

이학석사 학위논문

Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase
Chain Reaction (RAPD-PCR)을 이용한 녹농균
(*Pseudomonas aeruginosa*)에서 유전적 다양성

2002年 2月

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

산 업 미 생 물 학 과

오 진 희

이학석사 학위논문

Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase
Chain Reaction (RAPD-PCR)을 이용한 녹농균
(*Pseudomonas aeruginosa*)에서 유전적 다양성

지도교수 김 영 태

이 論文을 理學 碩士 學位論文으로 提出함

2002年 2月

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

산 업 미 생 물 학 과

오 진 희

이 논문을 오진희의 이학석사
학위논문으로 인준함

2001년 12月

주 심 이학박사 최태진 ⑩

위 원 이학박사 이명숙 ⑩

위 원 이학박사 김영태 ⑩

목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 사용 균주	5
2. 균주의 동정	7
3. RAPD-PCR	9
4. Similarity Analysis	10
5. DNA Sequencing	11
III. 결 과	12
1. 생화학적 시험	12
2. Disk diffusion	14
3. RAPD-PCR	17
4. Similarity Analysis	19
5. Sequencing Analysis	25
IV. 고 찰	29
V. 요 약	31
VI. 참고문헌	32
VII. 감사의 글	36

Genetic Variation in *Pseudomonas aeruginosa*
using Random Amplified Polymorphic DNA
Polymerase Chain Recation (RAPD-PCR)

Jin-Hee OH

*Department of Industrial Microbiology, Graduate School of Industry,
Pukyong National University*

ABSTRACT

The Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, is a life-threatening nosocomial pathogen, which is a leading cause of mortality, particularly in patients who suffer from burns, immunosuppression, traumatic wounds and cystic fibrosis. This study was focused on the molecular analysis of *P. aeruginosa* using Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Recation (RAPD-PCR) techniques in order to investigate genetic variation and establish strain relatedness.

P. aeruginosa strains were isolated from 16 patients at P National Hospital in Pusan from July to September in 2000 and analyzed for biochemical characteristics using a biochemical test and a disk diffusion. Also, genetic variation in *P. aeruginosa* was investigated by RAPD-PCR techniques using a random 10-mer primer (OPA-17).

The results showed that 16 *P. aeruginosa* strains were divided into

three classes (Class I, Class II, Class III) in RAPD phenogram. A PCR fragment of 482 bp that common in all RAPD profiles generated by 16 strains and a standard *P. aeruginosa* (ATCC 10145) was unique for *P. aeruginosa*. Although RAPD-PCR profiles of *E. coli* and *K. pneumonia* were similar to that of *P. aeruginosa*, the 482 bp fragment was not detected from them. Therefore, the amplified fragment (482 bp) could be applied for the tools of rapid diagnosis of *P. aeruginosa*.

I . 서 론

녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)은 극단모의 운동성이 있는 그람음성의 호기성 간균으로 토양과 동·식물에서 발견되는 균이다 (1, 2). 생활 환경에 널리 분포하고 있으며 인체에서는 정상 세균 총 (정상인의 분변 또는 객담에서 3~5%)으로 병원 내에서는 습한 환경이나 기구, 의료인의 신체 일부 등에 분포하고 있다 (3). 과거 병원 내 감염은 주로 *Staphylococcus aureus*를 비롯한 그람양성균들이 주를 이루었으나, 최근에는 그람음성균에 의한 감염이 주류를 이루고 있다. 최근에는 그람음성균, 그 중에서도 기회 감염균으로서 *P. aeruginosa*가 병원 내 감염의 16% 이상을 차지하고 있어 *P. aeruginosa*균의 연구 중요성이 강조되고 있다 (4). 대부분의 병원 내 감염이 그렇듯이 *P. aeruginosa*에 의한 감염도 직·간접의 접촉에 의한 감염으로 의료인의 손을 통해서 환자에서 환자에게로 감염되어 확산되고 있다.

*P. aeruginosa*에 의한 질병의 범위는 catheter를 사용하는 비뇨기계 감염 (12%) (5), 혈관계 감염 (10%) (6), 외과적인 수술후의 감염(8%) (7), 폐렴·폐혈증의 감염 (30%) (8, 9)등 전신의 어느 부위에서나 질병을 유발할 수 있고 면역기능이 저하된 여러 가지 중양 환자, 창상, 화상 환자들에게서 높은 이환율을 보인다. 또한 각종 항암 치료 과정이나 골수 이식 등의 각종 이식술 시행 과정에서 수반되는 면역 저하자의 사망 및 *P. aeruginosa*에 감염된 AIDS환자의 50% 정도가 사망하게 되는 치명적인 균이다 (10). 구미에서 볼 수 있는 cystic fibrosis환자에서 *P. aeruginosa*는 가장 중요한 병원균으로 유병율이 70-80%까지 보고되었으며 진행성의 호흡기 감염을 유발하기 때문에 이에 대한 연구가 활발히 진행중이다 (11).

*Escherichia coli*의 genome 크기는 4.6 mbp (million base pairs)인데 비해 *P. aeruginosa*의 genome 크기는 6.3 mbp로 다양한 약제 내성을 가지며 치

료 중 내성을 획득할 능력, 다양성, 고도의 환경적 적응력을 보이고 있어 문제가 되고 있다 (12). 이러한 *P. aeruginosa*는 임상 검체에서는 모두 같은 균종으로 보고가 되고 있어 좀 더 정확한 유전적 다양성의 확인 연구가 요구되고 있다. 그동안 *P. aeruginosa*의 균주를 감별하기 위해서 여러 가지 표현형 방법 (phage typing, serologic typing, antibiogram typing, pyocin typing 등) (13)과 여러 가지 분자 생물학적 방법 (PEFG, AP-PCR, AFLP, RFLP)이 이용되어져 왔으나 경제적인 비용과 단 시간 내에 유전적 다양성을 비교 할 수 있는 형별 구분 방법으로 RAPD-PCR을 사용하였다 (14, 15, 22).

