

## 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 *Fusobacterium nucleatum* 및 *Fusobacterium necrophorum*의 동정에 관한 연구

강창우 · 박동성\* · 윤수한

서울대학교 치과대학 치과보존학교실, 삼성의료원 치과진료부 보존과\*

### ABSTRACT

#### IDENTIFICATION OF *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* AND *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* USING POLYMERASE CHAIN REACTION(PCR)

Chang-Woo Kang, D.D.S., Dong-Sung Park, D.D.S., M.S.D., Ph.D\*., Soo-Han Yoon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University*

*\*Institute of Oral Health Science SamSung Medical Center*

This study was designed to examine the specificities of the designed primers for *F. nucleatum* and *F. necrophorum* and to compare the PCR results using clinical samples with those of the anaerobic culture method. *F. nucleatum* and *F. necrophorum* spp. are frequently isolated in infected root canals, and they are related to periapical diseases. *F. nucleatum*(VPI 10197) and *F. necrophorum*(ATCC 25286) were used as references for PCR reaction, and thirty five teeth with one canal and periapical lesion were used. The samples were cultured anaerobically and identified using Rapid ID 32A(BioMerieux Vitek, Inc., France) as biochemical battery. In the GenBank database, species-specific PCR primers(nuc1/nuc2 primers for *F. nucleatum* and nec1/nec2 primers for *F. necrophorum*) were designed from the 16S ribosomal DNA(rDNA) sequences of *F. nucleatum*(accession number M58683) and *F. necrophorum*(accession number AF044948). PCR procedures of *F. nucleatum*(VPI 10197) and *F. necrophorum* (ATCC 25286) were simulated on a computer software, Amplify(v.1.2 $\beta$  for Macintosh). 820 bps and 817 bps of nucleotides were expected, respectively. Using extracted DNAs with QiaAmp tissue kit(Qiagen co., Germany), PCR was done.

The results were as follows :

1. The nuc1/nuc2 primers produced an amplicon of 820 bps and the nec1/nec2 primers produced an amplicon of 817 bps.
2. The nuc1/nuc2 primers and the nec1/nec2 primers were specific and did not react with species other than the designated ones(i.e. nuc1/nuc2 primers did not produce amplicons for *F. necrophorum*, and vice versa.). And the PCR products of *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277), *Prevotella intermedia*(ATCC 25611), and *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563), frequently isolated in infected root canals and periapical lesions, were not amplified by the primers specific for *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*.
3. This method utilizing PCR could detect *F. nucleatum* and *F. necrophorum* in clinical samples, while anaerobic culture method could detect neither.

**Key Words :** polymerase chain reaction(PCR), 16S rDNA, species-specificity, anaerobic culture

## I. 서 론

구강 내에서 상주하는 모든 세균은, 이론적으로, 치수괴사가 진행 중이거나 괴사된 치수의 근관 내로 들어가서 근관감염에 관여하고 치근단 조직에 침투하게 된다. 여기에는 비교적 적은 수의 균종이 관여하며, 감염근관에서 발견되는 대부분의 세균은 치주낭에서도 또한 발견된다<sup>4)</sup>. 비록 근관 내 flora가 치주낭에서처럼 복잡 다양하지는 않지만, 특이성 있고 제한된 양상의 구강 내 상주균의 분포를 보인다는 면에서 유사하다<sup>7,8)</sup>.

Sundqvist<sup>9)</sup>는 근단성 치주염에 이환된 근관에서 가장 많이 발견되는 균종들로 *F. nucleatum*(감염근관의 48%에서 검출), *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium lentum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Wolinella recta* 등을 보고하였다. 또한 odds ratio system<sup>6,9)</sup>을 사용하여 검출된 세균간의 positive 또는 negative association을 살펴보았을 때, 가장 많이 검출된 *F. nucleatum*과 *P. micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena*, *W. recta* 사이에서 강한 양(陽)의 상관관계(strong positive association)가 발견되었다고 하였다<sup>4,9)</sup>.

