개였다(Fig. 5).

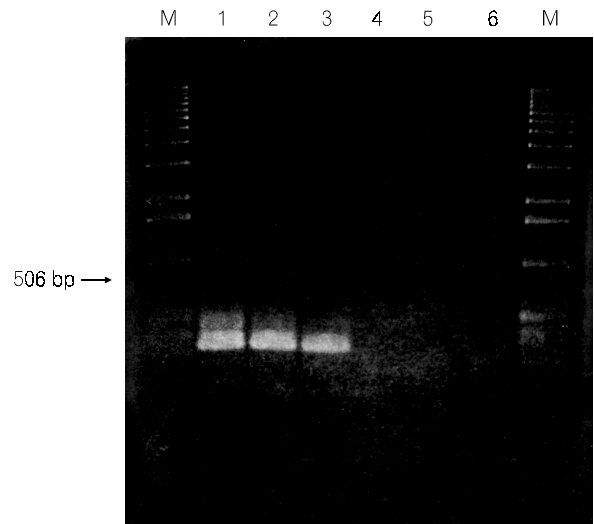


Fig. 5. Nested PCR amplified products from samples. (count of *Pseudomonas aeruginosa* per ml) 1. 1×10^3 개/ml, 2. 1×10^2 개/ml, 3. 1×10^1 개/ml, 4. 1×10^0 개/ml, 5. 1×10^{-1} 개/ml, 6. 1×10^{-2} 개/ml, M. marker (1 kb).

고 찰

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 면역기능이 떨어진 개체에서 높은 유병률과 사망률을 나타내는 주된 원인균으로,(5,6) 특히 corticosteroid, 면역 억제제, 혹은 세포독성 약제(cytotoxic drug) 등의 광범위한 사용, 외과적 대수술로 인한 방어 기능 저하, 호중구 감소증(neutropenia), 낭성 섬유증(cystic fibrosis)환자나 중증 화상 환자에서 기회 감염을 잘 일으키는 것으로 알려져 있다.(7) 또한 녹농균은 세포 외막 지질 단백질에 의한 세포 투과성 및 유출 전달 체계

의 변화에 의하여 일반 항균제에 대한 내성을 가지게 되며 살균제에도 생존할 수 있다고 알려져 있어 녹농균 감염에 대한 치료 또한 쉽지 않은 실정이다. 녹농균에 의한 기회 감염을 효과적으로 줄이기 위해서는 신속하고도 정확한 녹농균의 동정이 선행되어야 하며 이를 위하여 현재 까지 많은 진단법이 개발되어 왔다.

녹농균 진단 방법으로 세포 표면의 antigenic determinant를 이용한 표현형별법(serotyping or biotyping)으로 많이 이용되어 왔으나(8) 분별력(discriminatory power)과 재현성(reproducibility)이 높지 못한 것으로 알려져 있으며, 그 외 직접 세포배양법과, 외독소를 측정하는 방법으로 마우스 치사량 측정법, 면역 확산법, counterimmunoelectrophoresis, 배양세포 독성 검사법 등의 다양한 면역진단법이 알려져 있으나 이들 검사법 역시 검사 시간이 많이 소요되며 표준화되어 있지 않고 민감도가 낮아 임상 적용에 많은 제한을 받고 있다.(9)

그러나 최근 들어서는 세균이 가지는 고유의 핵산을 이용하는 여러 가지 분자생물학적 검사 기법, 즉 유전자형별(genotyping)을 사용한 검사기법이 실험실 연구의 수준을 벗어나 임상 미생물학 분야에 실질적으로 응용되기 시작하면서 기존의 진단 방법이 갖는 단점을 보완할 수 있는 것으로 인정받아 왔다.(10) 이 방법에는 프라스미드형별, 제한 효소를 사용한 염색체형별, 리보형별(ribotyping), 중합효소 연쇄반응형별, 그리고 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 등을 들 수 있다.(11) 또한 최근에는 녹농균의 세포외막 지질단백 유전인자를 이용한 피부조직, 혈액, 타액을 이용한 중합효소 연쇄반응에 의한 검사법이 나오고 있다.(12)

