대한외과학회지 : 제 62 권 제 6 호
Vol. 62, No. 6, June, 2002

□ 원 저 □

혈중 세균 전위가 중증 환자의 예후에 미치는 영향

인제대학교 의과대학 부산백병원 외과학교실, [1]울산동강병원 외과학교실

김운원 · 성천기[1] · 오상훈 · 김상효

Bacterial Translocation and Prognosis of Critically Ill Patients

Woon Won Kim, M.D., **Chun Ki Sung,** M.D.[1], **Sang Hoon Oh,** M.D. and **Sang Hyo Kim,** M.D.

Purpose: To identify Bacterial translocation (BT) from the gut to the blood in the critically ill patients by using the polymerase chain reaction (PCR) to confirm the sensitivity of PCR in the detection of intestinal bacterial deoxyribonucleic acid (DNA) in human blood. Further, to determine the relationship between the identification of BT and the prognosis of these patients.
Methods: The oligonucleotide primers used to amplify bacterial DNA from whole blood were the beta-galactosidase (BG) gene of E. coli, DNA coding for 16S ribosomal RNA (16S rRNA), and the glutamine synthase gene of Bacteroides fragilis (BFR). DNA was extracted from the blood of 45 cases of critically ill patients and 10 controls. PCR techniques were used to amplify the genes from E. coli, Bacteroides fragilis, and a region of 16S ribosomal RNA found in many gram-negative and positive bacteria.
Results: Bacterial DNA genes were not detected in any of the controls, but were found all in 6 cases of patients with positive blood cultures. Of the 39 cases with no growth in their blood culture, 11 cases in BG and BFR, and 13 cases in 16S rRNA had positive findings in bacterial DNA PCR. Fifteen cases (33%) in BG, 19 cases (42%) in BFR, and 16 cases (35.5%) in 16S rRNA of the critically ill patients had detectable bacterial DNA in their blood. Of those with a positive PCR, MOF developed in 11 cases (57.9%) and of these, 10 subsequently died of MOF. One case (3.8%) in the negative PCR was developed and died of MOF. Patients having positive translocated bacterial DNA had a worse prognosis than the group with a negative DNA.
Conclusion: In order to confirm BT, the PCR method for detecting bacterial DNA in the blood of critically ill patients is more sensitive than blood cultures. BT from the gut can be a major factor in the development of multiple organ failures in critically ill patients. Therefore, early detection of BT with PCR can play a major role in the treatment of critically ill patients. **(J Korean Surg Soc 2002;62:472-479)**

Key Words: Bacterial translocation, Bacterial DNA, PCR, Prognosis of critically ill patients
중심 단어: 세균전위, 세균 DNA, PCR, 중증 환자의 예후

Department of Surgery, Inje University College of Medicine, Paik Hospital, Busan, [1]Dongkang Hospital, Ulsan, Korea

책임저자 : 김운원, 부산광역시 부산진구 개금동 633-165
㉾ 614-735, 인제대학교 부산백병원 외과
Tel: 051-890-6352, Fax: 051-898-9427
E-mail: drkww@lycos.co.kr
접수일 : 2002년 5월 23일, 게재승인일 : 2002년 5월 25일

서 론

검사 도구나 치료 기술 및 약제의 발달에도 불구하고 많은 외과 의사들은 환자 치료에 있어 감염 합병증으로 많은 어려움을 겪고 있다. 적절하고 빠른 시간 내에 감염과 감염의 원인균을 확인하고 치료하는 것이 환자의 이환율이나 사망률을 줄이는 방법임에도 불구하고, 침습한 세균(특히 장내 세균)을 상처, 체액, 혈액에서 배양 외에는 적당한 방법이 개발되어 있지 않다. 감염을 치료하는 방법은 정확히 감염 균주을 동정하는 것이 중요하나 이를 위한 검사 시 많은 시간과 비용이 소요될뿐 아니라 혈액 배양 검사는 환자의 상태가 염증성 상태를 보임에도 불구하고 배양이 되지 않는 것으로 보고되는 경우가 빈번하므로 48시간 내에 이 원인균을 찾아내어 적절한 치료를 하는 것이 용이하지 않다. 최근 연구자들의 보고에 따르면 중증 환자에서 전신적 염증 반응(systemic inflammatory reaction syndrome) 소견을 보이면 30 50%까지 세균을 검출할 수 있다고 하였으나(*1*) 실제로 균을 동정하는 것이 쉽지 않다. 다행히 최근 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 혈액 배양검사의 결과가 나오기 전에 혈액이나 체액에서 세균의 특이한 DNA를 검출하여 감염균의 실체를 규명하는 방법들이 소개되고 있으며, 혈액이나 체액 등의 배양 결과보다 높은 정확도와 민감도를 보인다는 보고들이 있다.(*2*)