Family Fusobacteria는 genus *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Propionigenium*, *Sebaldella*, *Streptobacillus* 등으로 구성되며<sup>10-12,17)</sup>, genus *Fusobacterium*은 구강 내에서 발견되는 포자 비형성(non-sporing) 그람음성 간균으로 알려져 있다. 편성 혐기성 세균인 Fusobacteria는 주로 n-butyric acid를 생산하며, iso-butyric acid와 iso-valeric acid는 생산하지 않는 점에서 leptotrichia와 구별되는데, leptotrichia는 lactic acid만을 생산한다. 이 산(acids)들은 gas liquid chromatography(GLC)에 의해 검출(detect)될 수 있다. Fusobacteria의 DNA G+C content는 *F. prausnitzii*(52-57%)를 제외하고는 26-34 mol% 범위 안에 있으며, *Leptotrichia*는 25 mol%의 G+C content를 보인다.

Genus *Fusobacterium*에는 *Fusobacterium alocis*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. perfoetens*, *F. periodonticum*, *F. russii*, *F. simiae*, *F. ulcerans*, *F. varium* 등의 균종(species)이 있으며, 감염근관에서는 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*이 주로 발견되는 것으로 알려져 있다.

Dzink 등<sup>13)</sup>은 DNA homology technique과 whole-cell lipoprotein의 electrophoretic pattern을 이용하여, *F. nucleatum*을 *F. nucleatum subsp. polymorphum*, *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *F. nucleatum subsp. vincentii*의 3 group으로 분류하였다. Lawson 등<sup>14)</sup>은 *F. nucleatum subsp. polymorphum*, *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *F. nucleatum subsp. fusiforme*, *F. nucleatum*

*subsp. animalis*의 4 cluster를 보고하였는데, 현재까지 *F. nucleatum*은 *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *F. nucleatum subsp. polymorphum*, *F. nucleatum subsp. fusiforme*, *F. nucleatum subsp. animalis*, *F. nucleatum subsp. vincentii*의 5 group으로 분류된다<sup>12)</sup>. Gharbia 등<sup>5)</sup>은 *F. nucleatum subsp. nucleatum*은 치주질환과 연관되어 있으며, *F. nucleatum subsp. polymorphum*과 *F. nucleatum subsp. fusiforme*은 건강한 치은연하 부위에서 발견된다고 하였다. 이러한 명확한 연관성(correlation)에도 불구하고 각각의 아종(subspecies)의 추정되는 세포독성 결정인자(putative virulence determinants)는 차이가 없는 것으로 보인다<sup>12,15)</sup>. *F. necrophorum*은 human infection에 있어 "necrobacillosis"로 알려진 심각한 괴사성 편도염(necrotic tonsillitis)과 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

신속하고도 민감도(sensitivity)가 높은 미생물 동정(identification)방법은 미생물학 연구나 실제 감염성 질환의 진단 양자에 모두 필수적이다<sup>18-21)</sup>. 혐기성 세균을 배양하는 것은 시간 소모와 노력이 많이 들며 배양 방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다. 특히, 혐기성 세균은 짧은 시간동안만이라도 공기 중의 산소에 노출되면 곧 죽게 된다. 환자의 진단을 위해서는 시료를 치료실에서 채취한 후 실험실까지 수송해야 하며 그동안 세균이 수 초 이상 산소에 노출되지 않도록 주의해야 한다. 또한, 비록 이러한 혐기성 세균을 무산소 상태로 수송하는데 필요한 배지가 고안되어 있지만, 수송 도중의 온도변화나 그 외 여러 요인에 의해 세균이 죽을 수 있다. 이 세균들 중 많은 것들은 아주 까다로운 영양 요구 조건을 갖고 있어서 복잡한 조성의 배지가 필요하다. 또한 각각의 세균을 동정하기 위하여 이용하는 선택 배지 및 생화학적 검사에는 비용과 시간이 많이 든다<sup>40-42)</sup>.