중합효소 연쇄반응이란 대상 균주의 DNA에 알고있는 특정 부위에 유도체(primer)가 결합을 유발하여 그 부위를 증폭시키는 방법인데 이러한 유도체가 결합되기 위해서는 어느 균주에나 공통적으로 있는 반복 염기서열(consensus repeats), 결합 확률이 높은 임의의 염기서열(random sequence), 혹은 한 염색체 내에 여러 개수가 있는 특정 염기서열(motif sequence)의 세 가지로 분류될 수 있다. 이것을 이용한 형별방법에는 임의의 염기서열에 결합하여 증폭하는 random amplification of polymorphic DNA (RAPD), rRNA operon 부위를 증폭하거나, 어느 특정 단백질을 생성하는 유전자 등을 증폭하는 방법, 최근에는 infrequent restriction site PCR (IRS-PCR) 등이 있다. 이 중합효소 연쇄반응법의 단점은 그 자체가 내포하고 있는 오염의 위험과 표준화가 아직 덜된 것이 단점이며 시행시 DNA 및 유도체, Taq polymerase의 농도, 실험 단계별 온도 등의 보정과 PCR 기중간의 차이 등이 실험 결과에 민감하게 영향을 미칠 수 있다는 점에 문제점으로 작용할 수 있다고 보고되고 있으나 다른 형별법들보다 변별도와 재현도가 우수하고 시간이 적게 걸리며 다량의 균주를 단시간에 검사

할 수 있다는 장점이 있어 새로운 진단 방법으로 대두되고 있다.

본 실험에서는 세포 외막 지질 단백을 발현하는 유전자를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행한 것으로 이 세포 외막 지질 단백질은 균 상호간의 중요 역할을 하며 이것이 항균제에 대하여 저항성을 가지며 세포 외막의 투과성과 세포내 물질을 세포 밖으로 내보내는 시스템에 기여하고 균주마다 특이적으로 가지고 있다. 녹농균 외세포 지질 단백질 유전인자는 *oprI* 및 *oprL*의 두 가지로, 이중 *oprI*는 녹농균계에 거의 모두 존재하는 반면, *oprL*은 *Pseudomonas aeruginosa*에만 특이적으로 존재하고 있다고 알려져 있다. 이 두 가지 유전인자를 이용한 중합효소 연쇄반응으로 균의 유무를 검출하는데 이용한 보고가 있으며,(13) 또한 *Pseudomonas aeruginosa*의 *oprL* 유전인자가 다른 유전자와는 다르다는 것이 밝혀져 특이도가 높은 것으로 알려져 있다.(14)

본 실험에서도 *oprL* 유전자에 속한 4개의 유도체(primer)를 사용하였으며 *oprL* 유전인자의 염기서열(medline 97321009)은 다음과 같다.

- ```

1 tcgccactg ttgcgccaa tggcaccatg ctaatacggc
 acccggcage aggaccgggg
61 gtgctgatgc tcgtatcctc aacggacgcg tacggatacc
 tctcccctac cgctcagggc
121 gatgtgctg agccttctg gtccccctac ctgaactgac
 ggtcgccaac ggttacaac
181 ttatacactg gggtcatta ggagttacat
 gatggaaatg ctgaaattcg gcaaatgtgc
 PAL1
241 tgcgctgct ctggccatgg ctgtggctgt gggttctcc
 tccaaggggc ggcgatcttc
301 cgggtaaggc cccaatggcg
 gcctcgacc gaacgcaggc tatggcgcca acacgggtgc
 PAL3
361 cgttgacggc agcctgagcg acgaagccgc tctcgtgctg
 atcaccacct tctacttga
421 gtacgacagc tccgacctga agccggaagc catgcgcgct
 ctggacgtac acgcaaga
481 cctgaaagc agcggtcagc gcgtagtgt ggaaggccac
 accgacgaac gggcaccgc
541 cgagtacaac atggctctgg gcgagcgtcg tgccaaggcc
 gttcagcgt acctgtgtct
601 gcaggggctg tcgceggcca cgctggaact
 gtttctat ggtaaagac gtccggtcgc
 PAL4
661 taccggccac gacgagcagt cctgggctca
 gaaccgtcgc gtcgagctga agaagtaaga
 PAL2