감염균에 대한 숙주의 염증 반응에 대한 면역학적 연구

가 활발히 진행되고 있으며, 연구 대상은 염증 반응에 따라 증감을 하는 interleukine-1beta (IL-1beta), interleukine-6 (IL-6), tumor necrotic factor-alpha (TNF-alpha) 등의 cytokine이다. 그러나 이런 검사들은 염증의 원인이나 균을 찾는 방법이 아니며, 또한 더 많은 cytokine이나 염증인자(예, endotoxins, leukotrienes, compliment)들이 규명되고 그 양을 측정할 수 있지만, 약물적 치료에는 많은 도움이 되지 못한다고 보고되고 있다.(*2,3*)

세균 전위는 1979년 Berg와 Arlington(*4*)이 처음 확립하였으며, 그 정의는 장내의 세균이나 세균의 부산물이 장의 점막을 통해 혈액, 장간막 임파선, 간, 비장 등의 조직이나 장기로 이동되어 가는 것을 말한다. 감염의 명백한 원인이 없으면서 전신 염증 반응을 보이는 많은 경우 그 원인이 장내 세균의 전위에 의하여 일어남을 알게 되었고 1990년대에 들어 이에 대한 많은 보고가 본격적으로 이루어졌다.

중증 환자에서 패혈증 증상이나 전신 염증 반응 증후군의 원인균은 대부분 장내 세균이 전위를 일으켜 혈중으로 나옴으로써 유발될 것이라는 추정을 하고 있었으나(*5*) PCR이 소개되기 이전에는 여러 가지 연구들이 시행되었음에도 원인균을 증명하는 것은 실패율이 높았다. 그러나 Kane 등(*2*)은 동물 실험에서 PCR을 이용하여 장에서 전위되어온 세균의 특이한 DNA를 혈액에서 증명하여 이 세균이 장내 세균임을 증명하였고, 이 방법이 혈중에 존재하는 균을 증명하는데 혈액 배양보다 더 정확하고 더 민감하다고 하였다.

그러나 지금까지의 연구들은 대부분 실험 동물을 대상으로 다발성 외상, 균주의 섭취, 중증 패혈증, 폐쇄성 담관염, 화상 등을 유발시킨 후 혈액보다는 장간막 임파선, 간, 비장 등의 조직에서 세균 전위를 증명하는 연구가 이루어졌다. 그러나 1997년 Kane 등(*6*)은 환자 혈액에서 장내 세균의 전위를 증명하고 PCR이 원인균 동정에 적합한 방법의 하나라는 것을 주장하였고, 세균 전위에 관한 종래의 연구들(*7*)에서와 같이 세균 동정의 어려움을 해결할 수 있게 되었다고 하였다.

이에 저자는 PCR을 이용하여 장내 세균의 DNA를 환자의 혈액에서 직접 증명함으로써 중증 환자에서 염증 반응의 원인이 세균 전위라는 것을 확인하고, 이 방법의 정확성과 임상에 적용여부와 세균 전위가 환자의 예후에 미치는 영향을 알아 보고자 연구를 하였다.

방 법

1) 재료

(1) 임상검체: 실험 환자군 45예는 중환자실에 입원 치료를 받은 수술 전 또는 후 중증 감염 환자 35예와 중증 다발성 외상(Multiple major trauma) 10예를 택했으며, 대조군 10예는 감염의 증거가 없는 입원 환자로 수술 전 기본 검사시 환자의 동의를 얻어 혈액을 채취했다. 혈액 채취는 CBC 채취용 용기를 사용하여 3 ml 정도 환자의 혈액을 채취하고 동시에 혈액 배양을 위한 혈액도 채취하였다. 용기는 DNA를 추출하기 전에는 −20°C에서 냉동 보관했다.

(2) 시약: AmpliTaq™ DNA polymerase를 포함하는 PCR 증폭 시약 kit는 Perkin Elmer Cetus (USA)사의 제품을, Sequenase® Version 2.0 DNA 염기 서열 결정 kit는 USB (United States Biochemical, USA)사의 제품을 그리고 CAT assay kit는 Promega (USA)사의 제품을 사용하였다. Oligonucleotide primer는 Bio-Synthesis (USA)사에 주문 의뢰하여 HPLC로 정제된 후 polyacrylamide gel 전기 영동에 의해 순도가 확인된 것을 사용하였다. 그리고 기타 시약들은 미국 Sigma사, 일본 Wako나 Junsei사 또는 스위스 Fluka사의 특급 시약을 사용하였다.

2) 실험 방법

(1) DNA 분리(DNA extraction): EDTA blood 100 uL에 300 ul의 NH4Cl/KHCO3 buffer를 가해 4°C에서 10분간 배양한 후 13,000 rpm에서 원심 분리하였으며 그 침전물을 500 uL의 세척액(washing solution)으로 2회 세척한 다음 50 uL의 Triton X-100에 부유(suspension)시켰다. 이것을 microwave (750 W)에 넣고 5분간 처리한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 상층액을 2 uL를 취하여 PCR 반응을 위한 template로 사용했다.