최근 분자생물학적인 방법의 발달과 함께 소개된 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 극소량의 DNA를 이론적으로 약 10<sup>6</sup> 배 정도까지 증폭시킴으로써 여러 연구에 유용하게 활용되고 있다<sup>22,23)</sup>. 16S ribosomal DNA(rDNA)는 모든 세균에 존재하고 모든 균종에서 동일한 conservative region과, 종 특이성을 보이는 variable region이 있어서, 균의 분류(taxonomy) 및 동정에 유용하게 이용되고 있다. 또한 중합효소연쇄반응을 이용하여 세균의 16S rDNA를 증폭시키는 방법은 여러 종의 세균을 대상으로 시행되어 왔다<sup>24-39)</sup>. 이에 본 연구에서는 근관 내에서 비교적 많이 발견되는 균종이면서도 그에 대한 연구가 그다지 많지 않은 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*에 대한 종 특이성 primers를 제작하여 그 특이성을 확인하고, 감염근관 및 치근단 병소로부터 채취한 sample에 중합효소연쇄반응을 시행하여, 혐기성 세균 동정의 한 방법으로서의 유용성에 대해 알아보고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

공인된 균주 *F. nucleatum*(VPI 10197), 표준균주 *F. necrophorum*(ATCC 25286)을 PCR 반응의 reference로 사용하였으며, 1997. 11. 14 - 1998. 9. 3 사이에 서울대학교병원 치과진료부에 내원한 환자 32명 중 단근관을 가지며 치근단 병소가 있는 치아 35개를 실험재료로 사용하였다. 항생제를 복용 중인 환자는 실험대상에서 제외하였으며, 동통, 치근단 투과상의 크기, 누공의 유무, 근관 내 화농성 삼출액의 유무 등의 임상증상을 기록하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) PCR primers의 디자인 및 합성

GenBank database에서, *F. nucleatum*(accession number M58683), *F. necrophorum* (accession number AF044948)의 16S ribosomal DNA(rDNA) sequence를 비교하여 각각의 균주에 특이성이 있는 부위(specific region)로부터 PCR primers를 디자인 한 결과 각각 820bps, 817bps의 amplicon이 예상되었으며, computer software(Amplify v. 1.2<sup>β</sup> for Macintosh) 상에서 simulation하여 그 민감도와 특이성을 예측하였다(Table 1, Fig. 1 A, B). PCR primers는 TaKaRa사(TaKaRa Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japan)에 의뢰하여 제작하였다.

#### 2) 세균의 채취

Rubber dam으로 치아를 격리한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 2분간 대상치아와 그 주위를 세척하였다. 소독된 고속 회전 bur로 상아질 하방 1~2mm까지 와동형성 후, 치아와 그 주위를 다시 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10~15초간 세척한 뒤 2% iodine tincture로 소독 후 마지막으로 sodium thiosulfate로 중화시켰다. 그 후 소독된 저속회전 bur로 근관와동을 형성한 후 멸균된 paper point 또는 K-file을 근관내의 치근단 부위라고 추정되는 부위까지 넣어 약 15초간 방치하였다가 reduced transport fluid(RTF) 1ml를 함유한 vial에 넣어 즉시 실험실의 혐기성 배양기로 옮겼다.

#### 3) 혐기성 배양 및 생화학적 검사

치료실에서 옮겨진 RTF를 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>가 든 37℃ 혐기성 배양기(Coy anaerobic chamber M.I., U.S.A.)내로 옮겨 2분간 vortex mixer로 진탕한 후 단계적으로 10배씩 즉, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> 배로 희석하여 혈액 한천 배지에 100μ씩, CVE(Crystal violet-erythromycin) 혈액 한천 배지에 25μ씩 점적하였다. 10<sup>1</sup> 배 희석 혈액 한천 배지는 CO<sub>2</sub> incubator에, 나머지는 모두 혐기성 배양을 하였다. 생화학적 검사로 Rapid ID 32A (BioMerieux Vitek, Inc., France)를 이용하여 동정하였다.