P. aeruginosa PA01은 유전자 염기 서열이 밝혀져 있기는 하나(12) 다양성과 변이성이 큰 *P. aeruginosa*의 임상 검체에서 알려진 특정 유전자를 대상으로 PCR 반응 후 다른 균들과 종간 차이를 보이는 특이적인 genome을 찾기란 어려운 실정이다. 따라서 유전적 다양성을 조사하기 위해 10-nucleotides로 구성이 된 임의의 primer (OPA-17, Operon)를 사용하여 임의의 DNA 절편들이 증폭되는 DNA profile에 기초를 둔 RAPD-PCR을 시행하여 DNA 증폭 양식을 조사하였으며, *P. aeruginosa* 종간의 차이를 보이는 특이적인 band와 그 염기 서열을 분석하였다. 또한 각 검체들 사이의 유사성을 검토하여 역학적 조사의 기초 자료로 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주

본 실험에서는 2000년 7월부터 2000년 9월까지 부산 지역의 P대학 병원 16명의 환자에게서 분리된 *P. aeruginosa* 16균주를 사용하였다 (Table 1). 16명의 환자 중 남자는 10명 여자는 6명이며 연령은 13세부터 74세까지 다양하였다. 16명의 환자들 중 5명이 일반외과 (GS), 4명이 신경과 (NL), 2명이 신경외과 중환자실(NSICU), 2명이 흉부외과 (TS), 그 밖에 정형외과 (OS), 비뇨기과(UR), 응급실 (ER)이 각 1명씩이었다. 병동별로는 중환자실 4 예, 8층 북쪽 병실 (8N) 4 예, 신경외과 중환자실 2 예, 7층 북쪽 병실(7N) 2 예, 그리고 6층 북쪽 병실 (6N), 6층 남쪽 병실 (6S), 응급실에서 각 1 예씩이었다. 검체 부위는 비뇨 생식기 6 예, 호흡기 5 예, pus나 wound인 기타 4 예, 혈액 1 예 등의 순서였다.

표준 균주로서는 *P. aeruginosa* KCTC 1750 (ATCC 10145)을 사용하였고 대조 균주로서는 *P. aeruginosa*가 다른 그람 음성균들과 달리 장내 세균처럼 병원에 입원한 면역 저하자들에게 정착이 잘 되므로 *E. coli* KCTC 2241 (ATCC 11775)를 사용하였고 *P. aeruginosa* 처럼 호흡 기구 (ventilator tube, nebulizer, humidity)에서 쉽게 감염되며 임상적으로 유사 증상을 보이므로 *K. pneumonia* KCTC 2208 (ATCC 13883) 각 1 균주씩 3 균주를 KIST로부터 분양 받아 사용하였다.

Table 1. The sources of specimens

Strain	sex/ age	Unit/Ward	Source of specimen
P 1	M/ 53	NS/NSICU	sputum
P 2	M/ 19	T S/6S	urine, catheter
P 3	M/ 44	OS/ 2N	other
P 4	F/ 18	NL/ICU	sputum
P 5	F/ 13	GS/8N	other
P 6	M/ 41	GS/ICU	sputum
P 7	F/ 18	NL/ICU	urine, catheter
P 8	M/ 29	GS/8N	other
P 9	M/ 45	GS/8N	blood
P 10	M/ 65	NL/ 7N	urine
P 11	F/ 74	NS/NSICU	urine, catheter
P 12	M/ 41	GS/8N	other
P 13	F/ 44	NL/ 7N	urine, catheter
P 14	M/ 40	T S/ICU	sputum
P 15	M/ 74	UR/6N	urine
P 16	F/ 73	ER	sputum

GS: General Sugrery NL: Neurology
TS: Thoracic Surgery UR: Urology
OS: Orthopedic Surgery ER: Emergency Room
NSICU: Neuroscience Intensive Care Unit
ICU: Intensive Care Unit
N: North ward
S: South ward

2. 균주의 동정

각 검체를 Blood Agar Plate (BAP)와 MacConkey agar에 접종하여 37°C에서 24 시간 배양한 후 BAP 상에서는 β -hemolysis로 발육하고 MacConkey agar상에서는 colorless한 집락으로 두 배지에 동시에 발육되는 균을 Gram stain후 Gram negative bacillus로 판단되는 균 중 *P. aeruginosa*의 두드러진 특징이기도 한 녹색·형광의 색소 (pyocyanin, fluorecein)를 나타내는 균을 택하였다 (16).

2- 1) Oxidase test

Oxidase test는 Becton Dickinson사에서 나오는 plate (Oxidase reagent: 1% tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochlorid)에 spot test로 시행했다. 양성인 경우에 30초 이내에 색깔이 blue에서 purple까지 변하는 것으로 판독하였다.

2- 2) Triple Sugar Iron (TSI)

BAP나 MacConkey agar배지에서 자란 세균 중 Oxidase 시험 양성으로 나오는 균은 포도당 비발효균 (Non glucose fermented bacilli)으로 단정하고 동정 하였다.

TSI배지는 그람음성균의 당 (lactose 1%, sucrose 1%, dextrose 0.1%) 이용 여부를 관찰하는 배지로 *P. aeruginosa*는 당을 분해하지 못하는 점을 들어 slant/butt의 색깔 변화로 판독을 하였다.

2-3) Disk Diffusion

평판배지에서 분리된 동일한 형태의 집락 3-5개 이상을 4-5 ml의 액체 배지 (Tryptic Soy Broth)에 풀은 후 37°C에서 2-6시간 사이에 배양하여 McFarland 0.5 (1.5×10^8) 농도 이상으로 발육될 때까지 배양하였다. 3-5시간 배양 후 Muller Hinton agar에 골고루 도말 한 후 다음의 항생제를 놓고 공기 중에 16-18시간 방치 후 발육 억제대를 판독하였다 (16). 항균제 도말 disks 로 amikacin (30µg), cefoperazone (75µg), ciprofloxacin (5µg), imipenem (10µg), gentamicin (10µg), piperacillin (100µg), trimethoprim/ sulfamethoxazole (1.25/ 23.75 µg), ticarcillin (75µg), tobramycin (10 µg) 이상 9가지를 사용하였으며 판정은 표준 디스크 확산법을 따랐다 (17).