(2) PCR검사를 위한 장내 세균의 Primer: 세 쌍의 Oligonucleotide primer (바이오니아, 한국)의 pairs, sequence, gene target, amplified size는 Table 1과 같다. BG-1과 BG-4 primer는 E. coli의 beta-galactosidase을 위한 것으로 다른 그람 음성균에서는 발견되지 않는다.(*8*) 두 번째 16S rRNA+와 16S rRNA−는 12개 종류의 그람 양성이나 그람 음성균에서 발견되는 16S ribosomal RNA을 위하여(*9*) 그리고 세 번째 primer BFR-1나 BFR-2는 bacteroides 균주에서 발견되는 glutamine synthase gene(*3*)의 PCR을 위한 primer이다.

(3) PCR 증폭: 추출된 DNA 2 uL를 primer 2 uL에 섞은 다음 dNTP, Taq DNA polymerase 및 buffer가 들어 있는 Premix (바이오니아, 한국)에 넣고, PCR을 위한 증폭(amplification)은 DNA Thermal Cycle r (Perkin-Elmer 9,600)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 첫 주기(cycle)는 95°C/3분, 60°C/45초, 72°C/10분을 시행하고, 다음부터는 denaturation 95°C/45초, annealing 60°C/45초, elongation 72°C/1분을 한 cycle로 하여 35 cycles을 실시한 후 postelongation 72 C/10분을 시행했다. PCR sample을 10 uL를 취해서 2% agarose gel의 용기(well)에 넣어서 100 volt 에서 60분 동안 전기 영동하였다(Fig. 1).

(4) 혈액 배양: 혈액 배양은 TSB media에서 배양하여 blood agar plate나 maconky agar media와 API-20 E를 이용하여 세균을 검출했다.

Table 1. Oligonucleotide primers used to amplify bacterial DNA (6) from whole blood

Primer designate	Sequences of + and − primers (nucleotides)*	Gene target	Size of amplicon (bp)
BG-1 (+strand)	5'CTT TGC CTG GTT TCC GGC ACC AGA A-3' (201-225)	B-Galactosidase gene of	762
BG-4 (−strand)	5'ACC CAC CGC ACG ATA GAG ATT CGC G-3' (963-939)	Escherichia coli	
16SrRNA+ (+strand)	5'AGT TTG ATC CTG GCT GCT CAG-3' (8-27)	DNA coding for 16S	798
16SrRNA− (−strand)	5'GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' (806-787)	ribosomal RNA	
BFR-1 (+strand)	5'ACT CTT TGT ATC CCG ACG ATT-3' (484-504)	Glutamine synthase gene	581
BFR-2 (−strand)	5' GAG GTT GAT GCC TGT ATC GGT-3' (1065-1045)	of Bacteroides fragilis	

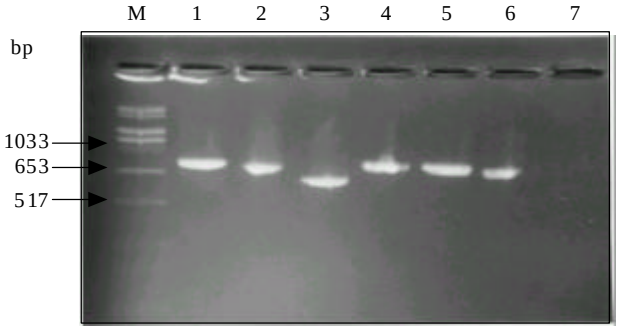

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of samples run after polymerase chain reaction. Lane M: Molecular weight marker sample (Boehringer-Mannhein VI), Lane 1: 16S rRNA control, Lane 2: E. coli control, Lane 3: B. fragilis control, Lane 4-5: Patient sample (positive 16S rRNA), Lane 6: Patient sample (positive E. coli), Lane 7: Negative control.

(5) 환자의 예후와 통계 분석: 통계적 분석은 통계 프로그램인 SPSS version 8.0 for windows를 사용하였고, P-값이 0.05 이하일 때 의미 있는 통계치로 인정했다.

결 과

1) 전체 환자의 구성 및 결과

대조군을 제외한 45예의 기록은 Table 2와 같다. 남자는 33예, 여자는 12예였고, 평균 나이는 54.2세였으며, 감염이나 패혈증 소견을 보인 경우는 35예, 중증 다발성 외상 환자는 10예였다.

상처 부위나 체액의 배양에서 검출된 균주는 주로 장내 세균들로 구성되어 있었는데 Acinetobacter가 3예, Enterobacter가 5예였으며, E. coli와 K. pneumoniae가 각각 1예에서 검출되었다. 전신 50%의 화상 1예, 간 기능 부전 및 복수를 주소로 내원한 1예, 외상성 대장 천공으로 내원했던 1예에서는 초기 PCR검사에서 음성 결과를 보였으나 재검에서 양성으로 판명된 경우도 있었다.