#### 4) DNA의 추출

공인된 균주 *F. nucleatum*(VPI 10197), 표준균주 *F. necrophorum*(ATCC 25286)은 BHI(Brain Heart Infusion) broth(DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.)에 접종하여 혐기성 배양기에서 2 - 3일 동안 배양한 후, 배양액 10ml를 원심분리기에서 2분간 원심분리(6000×g)하여 세균 pellet을 얻었다. 각 sample은, 혐기성 배양기 내에서 각각의 original sample로부터 50μ씩 채취한 후 PBS(phosphate buffered saline; pH 7.0) 200ml를 첨가하고 소형원심분리기에서 5분간 원심분리(6000×g)하였다. PBS제거 후 이 과정을 2회 반복하고, 최종적으로 PBS를 제거한 후 QIAamp Tissue kit(Qiagen Co., Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

#### 5) DNA 농도 측정

추출한 DNA는 UV-Spectrophotometer(BECKMAN, U.S.A.)를 이용하여 260nm 및 280nm에서 그 순수도 및 농도를 측정하였다.

#### 6) 중합효소연쇄반응(PCR)

PCR은 GeneAmp PCR System 2400(Perkin Elmer-Cetus Co., U.S.A.)을 이용하여 시행하였다. 20μ용 AccuPower™ PCR PreMix-Top(BIONEER Co., Korea) 0.2ml tube에 sense primer, antisense primer 각각 10 pM, template DNA 10ng을 넣고, 이곳에 최종용량이 20μ가 되게 멸균된 증류수를 넣어 반응시켰으며, 모든 반응은 얼음 위에서 시행했다. PCR condition은 처음 1주기는 94℃에 5분간 두었으며, 나머지 30주기는 94℃에서 1분, 55℃에서

Table 1. PCR primers designed and used in this study(5' → 3')

Bacterial strains	PCR primers	Nucleotides sequences
<i>F. nucleatum</i> (VPI 10197)	nuc1(sense primer)	GATTATAGGGCATCCTAGAATTAT
	nuc2(antisense primer)	AGGGACACTGAAACATCTCTGTCTCAT
<i>F. necrophorum</i> (ATCC 25286)	nec1(sense primer)	GGTTTTTTTCGCATGGAGGAATCAT
	nec2(antisense primer)	GGCGCATCTCTGCTCCGTTTCGTAG