```

721 agtcgttatg cccaagcacc tgcgtgtcct gacgttctc  
 gcgctcagcc tgccattagc  
 781 ggccaggcg gaagttcctg tgtatgacgg cgttgccgcc  
 aacaatggcg gcaacgttcc  
 841 tcctccggg tatggcacgg caggtgccgg cgggccttt  
 accggagggtg gggtgacaac  
 901 ccccacctcc gtgcaggcg aactgttcat gcagctccag  
 cagatgcagg acgagttggc  
 961 tgcctgcgt ggcacgctcg agcgagaggt tgccccgatg  
 gcttcggttt ggcagaggcc  
 1021 tgcggggagc cgctgtaac caccttcc

1차 중합효소 연쇄반응은 PAL1, PAL2 유도체를 이용하였으며 nested 중합효소연쇄반응은 PAL3, PAL4 유도체를 이용하였다.

일반적으로 nested 중합효소 연쇄반응 기법은 10<sup>7</sup>배까지의 DNA 증폭을 유도함으로써 검체에서 1~10개의 DNA 서열도 확인 가능할 뿐만 아니라, (15) 2~3개 정도의 세균의 검출도 가능하다고 하였다. (16) 또한 Miyazaki등(17)에 의하면 결핵균 동정에서 nested 중합효소연쇄반응을 시행한 경우에는 single 중합효소 연쇄반응에 비해 민감도가 1,000배나 증가한다고 하였다. 그러나 일반적인 조건에서는 잘 이루어지지 않으며 hot start나 nested 중합효소 연쇄반응을 시행한 경우에 해당된다고 하였다. 본 실험에서는 1×10<sup>1</sup>개 균의 개수까지 균의 동정이 가능하였으며, 앞으로 중합효소 연쇄반응시 적정 조건을 맞추면 더 적은 수의 균 동정도 가능하리라고 판단된다. 일반적으로 일차 중합효소 연쇄반응 검사에 소요되는 시간은 2시간 내외로, 본 연구에서는 일차 중합효소 연쇄반응에 2시간 30분 정도가 소요되었으며 nested 중합효소 연쇄반응 시 2시간 30분 정도가 더 소요되었다.

또한 중합효소 연쇄반응법은 일반 배양 검사법에 비하여 비교적 특이도가 높고 다른 균의 과성장, 항균제 사용 및 auxotrophic 변이에 의한 경우에도 균의 동정이 가능하다고 보고되고 있는데(18) 본 연구의 경우 1차 실험 시 *Klebsiella* 균주에서 양성이 나왔는데 반복 실험한 결과 음성으로 나왔다. 이와 같이 가양성이 나오는 원인은 주로 DNA의 오염에 의한 것으로 이는 세균 배양이나 다른 균주와의 교차반응 또는 실험 도중에 발생하는 기술적인 실수 등에 의한 때문이라고 판단되며, Kwok등(19)에 의하면 좋은 실험환경과 숙련된 기술과 실험시 주의를 하면 거의 일어나지 않는다고 하였다. 한편 혈액 배양 검사에서는 양성이 나오고 중합효소 연쇄반응에서는 음성이 나오는 가음성이 나올 수 있으나 본 연구에서는 보이지 않았다.

일반적으로 통상적인 혈액 배양법에 의한 세균 검출 빈도는 중합효소 연쇄반응법의 그것에 비하여 상대적으로 낮으며, Alexander등(20)은 항균제를 지속적으로 투여받는