3. RAPD-PCR

RAPD-PCR의 주형으로 사용할 genmoic DNA는 Wizard Genmoic DNA Purification Kit (Promega)의 방법으로 추출하였다. Arbitrary primer들은 10 nucleotides로 구성된 Operon사의 primer OPA-1부터 OPA-20까지 RAPD-PCR을 실시한 결과, OPA-17이 유사성과 재현성이 뛰어나서 본 실험의 RAPD-PCR의 primer로 사용하였다. OPA-17은 염기서열이 5'-GACCGCTTGT-3'이며, GC content는 60%이다. 전기 영동 시 표준 분자량 marker로는 ladder marker (100bp)와 λ -Hind III digestion marker를 사용하였다.

PCR을 위한 반응액은 dNTP (2.5mM) 4 μ l, 10 $\times$ PCR buffer 4 μ l, primer (20pmol) 1 μ l, genomic DNA (10ng) 1 μ l, Taq DNA polymerase (2.5 unit) 0.5 μ l를 첨가하고 증류수를 사용하여 최종 반응액이 25 μ l되게 제조하였다. PCR 반응은 Perkim Elmer 2400에서 denaturation은 94°C, 30 초, annealing은 35°C, 30 초, extension은 72°C, 1 분 20 초의 순서로 35회를 시행한 후 72°C에서 7분간 증폭하였다. PCR증폭 산물은 1.5% agarose gel 상에서 100 Volt, 30 분 전기 영동하였고 EtBr에서 15분간 염색한 후 증류수에 5분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하였다.

4. Similarity Analysis

각 군주 간의 유사도 측정을 위하여 RAPD-PCR 사진 상에 나타난 PCR 생성물을 각각 하나의 band로 간주하여 각각의 위치에 생성된 band의 유무에 따라 1과 0으로 표시하여 data matrix를 작성하였다. 이들 data는 유전적 연관성을 알아보기 위해 통계 처리 프로그램인 MVSP를 이용하여 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average))분석의 clustering program으로 Jaccard's coefficient에 의해 similarity matrix를 산출하는데 사용하였고 이를 바탕으로 phenogram을 작성하여 군주 간의 유전적 유사도를 구하였다.

5. DNA Sequencing

UV로 관찰된 RAPD-PCR band의 염기서열을 확인하기 위해 gel에서 원하는 band를 칼로 잘라내어 NaI와 Resin을 이용하여 DNA를 회수하고, pGEM-T vector로 ligation시켰다. pGEM-T vector로 재조합된 DNA를 XL1-Blue에 형질전환시켜 X-gal과 IPTG와 포함된 LB plate에 도말하여 positive clone를 얻었다. Sequencing을 위한 DNA정제는 Wizard DNA purification kit를 이용하여 plasmid DNA를 정제하였다. 분광 광도계를 이용하여 DNA의 양을 측정하였다. 염기 서열 분석은 ABI PRISM 310 automatic sequencer (Perkin Elmer)를 이용하였다.

정제한 Plasmid DNA의 염기 서열을 분석하기 위해서 먼저 sequencing 반응을 시행하였다. 반응액은 terminator ready mix 8 μ l, DNA 1 μ g, primer 3.2pmol을 섞은 다음 최종 반응액이 20 μ l가 되도록 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. denaturation 96°C에서 10초, annealing은 50°C에서 5sec, extension은 60°C에서 4sec의 cycle을 25회 실시한 다음, 3M sodium acetate (PH 4.6 or 5.2) 2 μ l와 100% EtOH 50 μ l 첨가한 후에 -70°C에서 10분간 반응시켰다. 13,000rpm에서 10분간 원심 분리 한 후에 70% EtOH를 이용하여 washing한 다음 건조시켰다. 25 μ l의 TSR (Template Suppression Reagent)를 첨가 한 후에 교반 하였다. 원심 분리한 다음에 95°C에서 2분간 변성 시킨 후에 급냉 시키고 ABI PRISM 310 genetic analyzer를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

III. 결 과

1. Oxidase 와 TSI test의 결과

보통의 임상 실험실에서는 *P. aeruginosa*는 배지상의 형태, 색깔, 균 특이 색소 유무, 그람 염색, oxidase test, TSI 후 결과를 판정하게 된다. 본 실험은 blood agar plate, MaConkey agar상에서 *P. aeruginosa*로 생각이 되어지는 16 검체의 집락을 모두 oxidase test한 결과 blue에서 deep purple까지의 색깔 변화가 관찰되면서 모두 oxidase 양성으로 판정이 되었다. Oxidase test에서 모두 양성으로 판정이 된 집락을 TSI한 결과 모두 K/K (Alkali slant/Alkali butt)로 당 분해능이 없는 것으로 판정이 되어 균주 모두 *P. aeruginosa* 균임을 알게 되었다 (Table 2).

Table 2. The result of oxidase and TSI tests of *P. aeruginosa*

specimen	Oxidase	TSI
P 1	purple	K/ K
P 2	deep blue	K/ K ^w
P 3	purple	K/ K
P 4	deep purple	K/ K
P 5	purple	K/ K
P 6	purple	K/ K ^w
P 7	purple	K/ K
P 8	purple	K/ K
P 9	blue	K/ K
P 10	purple ^w	K/ K
P 11	deep blue	K/ K
P 12	deep blue	K/ K
P 13	purple	K/ K
P 14	deep blue	K/ K ^w
P 15	purple	K/ K
P 16	purple	K/ K

W: Weakly

K: Alkali

2. Disk diffusion

Disk diffusion test는 배양시간 동안 디스크의 항균제는 주위의 한천으로 확산하므로, 디스크 바로 주변의 한천에는 항균제가 고농도로 분포하지만, 디스크에서 먼 곳의 한천에는 항균제가 낮은 농도로 분포한다. 이와 같은 한천의 항균제 농도 경사에 의해서 세균 증식의 억제대가 형성된다. 디스크 확산법에서는 이 억제대의 지름을 측정해서 균주의 시험 항균제에 대한 감수성 양상을 결정한다. 디스크 확산법으로는 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)를 측정할 수 없는 단점이 있으나 이 방법은 시험이 간단하고, 비용이 적게들며, *P. aeruginosa*가 여러 가지 항생제에 내성이 있으므로 시험 항균제를 수시로 바꿀 수 있는 장점이 있어 본 연구에서 이용하였다. 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)을 따랐다.