2) PCR 결과와 혈액배양의 비교

대조군 10예는 혈중 장내 세균 DNA에 대한 PCR 검사에서 양성을 보인 경우는 없었고 혈액 배양에서 역시 세균이 전혀 검출되지 않았다. 중증 환자 45예 중 6예(13%)는 혈액 배양에서 양성을 보였고, 6예 전부에서 PCR검사에서 양성을 보였다. 그러나 혈액 배양에서 균이 배양되지 않은 39예 중 E. coli 및 Bacteroides fragilis균주의 primer에 양성을 보인 경우는 11예(28%), 그람 음성 및 양성균의 primer에서 양성을 보인 경우는 13예(33%)로 나타났다. 전체적으로 PCR을 이용한 DNA검사의 양성률은 E. coli에 33%, 16S ribosomal RNA primer에 35.5%, Bacteroides fragilis 균주에 42%로 혈액 배양보다 높은 민감도를 보였다($P<0.05$). 중증 다발성 외상 환자는 10예 중 각각 2예에서 E. coli 및 Bacteroides fragilis와 16S rRNA primer에 양성 반응을 보였다. 혈액 배양에서 양성 반응을 보인 경우는 6예로 모두 감염균이었고 양성을 보였고, 배양된 균은 E. coli 2예, K. pneumonia 3예, Enterobacter 2예, Bacteroides fragilis와 beta-hemolytic streptococci가 각각 1예였으나, 외상군에서는 혈액 배양에서 모두 균이 배양되지 않았다. 또한 Table 2에서 보듯이 창상이나 체액 배양 검사에서도 장내 세균이 검출되었으나 혈액 배양 검사에서 검출된 균과는 완전히 일치하지는 않았다.

3) PCR 양성인 경우의 예후

장내 세균의 DNA primer에 양성을 보인 19예 중 11예(57.9%)와 음성인 26예 중 1예(3.8%)가 다발성 장기 부전증으로 이행되어 세균 전위가 있으면 다발성 장기 부전증의 선행 조건이 될 수 있음을 알 수 있었다(Fisher exact test, $P<0.0001$, $RR=19.94$, $2.83<RR<140.70$).

사망 예는 Table 3, 4, 5에서 보듯이 PCR 검사에서 장내 세균의 DNA primer에 양성을 보인 19예 중 14예(73.6%)와 음성인 26예 중 3예(11.5%)가 사망하여 전체 37.8%(17예)의 사망률을 보였고, 사망 원인은 DNA primer에 양성을 보인 14예 중 10예(76.9%)와 음성인 경우 3예 중 1예(33.3%)가 다발성 장기 부전증이었다. 반면 생존자 28예 중에서 DNA

Table 2. Data of enrolled patients

Group	Age (yr)	Diagnosis or injury	Organisms in blood culture	E. coli	16S rRNA	B. fragilis	Outcome	Concomitant wound infection
Septic	57	Systemic lupus erythematosus	Beta-hemolytic streptococcus	−	+	−	Survived	
Septic	76	Rectal cancer, pneumonia		−	−	−	Survived	
Septic	53	Primary peritonitis		+	+	+	Died	Acinetobacter baumannii
Septic	55	ARF & encephalopathy		+	+	+	Died	
Septic	70	Bile duct cancer		−	−	−	Survived	E. coli
Septic	63	GB cancer	K. pneumonia, candida	+	+	+	Died	
Septic	66	Hemoperitoneum, MI, DM		+	+	+	Survived	
Septic	64	Cerebral infarction & pneumonia	Enterob.aerogenes, K. pneumoniae	−	+	+	Died	
Septic	48	Pancreatic cancer		+	+	+	Died	
Septic	67	Cholangitis, ARF, ARDS	Enterob. aerogenes,	+	+	+	Survived	Acinetobacter baumannii
Septic	43	Burn 30%		−	−	−	Survived	Enterobacter cloacae
Trauma	23	MT with cerebral contusion		−	−	−	Survived	
Trauma	34	Retroperitoneal hematoma		−	−	−	Survived	
Trauma	21	Multiple Fx &, hemothorax		−	−	−	Survived	
Septic	48	Burn 50%		+	+	+	Died	Enterobacter cloacae
Trauma	50	MT & hemoperitoneum		−	−	−	Survived	
Septic	43	Obstructive jaundice, Cholangitis, ARF		−	−	−	Survived	
Septic	69	Rectal cancer		−	−	−	Survived	Enterobacter aerogenes
Septic	69	Colon perforation	E.coli, K. pneumoniae Flavobactrium	+	+	+	Died	Enterobacter, cloacae, K. pneumoniae
Septic	76	Cholangitis		−	−	−	Survived	
Septic	81	GB empyema		−	−	−	Survived	
Septic	67	Klatskin tumor & ARDS		+	+	+	Died	Enterobacter. Acinetobacter S. aureus
Trauma	51	Traumatic Hemoperitoneum		+	+	+	Survived	Acinetobacter baumannii
Septic	13	Intestinal obstruction		−	−	−	Survived	
Septic	75	Rectal cancer		+	+	+	Died	
Septic	60	Intestinal obstruction		−	−	−	Survived	
Septic	18	Intestinal obstruction		−	+	−	SurvivedS	
Trauma	64	Truamatic hemoperitoneum, liver cirrhosis		−	−	−	Survived	
Septic	72	COPD, CHF, Pneumonia		+	+	+	Died	Acinetobacter baumannii
Trauma	34	MT		−	−	−	Survived	
Septic	53	ARDS, ARF		+	+	+	Died	K. pneumoniae
Septic	17	MT & Panperitonitis		−	−	−	Survived	
Septic	52	Bile duct cancer		−	−	−	Died	Acinetobacter baumannii
Septic	60	CRF, ARDS, Pneumonia		−	+	−	Died	Acinetobacter baumannii, S. aureus, Enterobacter
Septic	17	Traumatic peritonitis		−	−	−	Survived	
Septic	74	Cerebral infarction & pneumonia		−	−	−	Died	
Septic	67	s-SAH & ARDS		−	−	−	Died	
Septic	74	Pneumonia		−	−	−	Survived	Acinetobacter baumannii
Septic	45	Pneumonia		−	−	−	Survived	Enterobacter cloacae
Trauma	49	MT (MRF, Hemothorax)		−	−	−	Survived	
Trauma	65	MT (MRF, Hemothorax)		−	−	−	Survived	
Septic	67	SLE, CHF		−	−	−	Survived	
Trauma	26	Traumatic hemoperitoneum & brain death		+	+	+	Died	
Septic	72	Mesenteric infarction E. coli, Bacteroides		+	+	+	Died	
Septic	71	Low GI bleeding		−	−	−	Survived	