균혈증 환자에서 중합효소 연쇄반응법에 의한 세균 검출 빈도가 혈액 배양법에 비하여 월등하다고 하였으며, 본 연구에서도 81명의 대상 환자 중 혈액 배양 검사에서 7명의 녹농균이 검출된 반면, 중합효소 연쇄반응 검사에서는 21예에서 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 이는 항균제에 의하여 생명력을 잃은 세균의 혈액 배양 동정은 불가능하나, DNA는 세균의 viability에 관계없이 검출이 가능한데 기인한다고 하겠다. 한편 중합효소 연쇄반응에서 녹농균 DNA가 검출되었다고 하는 것은 임상적으로는 적어도 혈액 내 녹농균에 의한 균혈증이 존재하거나, 혹은 존재하였다는 것을 의미하며 화상 환자 등과 같이 창상 부위를 통한 세균 감염의 기회가 수시로 일어날 수 있는 상황에서 중합 효소 연쇄반응법에 의한 녹농균 검출법은 그 가치가 크다고 하겠다. 다만 아직 녹농균 감염에 대한 항균제 감수성 확인과 함께, 녹농균 이외 화상 환자에서 빈번하게 감염을 일으키는 균주에 대한 동정이 필요한 시점에서 혈액 배양 검사는 필수적이라고 판단된다.

결론적으로 기존에 이용되고 있는 혈액 배양 등에 의한 녹농균 검출법이 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라, 임상적으로 항균제 사용 등에 의하여 녹농균 검출 빈도가 떨어지는 상황에서 nested 중합효소 연쇄반응법을 이용한 녹농균의 검출법이 비교적 적은 수의 녹농균 감염의 경우에도 측정 가능하며, 재현성 또한 탁월하다고 사료되어 향후 임상적으로 녹농균 감염의 진단 및 치료에 혈액 배양법과 더불어 매우 유용하게 이용할 수 있으리라고 판단된다.

REFERENCES

- 1) Lee JJ, Marvin A, Heimbach DM. Infection control in a burn center. *J Burn Care Rehabil* 1990;11:575-80.
- 2) Tompkins LS. The use of molecular methods in infectious diseases. *N Engl J Med* 1992;327:1290-4.
- 3) Barry IE. The polymerase chain reaction, A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990;322:178-82.
- 4) Daniel DV, Lim A Jr., Pirnay JP. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1295-9.
- 5) Herbert YR, Arthur SL, Robert EW. *Pseudomonas aeruginosa* infections; persisting problems and current research to find new therapies. *Ann Int Medicine* 1975;82:819-22.
- 6) John KS Chia, Matthew P, David Avigan and Suzanne Steinbach. Functionally distinct monoclonal antibodies reactive with enzymatically active and binding domains of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect Immun* 1986;52:756-61.
- 7) Stanley JC Jr., Furer E, Germanier R. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a murine burn wound sepsis

- model by passive transfer of natitoxin A, anti-elastase, and anti-lipopolysaccharide. *Infect Immune* 1983;39:1072-7.
- 8) Chit Laa Poh, Chew Chieng Yeo. Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infec* 1993;24:175-80.
- 9) 박장환. 녹농균 외독소 측정을 위한 면역효소 측정법 개발. 한양대학교 대학원 석사학위논문; 1991.
- 10) Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiology Rev* 1994;7:311-4.
- 11) Rastegar LA, Bahrami HH, Algheshbandan R. *Pseudomonas* infection in Tohid Burn Center, Iran. *Burns* 1998;24:637-40.
- 12) Ferenc K, Jon J. Polymerase chain reaction for the detection of *psuedomonas aeruginosa*, *stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. *Molecular and Cellular Probes* 1996;10:397-402.
- 13) Saint-Onge A, Romeyer F, Lebel P. Specificity of the *Pseudomonas* PAO-I lipoprotein I gene as a probe and PCR target region within the *Pseudomonadaceae*. *J Gen Microbiol* 1992; 138:733-9.
- 14) Lim A Jr., De Vos D, Brauns M. Molecular and immunological characterization of OprL the 18 kDa outer membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 1997;143:1709-12.
- 15) Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153-8.
- 16) McIntosh I, Govan JR, Brock DJ. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum from cystic fibrosis patients by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1992;6:299-303.
- 17) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S. Nested polymerase chain reaction for detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1993;31:2228-34.
- 18) Taylor RF, Hodson ME, Pitt TL. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbation and increasing severity of lung disease with axctrophic mutants of *P. aeruginosa*. *Thorax* 1993;48:1002-7.
- 19) Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-40.
- 20) Alexander H, Marlies B, Sibylle S. PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J Clin Microbiol* 1999;37:2479-83.
-