임상에서 흔히 쓰이는 9개의 disk를 이용하여 16 균주의 resistant를 조사한 바 amikacin ($R:\leq 14$)에서는 16 균주 중 2 균주로 12.5%의 resistant를, tobramycin ($R:\leq 12\mu g$)에서는 3 균주로 18.75%, ciprofloxacin ($R:\leq 15$)에서는 6 균주로 37.5%, cefoperazone ($R:\leq 15$)에서는 4 균주로 25%, gentamycin ($R:\leq 12$)에서는 4 균주로 25%, imipenem ($R:\leq 13$)에서는 4 균주로 25%, , piperacillin ($R:\leq 17$)에서는 5 균주로 31.25%, ticacillin ($R:\leq 14$)에서는 4 균주로 25%, trimethoprim/ sulfamethoxazole ($R:\leq 10$)에서는 15 균주로 93.75%의 resistant를 나타내었다 (Table 3).

그 중에서 trimethoprim/ sulfamethoxazole에 대한 resistant는 90%가 넘어서 항균력이 상당히 떨어지는 것으로 조사가 되었고 *P. aeruginosa* 감염시 항균력이 있는 cepheims 계로 알려진 cefoperazone이나 antipseudomonal penicillin 계열인 piperacillin에서는 감수성이 각 25%와 31.25%로 비교적 항균력이 있었다. Aminoglycoside 중 gentamycin과

tobramycin는 항균 범위가 비슷하지만 gentamycin은 *Serratia*에, tobramycin은 *P. aeruginosa*에 대한 항균력이 더 강한 것으로 알려져 있는데 본 실험에서도 근소한 차이지만 *P. aeruginosa*에서는 tobramycin이 gentamycin 보다 는 조금 높은 항균력을 나타냈으며 Aminoglycoside 중 항균력이 우수한 gentamycin과 tobramycin에 내성인 세균의 대부분에서도 항균력이 있는 것으로 알려진 amikacin은 resistant가 12.5%로 항균력이 우수한 것으로 나타났다. 또 16 균주에서 분리된 3 균주 (3, 10, 13번)는 각 1 가지 약제에서만 감수성을 나타내고 있어 다약제 내성균에 의한 감염으로 사료되었다.

Table 3. Antibiotic susceptibility of 16 strains

Strain number	Antibiotic susceptibility pattern								
	AMK	TBA	CIP	CFZ	GEN	IPM	SXT	PIP	TCA
P 1	S	S	R	S	R	S	R	S	S
P 2	S	I	S	R	S	S	R	S	S
P 3	S	R	R	R	R	R	R	R	R
P 4	S	S	R	S	S	R	R	S	S
P 5	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P 6	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P 7	S	R	S	I	S	S	S	R	I
P 8	S	S	S	S	S	S	R	R	S
P 9	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P 10	R	R	R	R	R	S	R	R	R
P 11	S	I	R	I	I	R	R	S	R
P 12	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P 13	R	S	R	R	R	R	R	R	R
P 14	S	S	S	S	S	S	R	S	S
P 15	S	I	S	S	S	S	R	S	S
P 16	S	S	S	S	S	S	R	S	S

Abbreviations: AMK, amikacin; TBA, tobramycin; CIP, ciprofloxacin;

CFZ, ceoperazone; GEN, gentamycin; IMP, imipenem;

PPA, piperacillin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole;

TCA, ticacillin

I, Intermediate; S, Susceptible; R, Resistant.

3. RAPD - PCR

임상 검체에서 분리한 *P. aeruginosa* 균주들에게서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하고, OPA-17을 primer로 사용하여 RAPD-PCR을 수행한 결과를 분석하였다 (Figure 1). *P. aeruginosa* ATCC 10145을 표준 균주로 사용하였으며 표준 균주를 포함하여 16 균주의 RAPD profile을 분석해 보면 모든 균주에서 약 500 bp에 해당되는 곳에 공통의 특이 band를 나타냈다. 반면에 대조 균주로 사용한 *E. coli*와 임상적으로 유사 증상을 보이는 *K. pneumonia*를 주형으로 사용한 곳에서는 500 bp에 band가 나타나지 않았다. 따라서 500 bp에 해당되는 특이 band는 *P. aeruginosa* 균들을 신속 진단하는 특이 band로 사료되어 이에 대한 염기 서열 분석을 병행하였다.

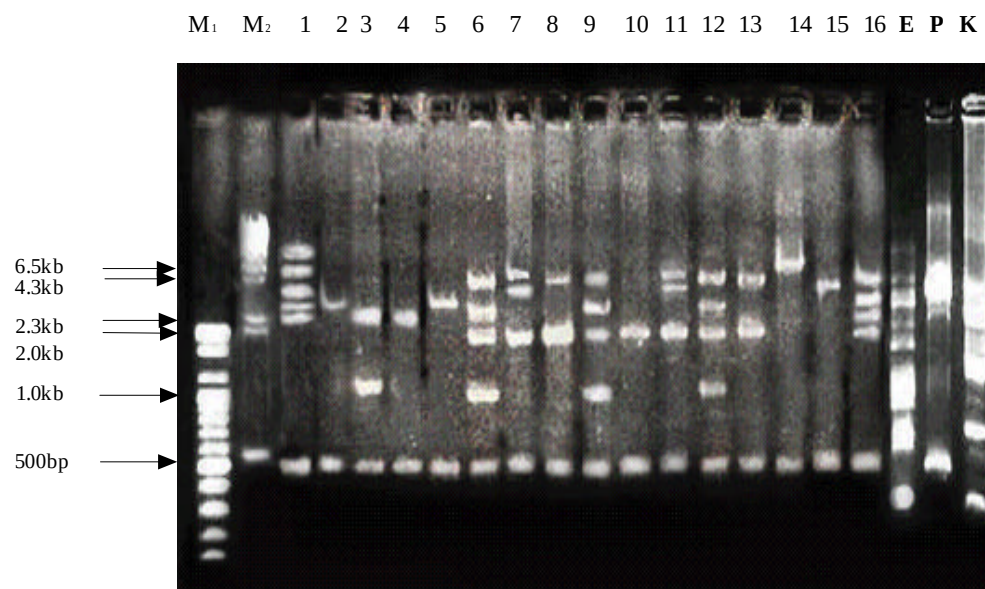


Fig 1. RAPD profile of genomic DNAs from *P. aeruginosa* and others using OPA - 17 primer.