COPD = chronic obstructive pulmonary disease; MT = multiple trauma; CHF = congestive heart failure; ARDS = adult respiratory distress syndrome; ARF = acute renal failure; CRF = chronic renal failure; GB = gall bladder; MRF = multiple rib fracture; s-SAH = subacute subarachnoid hemorrhage; MI = myocardiac infarction; GI = gastrointestinal.

Table 3. PCR data for the positive bacterial translocation

Group	Age	Diagnosis or injury	Organisms in blood culture	E. coli	16S rRNA	B. fragilis	Outcome	Admission days
Septic								
1	57	systemic lupus erythematosis	beta-hemolytic streptococci	−	+	−	Survived	36
2	53	Primary peritonitis		+	+	+	died	51
3	55	ARF with encephalopathy		+	+	+	died	30
4	63	GB cancer	K. pneumonia, Candida	+	+	+	died	32
5	66	Hemoperitoneum,MI, DM		+	+	+	survived	30
6	64	Cerebral infarction & pneumonia	Enterobacter aerogenes, K. pneumoniae	−	+	+	died	21
7	48	Pancreatic cancer		+	+	+	died	25
8	67	Cholangitis, ARF, ARDS	Enterobacter aerogenes,	+	+	+	survived	30
9	48	Burn 50%		+	+	+	died	20
10	69	Colon perforation	E. coli, K. pneumoniae	+	+	+	died	42
11	67	Klatskin tumor & ARDS		+	+	+	died	26
12	75	Rectal cancer		+	+	+	died	20
13	18	Intestinal obstruction		−	+	−	survived	12
14	72	COPD, CHF, Pneumonia		+	+	+	died	5
15	53	ARDS, ARF		+	+	+	died	50
16	60	CRF, ARDS, Pneumonia		−	+	−	died	27
17	72	Mesenteric infarction	E. coli, Bacteroides spp.	+	+	+	died	2
Trauma								
1	51	Traumatic hemoperitoneum		+	+	+	survived	30
2	26	Truamatic hemoperitoneum & brain death		+	+	+	died	10

COPD = chronic obstructive pulmonary disease; CHF = congestive heart failure; ARDS = adult respiratory distress syndrome; ARF = acute renal failure; CRF = chronic renal failure; GB = gall bladder; MI = myocardiac infarction.

Table 4. Results of PCR and Blood culture data for all patients

Group	PCR + (%) with Primer for				Positive blood culture (%)
	No.	E. coli	16S rRNA	B. fragilis	
Control	10	0	0	0	0
ICU patients					
Sepsis	35	13 (37.1%)	17 (48.6%)	14 (40.0%)	6 (17.0%)
Multiple trauma	10	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)
Total	45	15 (33.3%)	19 (42.2%)	16 (35.5%)	6 (13.3%)

primer에 양성을 보인 3예 중 1예가 다발성 장기 부전증을 보였으나 음성에서는 다발성 장기 부전증이 없었다(P< 0.003). 장내 세균 중 E. coli primer에 양성을 보인 경우는 74%, B. fragilis primer에 양성을 보인 경우는 81%의 높은 사망률로 PCR 반응검사 음성군 12% 내지 14%에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였다(P<0.003). Table 4에서 보듯이 혐기성 균인 Bacteroides균주의 primer에 양성을 보인 경우에 가장 높은 사망률(81%)을 보였고, 혈중 장내 세균의 DNA primer에 대한 PCR반응 검사가 사망률을 예측하는 데 중요한 지표가 될 수 있음을 알 수 있었다.