Lane M 1; 100 bp DNA marker, Lane M 2; Lambda Hid III digestion marker, Lanse 3 18; *P. aeruginosa* strains, Lane 19; *E. coli* ATCC 11775, Lane 20; *P. aeruginosa* ATCC 10145, Lane 21; *K. pneumonia* ATCC 13883

4. Similarity Analysis

실험에서 사용된 균주간의 Similarity matrix를 분석한 결과Jaccard's coefficient의 유사도의 범위는 0.1에서 1.00까지 였는데 유사성이 높은 검체들이 있음에도 불구하고 유사도가 낮은 것은 전혀 유사성이 없는 독립적인 검체들이 한 class를 이루고 있기 때문에 유사도의 범위가 넓어져 있다 (Table 4, 5).

RAPD phenogram에 나타난 band들의 구성과 분포상에 따라 17 균주 (*P. aeruginosa* ATCC 10145 포함)를 크게 Class I, II, III로 나눌 수가 있었다 (Fig 2). Class I은 P3와 P4가 비교적 유사하나 각 검체들 사이의 유사성을 찾기가 어려운 그룹으로 독립적인 유사성이 거의 없는 검체들의 그룹이다. Class II에서는 P13과 P8이 유사성이 1.000 일치하는데 P13은 7병동 신경과 환자이고, P8은 8병동 일반 외과 환자의 검체로 시료 채취 위치와 진료과가 상이한 것에 비해 균주가 정확히 일치함을 보여 동일 균주에 의한 원내 감염으로 추정이 된다. Class III에서 P11과 P7의 유사성이 1.000으로 일치하는데 P11은 신경외과의 신경외과 중환자실 환자의 검체이고 P7은 신경과의 중환자실 환자의 검체인데 유사성이 1.00으로 일치하여 동일 균주의 감염으로 추정이 된다. 또 Class III에서 P12와 P9는 모두 8병동에 있는 일반외과 환자로 부터의 검체이고 P12, 9는 모두 disk diffusion에서 9가지 다른 항생제가 포함된 disk 중에서 한가지 항생제(trimethoprim/sulfamethoxazole)에만 내성을 나타내고 있고, 유사성이 1.000로 나타나 동일 균주에 의한 감염으로 추정이 된다.

Table 6은 17 균주 (*P. aeruginosa* ATCC 10145 포함)의 병실별, 분리 검체별로 그 기원과 RAPD 분석 아형을 나타낸 것이다. 여기서 유사성이 높은 class III의 검체들은 주로 일반외과 환자들 검체들로 일반외과 환자들에게서 수술 후 *P. aeruginosa* 감염시 원내 감염의 확산 경로 (의료인을 통한 감염,

환자들 상호간의 감염, 의료 기구를 통한 감염 등)를 통해 확산 방지되고 있음을 알 수 있다.

**Table 4. Similarity matrix based on Jaccard's coefficient of 17
P. aeruginosa strains**

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17
P1	1.000																
P2	0.333	1.000															
P3	0.286	0.250	1.000														
P4	0.333	0.333	0.667	1.000													
P5	0.143	0.333	0.250	0.333	1.000												
P6	0.200	0.143	0.286	0.143	0.143	1.000											
P7	0.250	0.200	0.167	0.200	0.200	0.667	1.000										
P8	0.125	0.250	0.200	0.250	0.250	0.286	0.400	1.000									
P9	0.333	0.333	0.286	0.143	0.143	0.714	0.667	0.286	1.000								
P10	0.143	0.333	0.250	0.333	0.333	0.333	0.500	0.667	0.333	1.000							
P11	0.250	0.200	0.167	0.200	0.200	0.667	1.000	0.400	0.667	0.500	1.000						
P12	0.333	0.333	0.286	0.143	0.143	0.714	0.667	0.286	1.000	0.333	0.667	1.000					
P13	0.125	0.250	0.200	0.250	0.250	0.286	0.400	1.000	0.286	0.667	0.400	0.286	1.000				
P14	0.333	0.333	0.250	0.333	0.333	0.143	0.200	0.250	0.143	0.333	0.200	0.143	0.250	1.000			
P15	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.143	0.000	0.250	0.143	0.000	0.000	0.143	0.250	0.000	1.000		
P16	0.375	0.400	0.333	0.400	0.167	0.222	0.286	0.600	0.375	0.400	0.286	0.375	0.600	0.167	0.167	1.000	
P17	0.143	0.333	0.250	0.333	0.333	0.143	0.200	0.667	0.143	0.333	0.200	0.143	0.667	0.333	0.333	0.400	1.000

17: *P. aeruginosa* ATCC 10145

**Table 5. Similarity matrix based on Jaccard's coefficient of 16
P. aeruginosa strains.**

Node	Group 1	Group 2	Similarity	Objects in group
1	P 11	P 7	1.000	2
2	P 13	P 8	1.000	2
3	P 12	P 9	1.000	2
4	Node 3	P 6	0.714	3
5	P 3	P 4	0.667	2
6	Node 1	Node 4	0.667	5
7	Node 2	P 10	0.667	3
8	Node 7	P 17	0.556	4
9	P 16	Node 8	0.500	5
10	P 2	P 14	0.333	2
11	Node 10	P 1	0.333	3
12	Node 6	Node 9	0.307	10
13	Node 5	Node 11	0.298	5
14	Node 13	P 5	0.279	6
15	Node 14	Node 12	0.237	16
16	Node 15	P 15	0.105	7

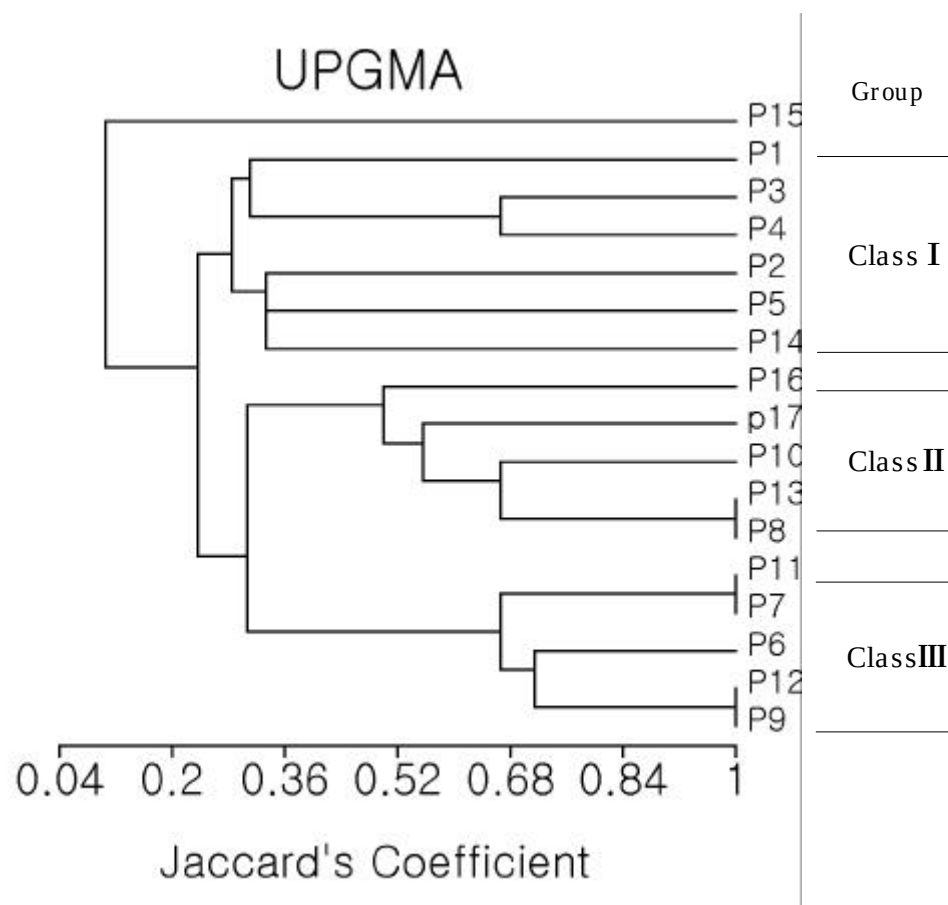


Fig 2. RAPD phenogram of *P. aeruginosa* strains

Table 6. RAPD typing of *P. aeruginosa* strains

strain	sample source	unit/ward	RAPD type
P 1	sputum	NS/NSICU	class I
P 2	urine, catheter	TS/6S	class I
P 3	other	OS/2N	class I
P 4	sputum	NL/ICU	class I
P 5	other	GS/8N	class I
P 6	sputum	GS/ICU	class III
P 7	urine, catheter	NL/ICU	class III
P 8	other	GS/8N	class II
P 9	blood	GS/8N	class III
P10	urine,	NL/7N	class II
P11	urine, catheter	NS/NSICU	class III
P12	other	GS/8N	class III
P13	urine, catheter	NL/7N	class II
P14	sputum	TS/ICU	class I
P15	urine,	UR/6N	-
P16	sputum	ER	class II
P17	ATCC 10145	ATCC 10145	class II

GS: General Sugrery

NL: Neurology

TS: Thoracic Surgery

OS: Orthopedic Surgery d

UR: Urology

ER: Emergency Room

ICU: Intensive Care Unit

NSICU: Neuroscience Intensive Care Unit,

N: North ward

S: South ward

5. Sequence Analysis

P. aeruginosa ATCC 10145 표준 균주를 포함한 17균주의 RAPD profile 을 분석하면 약 500 bp에서 공통의 특이 band를 나타냈다. 반면에 대조 균주 로 사용한 *E. coli*와 임상적으로 유사 증상을 보이는 *K. pneumonia*는 500 bp 부근에 어떠한 band도 나타나지 않았다. 따라서 *P. aeruginosa*에서 나타 내는 500 bp의 특이 band가 *P. aeruginosa*의 genomic DNA를 주형으로 사 용할 때에만 OPA-17에서 증폭되는 *P. aeruginosa*의 특정 DNA라면 *P. aeruginosa*균의 신속 진단법등에 OPA-17을 primer로 사용하는 RAPD-PCR 방법을 개발 할 수 있다고 사료되어, 약 500 bp의 특이 band의 염기서열을 분석한 결과 *P. aeruginosa* (strain Ps388)에서 밝혀진 exotoxin A gene의 5' end로 밝혀졌으며 증폭된 염기 수는 482 bp였다 (Fig 3, 4).

*P. aeruginosa*는 colonization후에 pyocyanin, exotoxin A, exoenzyme S, proteases (alkaline protease, elastase, LasA protease), hemolysins (phospholipase C, rhamnolipid) 등과 같은 여러 가지 독성 단백질 및 분해 효소들을 성장 후기에 생산하여 세포외로 이동 시킴으로서 tissue damage, bloodstream invasion, dissemination 등과 같은 현상을 야기한다 (18). 그 중 강한 치사성을 나타내는 중요한 2가지 extracellular protein toxin을 생산하는 데 exoenzyme S와 exotoxin A이 그것이다. exoenzyme S는 exotoxin A와는 다른 toxin으로서 *P. aeruginosa*가 폐 조직을 감염시킬 때 조직의 직접적인 파괴와 확산에 관여한다 (19). Diphtheria toxin과 같은 기전을 가지는 exotoxin A는 임상 검체에서 많이 검출이 되는 toxin으로 *P. aeruginosa*에 의해 야기되는 local 과 systemic disease (20), immunosuppression (21) 환자 들에서 주로 생산이 된다. 이런 482 bp 특이 band가 exotoxin A로 확인됨으 로써 16명의 환자 모두 *P. aeruginosa*에 감염되었고 여러 가지 독성 단백질 과 분해 효소들 중 exotoxin A에 의한 부분적, 전신적 감염과 면역 저하를

겪고 있음을 알 수 있다.