Table 5. Data from blood culture and PCR test

	PCR	Cases	MOF* (%)	Death (%)
Blood culture	Positive (n=6)			
	Positive	6	4 (67)	4 (67)
	Negative	0	0 (0)	0 (0)
	Negative (n=39)			
	Positive	13	7 (53.8)	10 (77)
	Negative	26	1 (3.8)	3 (12)

*MOF = multiple organ failure.

Table 6. Comparison of clinical data in survival and death cases

	PCR	Survival (n=28)	Death (n=17)	P-value
E. coli	+	3	12	0.00
	−	25	5	
16S rRNA	+	5	14	0.00
	−	23	3	
B. fragilis	+	3	13	0.00
	−	25	4	

4) 사망에 영향을 미치는 인자의 분석

Table 6에서 보듯이 사망에 영향을 미치는 인자의 단변량 분석의 결과 E. coli, 16s rRNA 및 B. fragilis에 양성인 경우만 예후를 결정하는 인자가 될 수 있음을 보여주며, 다변량 분석(Stepwise Logistic regression analysis)에서 역시 세균 전위가 증명된 경우만이 독립적 예후인자가 될 수 있음을 알 수 있었다.

고 찰

감염의 원인이 확실하지 않은 외상성, 허혈성 쇼크 후의 전신 염증 반응 증후군의 원인은 대부분 전위된 세균 균주와 내독소(endotoxin)라는 보고가 있으며,(*5,10-12*) Sori 등(*13*)은 방사능 물질로 표식한(tagging) E. coli를 경구로 주입한 실험 동물의 혈액에서 E. coli를 발견함으로써 외상성 혹은 허혈성 쇼크 후 혈중으로 유출되는 세균은 장내 세균임을 증명했다. 그러나 장내 세균을 직접 혈액 배양으로 증명하는 것은 저자의 연구에서와 같이 쉽지 않았다. PCR이 소개되고 이를 이용하여 여러 시료에서 세균의 DNA를 증명할 수 있게 됨에 따라 세균의 존재를 균의 직접적 증명에서 세균의 독특한 DNA를 증명하는 간접적인 방향으로 발전하게 되었다.(*3,9*) 전위에 의한 세균의 감염은 중증 환자에서 더 빈번히 일어나고 가끔 다발성 장기 부전증을 포함한 중증 합병증을 유발한다.(*14*)

그러나 이런 세균 전위는 중증 환자나 실험 동물에서 일률적으로 일어나는 것은 아니므로 본 연구는 중증 환자의 혈액에서 세균 전위를 증명하고 또 세균 전위가 환자의 예후에 미치는 영향을 알아보고자 했다. 연구의 대상은 다발성 중증 외상 10예, 장폐색증 3예, 화상 환자 3예 및 수술 전후 중증 감염 환자 29예를 대상으로 했다. 다발성 중증 외상 환자를 제외한 35예의 48% 정도에서 세균 전위를 증명할 수 있었으며, 다발성 중증 외상 10예 중 20%에서 세균 전위를 증명할 수 있어 Kale 등(*15*)의 보고와 비슷한 성적을 보였다.

동물 실험에서 세균 전위가 발생하는 시점은 빠르게는 유발 조건이 일어난 수 시간 이내이며 본 연구에서와 같이 초기 PCR검사에서 음성으로 나타났지만 재검에서 양성을 보였듯이 시간이 경과함에 따라 내독소의 농도와 전위된 세균의 양성률은 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다.(*10,16*) 중환자실에 입원한 중증 환자의 41%는 감염으로 고통을 받고 있으며, 치료 중 사망자의 82%는 세균 감염과 연관이 있고, 이 때 발견되는 균주는 특히 대장에서 전위된 E. coli, Streptococcus faecalis, Enterobacter, Acinetobacter, Bacteroides 등으로 보고되고 있다.(*3,10,16*) 장내 세균 중 Bacteroides 균주는 혐기성 세균으로 일반 배양에서는 자라지 않기 때문에 동정이 쉽지 않은 균이므로 원인균이라는 것을 증명하려면 PCR을 이용하여 Bacteroides 균주의 특이한 DNA를 간접 증명하는 것이 효과적이라 했으며(*3*) 허혈성 쇼크 후 혈액 배양에서 적게는 20%에서 많게는 56%의 양성 반응을 보일 정도로 세균 전위가 일어남을 보고했으나,(*10,15*) 사망과의 연관성은 60 80% 이상으로 높게 보고되고 있다.(*12*) 하지만 본 연구에서는 허혈성 및 외상상 쇼크후 혈액 배양에서는 전혀 균이 배양되지 않았고 PCR검사에서만 20%에서 양성을 보였다.

실험 동물에서 세균 전위는 비장에서 가장 높게 관찰되었으며 말초 혈액에서 전위를 증명하는 것이 제일 어렵고 혈액 배양 성공률 또한 낮다고 했다.(*17*) 본 연구에서도 혈액 배양 양성률이 13%로 나타났으며 이는 Kane 등(14%)(*6*)의 결과와 비슷하게 나타났다.

Kane 등(*2*)은 PCR과 Southern blotting 방법을 이용하면 0.3 ml의 혈액에서 대장균이 10 100개만 존재해도 균을 찾을 수 있다고 했으며 Yamashita 등(*3*)은 한개의 세균이나 100 fg의 chromosomal DNA만 있으면 PCR로 B. fragilis의 존재를 증명할 수 있을 만큼 PCR은 민감한 방법이라고 했다. 그러나 PCR을 이용하여 증명되는 세균 전위는 질적인(quality) 것이며 양적인(quantity) 측정이 되지 못해 염증의 정도를 알지 못하는 단점을 가지고 있으나,(*6*) 다른 어떤 방법에 비해 혈액에서 세균을 검출할 수 있는 우수한 방법으

로 여겨지고 있다.

본 연구에서도 혈액에서 세균 배양 방법(13%)에 비해 PCR (33 36%)이 세균 전이를 증명하는 데는 민감한 검사 방법이라는 것을 증명할 수 있었다.

세균 전위를 일으킬 수 있는 조건으로는 주로 화상,(*18*) 외상성 및 허혈성 쇼크,(*18*) 췌장염,(*19*) 경정맥 영양공급,(*11*) 항생제 치료,(*20*) 내독소증,(*10,17*) 장폐색증,(*7*) 면역억제제 복용,(*6,21*) 내독소 혈증 및 세균 감염,(*10,17*) 중증 외상 등(*22*)이 보고되어 있다.

1987년 Cerra 등은 다발성 장기 부전의 원인으로 장내 세균의 전위가 중요한 원인이 될 수 있음을 주장했고,(*24*) 다발성 장기 부전증은 외상이나, 수술 후 가장 빈번한 사망원인이며, 감염이 주요한 유발 요인으로 생각되고 있으며, 원인 균주는 E. coli와 B. fragilis 등으로 보고되고 있다.(*14,24*) 본 연구에서도 B. fragilis가 빈번한 균으로 판명되었다.

세균 전위가 환자의 예후에 영향을 주는 증거를 찾을 수 없다는 보고(*25*)가 있으나, 대체적으로 세균 전위가 외상 후 환자의 예후에 영향을 줄 수 있다고 보고하고 있으며,(*26,27*) Lemaire 등(*28*)은 세균 전위와 다발성 장기 부전증은 연관성이 있고, 최소한 후기 다발성 장기 부전증은 세균 전위와 유관하다는 결론을 내렸고, 본 연구의 결과에서도 PCR 반응검사에서 양성으로 판명된 경우는 58% 정도가 다발성 장기 부전증으로 이행된 것으로 나타났다.

Ryan 등(*29*)은 cardiopulmonary bypass 환자에서 그람 음성균에 의하여 세균 전위가 일어나면 32%의 사망률을 보이는 반면 세균 전위가 확인되지 않은 경우엔 사망자가 없었다고 보고했으며, Kane 등(*6*)의 연구에서는 PCR로 세균 전위가 증명된 경우는 32%의 사망률을 보여 세균 전위가 증명되지 않았던 경우보다 높은 사망률을 보여, 세균 전위가 예후를 예측할 수 있는 지표가 될 수 있음을 시사했다. 허혈성 쇼크의 경우 10 25%는 세균 전위에 의하여 다발성 장기 부전증을 유발하고 이 중 50 70%가 사망할 수 있으며,(*23,27*) Benoit 등(*30*)은 중증 허혈성 쇼크에서 세균 전위를 보인 경우 60%의 사망률을 보고했으나 대부분의 연구가 동물 실험에서 이루어졌다.

본 연구에서 장내 세균의 PCR에 양성을 보인 57.9%가 다발성 장기 부전증으로 이행되어 음성인 경우의 3.8%에 비해 높은 위험성을 가지는 것으로 나타내었으며, 사망률은 장내 세균의 PCR 양성의 73.6%와 음성의 11.5%가 사망하여 전체 사망률은 37.8%을 보였고, 사망 원인은 PCR에 양성을 보인 76.9%가 다발성 장기 부전증이었다. 장내 세균의 PCR에 양성을 보인 경우는 74% (E. coli)에서 81% (B. fragilis)의 높은 사망률로 음성군(12% 내지 14%)에 비해서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이로서 장내 세균의 전위는 환자의 예후에 중대한 영향을 줄 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