5' →
 gaccgctt gt t caccgat ct cttccgccgt acgggt aagg aaattctttg 50
 caccaggt ggt aatcttc ttctgattca gcagt agttt ttgattcttt 100
 tgctggaggg cgtttccaac gatggtcaga ctgcggttga tgacgtccaa 150
 tggtgcaaga ttctttgccg gaccaagagc ggcatcagcc ttatccagct 200
 cggcttgtac cgacgcctca agttttttct cggcatctcg gaactgaagc 250
 tcgatctccc tgcgtttttc tttaacctga agaggaacat agcgtctggg 300
 gtcaacgccc agatcagcat aactttcaaa ctcttgccag ccattttcag 350
 tggacgaatc caagccgtgc tctataggtc tggcaatggg gccaatgccg 400
 gtacctcccc cagggccgt aataaacgtct ccgcttgccg tgacagttgt 450
 agagttgaag tggataaggt caacaagcgg tc 482
 ← 3'

Fig 3. The nucleotide sequence of *P. aeruginosa* RAPD-PCR fragment.

length = 2589 Identities = 478/482 (99%) Strand = Plus / Plus

```

Query:   1   gaccgctt gtt caccgat ct ct tccgccgt acgggt aaggaaat tcttt gcacccaggct g   61
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 964   caccgctt gtt caccgat ct ct tccgccgt acgggt aaggaaat tcttt gcacccaggct g   1023

Query:   62   gt aatcttcttct gat t cagcagt agt tttt gat tctttt gct ggagggcgt t tccaacg   121
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1024   gt aatcttcttct gat t cagcagt agt tttt gat tctttt gct ggagggcgt t tccaacg   1083

Query:   122   at ggt cagact gcggtt gat gacgt ccaat ggt gcaagatt tcttt gccggaccaagagcg   181
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1084   at ggt cagact gcggtt gat gacgt ccaat ggt gcaagatt tcttt gccggaccaagagcg   1143

Query:   182   gcatcagcctt at ccagct cggctt gt accgacgcct caagt ttttt ct cggcat ct cgg   241
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1144   gcatcagcctt at ccagct cggctt gt accgacgcct caagt ttttt ct cggcat ct cgg   1203

Query:   242   aact gaagctc gat ct ccct gcgt tttt cttt aaact gaagaggaacat agcgt ct gggg   301
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1204   aact gaagctc gat ct ccct gcgt tttt cttt aaact gaagaggaacat agcgt ct gggg   1263

Query:   302   t caacgccagat cagcat aacttt caaact ctt gccagccat ttt cagt ggacgaat cc   361
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1264   t caacgccagat cagcat aacttt caaact ctt gccagccat ttt cagt ggacgaat cc   1323

Query:   362   aagccgt gct ct at aggt ct ggcaat ggggccaat gccgt acct ccccgaggccgt aa   421
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1324   aagccgt gct ct at aggt ct ggcaat ggggccaat gccgt acct ccccgaggccgt aa   1383

Query:   422   t aaacgt ct ccgctt gccgt gacagt t gt agagt t gaagt ggat aaggt caacaagcggc c   482
          |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| ||| |||||
Sbjct: 1384   t aaacgt ct ccgctt gccgt aacagt t gt agagt t gaagt ggat aaggt cagcaat gggt c   1444

```

Fig 4. Comparisons of the nucleotide sequence of *P. aeruginosa* toxin A gene (Sbjct) and RAPD-PCR fragment (Query).

IV. 고찰

1890년도에 처음으로 알려진 *P. aeruginosa*는 그 동안 식물학자들의 관심의 대상이었다. 자연의 도처에 산재해 있으면서 여러 가지 문제를 일으키기 때문에 박테리아 세계의 바퀴벌레라고 불리기도 하는 *P. aeruginosa*는 인간에게 있어서는 고도의 환경 적응력과 영양적 다양성을 무기로 특히 병원내에서 쉽게 당면하는 면역 기능 저하 상태에 놓여 있는 수술 병동, 중환자실, 신생아 중환자실 등에서 집단으로 발병한다거나 여러 가지 약제에 내성을 나타내는 등의 문제를 일으키고 있다.

본 연구에서는 Kerr 등이 ICU에서 유행한 *P. aeruginosa*의 역학조사에 26- oligonucleotide를 사용해서 RAPD-PCR을 함으로써 동일 균주에 의한 감염임을 밝혀 냈듯이 (14) 최근 역학적 도구로서 높은 분별력과 재현성, 신속성, 적용성으로 인하여 관심을 모으고 있는 RAPD-PCR을 이용하여 균의 다양성을 지니는 특정 band의 염기 서열을 조사하여 각 검체들 사이의 유사성을 검토하고, 신속 진단법 개발과 함께 역학조사의 기초 자료로 제공하고자 본 실험을 하였다. 그 결과 RAPD-PCR에 *P. aeruginosa*의 유전적 다양성 조사에 뛰어난 유의성과 재현성을 확인케 하는 primer (OPA-17)를 탐색하였다.

이 OPA-17 primer를 RAPD-PCR에 사용했을 때 검체의 채취 부위나 병동, 환자의 여러 가지 조건이 다름에도 *P. aeruginosa* 17 균주 (표준 균주; *P. aeruginosa* ATCC 10145 포함)의 RAPD profile은 모두 482 bp에서 공통의 동일 band를 나타내었다. 대조 균주로 추가된 *E. coli*, 임상적으로 유사 증상을 보이는 *K. pneumonia*에서는 동일 band가 나타나지 않아서 482 bp에 해당하는 PCR 증폭 band는 *P. aeruginosa* 만의 특이적인 band로 사료되었다. 이 band의 염기 서열을 분석한 결과 482 bp의 exotoxin A gene의 일부

로 밝혀졌다. 임상에서 분리된 16 균주 모두 exotoxin A을 가지며 16명의 환자 모두 *P. aeruginosa* 균 감염과 면역 저하로 인한 질병을 앓고 있었다. 따라서 OPA-17을 primer로 사용하여 RAPD-PCR을 실행할 경우 앞으로 *P. aeruginosa*의 신속 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

Jaccard's coefficient의 유사도에 의해 작성된 RAPD phenogram에서 시험된 17 균주를 크게 Class I, II, III로 나누어졌다. Class I는 P3와 P4가 비교적 유사하나 각 검체들 사이의 유사성을 찾기가 어려운 그룹으로 16 검체들 중 독립적인 검체들의 그룹이다. Class II에서는 P13와 P8에서 P13은 7병동 신경과 환자이고, P8은 8병동 일반 외과 환자의 검체로 유사성이 1.000로 균주가 정확히 일치함을 보여 동일 균주에 의한 원내 감염으로 추정된다. Class III에서 P11와 P7에서는 유사성이 1.000으로 일치하여 역시 동일 균주의 감염으로 추정된다. P11은 신경외과의 신경외과 중환자실 환자의 검체이고 P7은 신경과의 중환자실 환자의 검체이다. 또 Class III에서 P12와 P9는 유사성이 1.000로 모두 8병동에 있는 서로 다른 일반외과 환자로부터의 검체이고 P12, 9 모두 disk diffusion에서 9가지 항생제가 포말된 disk중에서 한가지 항생제 (trim/sulfa)에만 내성을 나타내고 있어 역시 동일 균주에 의한 원내 감염으로 추정된다. 또한 Class III는 주로 일반외과 환자들로부터의 검체들로 수술 후 원내 감염이 방치되고 있음을 알 수 있다.

V . 요약

그람음성의 *P. aeruginosa*는 면역 저하자들, 화상 환자, 외상 환자, 섬유성 포낭종 같은 환자들에게는 사망까지 이르게 하는, 생명을 위협하는 병원성 세균이다. 본 실험에서는 균주간의 유사성과 유전적 다양성을 조사하기 위해 RAPD-PCR을 이용해서 *P. aeruginosa*를 분석하였다.

*P. aeruginosa*는 부산 시내 소재 P 대학 병원에서 2000년 7월부터 9월까지 16명의 환자로부터 채취하여 생화학적인 검사에 의해 확인 된 *P. aeruginosa* 검체를 주형으로 OPA-17 primer를 사용하여 RAPD-PCR를 시행하였다.

그 결과 RAPD profile에 의해 크게 3가지로 (class I, class II, class III)분류할 수 있었다. 시료 채취 장소 및 해당 진료과와는 서로 상관 관계가 없고 균주 간 유사성 또한 없는 class I, 시료 채취 장소 및 해당 진료과와는 상관 관계가 없음에도 2 균주에서 유사성이 일치해 동일 균주에 의한 원내 감염을 의심케 하는 class II, 시료 채취 장소와는 상관 관계가 없으나 주로 일반 외과 환자들의 검체들로 구성이 된 class III는 4 균주, 2 분류에서 유사성이 일치해 동일 균주에 의한 원내 감염을 의심케 하였다. *P. aeruginosa* 감염 시 원내 감염의 확산 경로 (의료인을 통한 감염, 환자들 상호간의 감염, 의료 기구를 통한 감염 등)를 통해 확산 방치되고 있음을 알 수 있다. 또한 *P. aeruginosa*가 가지는 특이적인 482 bp의 염기 서열을 분석한 결과 exotoxin A gene의 5' end로 밝혀졌다. 이것은 앞으로 *P. aeruginosa*의 신속 진단에 도움이 될 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Blane, D. S, H.H. Siegrist, R. Sahli, and P. Francioli 1993. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol* **31**:71-77
2. Botsenhardt, K., and G. Doring. 1993. Etiology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. New York. Plenum Press. 1- 18
3. Whitby, J. L., and A. Rampling. 1972. *Pseudomonas aeruginosa* contamination in domestic and hospital environments. *Lancet* 15- 17.
4. Wiblin RT. 1997. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed., Baltimore: Williams and Wilkins 807-819.
5. Pollack M. 1995. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed., New York:Churchill Livingstone. 1980-2003.
6. Gordon SM, Serkey JM, Keys TF, Ryan T, Fatica CA, Schmitt SK. 1998. Secular trends in nosocomial bloodstream infection sin a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. *Ann Thorac Surg* **65**:95- 100.
7. Kluytmans J. 1997. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed., Baltimore: Williams and Wilkins. 841-865.

8. Bergen GA, Shelhamer JH. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. *Infect Dis Clin North Am* **10**:297-326.

9. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R, Patrick CC. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis* **18**:390-4.

10. Mendelson MH, Gurtman A, Szabo S, Neibart E, Meyers BR, Policar M. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin Infect Disease* **18**:886-95.

11. 이창호, 이유철, 조동택, 설성용. 1991. *대한미생물 학회지* **26**(2) 135-145

12. C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L.Goltry, E. Tolentio, S. Westbrook-wadman, R. Lim, Y. Yuan, L.L. Brody, S. Ncouler, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, K. Smith, D. Spencer, G.K-S.wongZ. Wu, I.T. paulsen, J. Reizer, M.H. Saier. 2000. Completegenome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen *Nature* **406**:959-964

13. 양기화, 김선무. 1990. *카톨릭대학교 의학 논문집* **43**(2):729-740

14. J.R. Kerr, J.E. Moore, M.D. Curram, R. Granham, C.H. Webb, K.G. Lowry, P.G. Murphy, T.S. WILSON, W.P. Ferguson. 1995. Investigation of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit by random amplification of polymorphic DNA assay. *Journal of Hospital Infection* **30**:125-131
15. I. Pujana, L. Gallego, M.J. Canduela, R. Cisterna. 2000. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **36**:65-68.
16. Y.B., KIM Identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *J.Busan Medical Assoc* **22**(2):217-223.
17. NCCLS. 1984. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova Pa. 1174
18. Pollack, M., Tqylor, N.S., and Callaham, L.T. 1977. Exotoxin A production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun* **15**:776-870
19. Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH. 1985. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Clin Microbiol* **4**:175-9.

20. Woods DE, Iglewski BH. 1983. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 5 Suppl 4:S715-22.
21. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J. 1993. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon* 31:27-34.
22. Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218:704-740

VII. 감사의 글

이렇게 소중한 열매를 맺기까지 격려와 지도 편달을 아끼지 않으시고 어려운 여건속에서도 최선의 길로 인도해 주신 김영태 교수님께 진정으로 깊은 감사를 드립니다. 또한 좋은 논문이 될 수 있도록 세심한 지도와 조언을 해 주신 최태진 교수님과 이명숙 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

바쁘신 중에도 시간을 내어 실험의 시작부터 끝까지 미흡한 지식과 기술을 보완해 주신 이재형 선생님께도 특별한 감사를 드리며 저의 어려운 부탁을 거절하지 않고 수고해 주신 유전자 은행의 이문수 선생님과 논문이 완성되기까지 힘이 되어준 직장 동료와 선·후배님들에게도 고마움을 표합니다.

끝으로 언제 어디서나 저를 위해 기도하시는 어머니와 하늘 나라에 계신 아버지께 이 논문을 바칩니다.

2002. 1.