중증 다발성 외상이나 중증 감염 환자의 혈액에서 전신 염증성 반응의 원인으로 추정되는 장내 세균의 DNA를 PCR을 이용하여 증명할 수 있었고, 그람 음성 양성 세균이나 E. coli, B. fragilis가 비슷한 비율로 나타났다. 세균전위가 확인된 경우는 많은 수에서 염증반응의 원인이 되고 결국 다발성 장기 부전증으로 이행함으로써 중증 환자에서 세균 전위가 환자의 예후에 중대한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 실시한 실험 방법으로도 충분히 세균 전위를 증명할 수 있으므로 근원을 알 수 없는 세균혈증이나 전신 염증성 반응 시에는 PCR을 이용하여 혈중에서 장내 세균의 DNA를 확인하여 균주를 간접 증명하여 약물 치료나, 일정 기간 정기적으로 재검사를 실시하여 PCR검사의 변화 양상과 환자의 예후를 알아보는 연구가 환자의 치료 및 예후를 더욱 발전시킬 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Sprung CL. Definitions of sepsis: Have we reach a consensus? Crit Care Med 1991;19:849-51.
2) Kane TD, Johnson SR, Alexander JW, Babcock GF, Ogle CK. Detection of intestinal Bacterial translocation using PCR. J Surg Research 1996;63:59-63.
3) Yamashita Y, Kohno S, Koga H, Tomono K, Kaku M. Detection of Bacteroides fragilis in clinical specimens by PCR. J Clini Microbilol 1994;32:679-83.
4) Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. Infect Immun 1979;23:403-11.
5) Boder JR, Hassett J, LaDuca J, Seibel R, Steinberg S, Mills B. The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS= 40) in the ICU. Ann Surg 1987;206:427-48.
6) Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA. The detection of microbial DNA in the blood. Ann Surg 1998;27:1-9.
7) Deicth EA. Simple intestinal obstruction causes Bacterial translocation in man. Arch Surg 1989;124:699-701.
8) Croy RDD, ed. Plant molecular biology. Labfax. Durham, UK: Bios Scientific Publishers, Academic Press 1992.
9) Relman DA, Schmidt TM, Mac Dermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipples disease. New Eng J Med 1992;327:295-301.
10) Rush BF, Sori AJ, Murphy TF, Smith S, Flanagan JJ, Machiedo GW, et al. Endxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis? Ann Surg 1988;207:549-52.
11) Alverdy JC, Aoys E, Moss GS. Total parenteral nutrition pro-

motes bacterial translocation from the gut. Surgery 1988;104: 185-90.
12) Barriere SL, PharmD, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. Crit Care Med 1995;23:376-93.
13) Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischemia-reperfusion injury to the intestine. Aust N Z J Surg 1998;68:554-61.
14) Fry DE, Pearlstein LP, Fulton RL, Polk HC Jr. Multiple system failure: The role of uncontrolled infection. Arch Surg 1980; 115:136-40.
15) Kale IT, Kuzu MA, Berkem H, Berkem R, Acar N. The presence of hemorrhagic shock increases the rate of bacterial translocation in blunt abdominal trauma. J Trauma 1998;44: 171-4.
16) Sori A, Rush B, Lysz T, Smith S, Machied G. The gut as a source of sepsis following hemorrhagic shock. Am J Surg 1988;155:187-92.
17) Kelly JL, OSullivan C, O'Riordain M, O'Riordain D, Lyons A, Doherty H, et al. Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury. Ann Surg 1997;225:530-43.
18) Deitch EA, Winterton J, Berg RD. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. Arch Surg 1984;119:166-72.
19) Gianotti L, Munda R, Alexander JW, Tchervenkov JI, Babcock GF. Bacterial translocation; a potential source for infection in acute pancreatitis. Pancreas 1993;8:551-8.
20) Berg RD. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. Intect Immun 1981; 33:854-61.
21) Lennard TW, Shenton BK, Borzoota A, Donnelly PK, White M, Gerrie LM, et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system. Br J Surg 1985; 72:711-6.
22) Maejima K, Deitch EA, Berg R. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract of mice. Arch Surg 1984;119:166-72.
23) Cerra FB. Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. Surgery 1987;101:1-14.
24) Tran DD, Guesta MA, van Leewen PAM, Nauta JJP, Wesdrop RIC. Risk factors for multiple organ system failure and death in critically injured patients. Surg 1993;114:21-30.
25) Peitzman AB, Udekwu AO, Ochoa J, Smith S. Bacterial translocation in trauma patients. J Trauma 1991;31:1083-97.
26) Sun Y, Hardaway RM, Williams CH. Comparison of bacterial translocation during traumatic shock and hemorrhagic shock in rats. Int Surg 1997;82:134-6.
27) Fukushima R, Kobayashi S, Okinaga K. Bacterial translocation in multiple organ failure. Nippon Geka Gakkai Zasshi 1998; 99:497-503.
28) Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenona still unproven. Br J Surg 1997;84:1340-50.
29) Ryan T, Mc Carthy JF, Rady MY, Serkey J, Gordon S, Starr NJ, et al. Early bloodstream infection after cardiopulmonary bypass: frequency rate, risk factors, and implications. Crit Care Med 1997;25:2009-14.
30) Benoit R, Rowe S, Watkins SC, Boyle P, Garrett M, Alber S, et al. Pure endotoxin does not pass across the intestinal epithelium in vitro. Shock 1998;10:43-8.