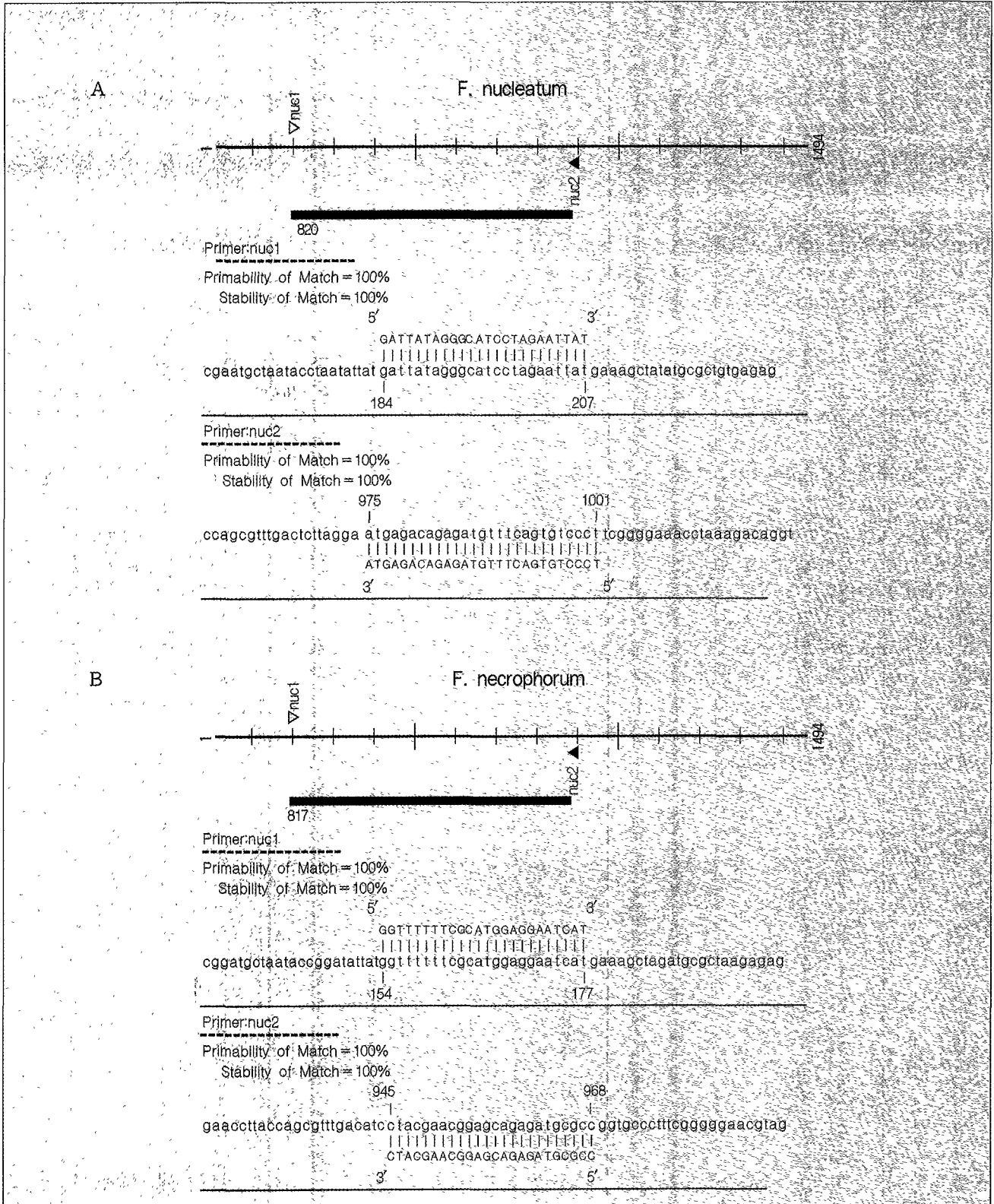


Fig. 1. A, B. Simulated PCR results of *F. nucleatum*(VPI 10197) and *F. necrophorum*(ATCC 25286) on the Amplify (v.1.2 $\beta$  for Macintosh). The 820 bps and 817 bps of nucleotides were expected, respectively. This program also shows the primability and stability of the suggested primers.

1분, 72°C에서 1분 30초 동안 시행하였고, PCR 산물은 4°C에서 보관(hold)하였다. PCR 산물은 horizontal gel apparatus(Hoefler HE 33, Pharmacia Biotech, California, U.S.A.)를 이용하여, 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide(EtBr)를 넣은 1.0% agarose gel에 전기영동하였으며, size marker로는 100 bp DNA Ladder(Life Technologies Co., U.S.A.)를 사용하였다. 전기영동은 TAE 완충액에서 80V로 45분 동안 시행하였으며, UV transilluminator로 SL-20 Image Visualizer™(Seoulin Scientific Co., U.S.A.)를 사용하여 관찰 후 polaroid 667 film을 Polaroid GelCam(Peca Products, U.S.A.)에 장착하여 촬영하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 종 특이성 primers의 검증

공인된 균주 *F. nucleatum*(VPI 10197), 표준균주 *F. necrophorum*(ATCC 25286)과 치근단 병소에서 자주 발견되는 다른 균종들인 *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563)를 대상으로 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 primers nucl/nuc2는 *F. nucleatum*에서만, primers nec1/nec2는 *F. necrophorum*에서만 각각 820 bps, 817 bps 위치에서 증폭이 일어나, 제작된 각각의 primers가 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*에 특이하게 반응하는 primers임이 확인되었다(Fig. 2).

#### 2. mixed sample에서 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*의 동정

Mixed sample에서 추출한 DNA에 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 *F. nucleatum*은 5개의 sample에서, *F. necrophorum*은 2 개의 sample에서 각각 검출되었다(Fig. 3 A, B, C).

### IV. 총괄 및 고안

근단성 치주염은 주로 *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* spp., *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium lentum*등이 관련된 microbial infection으로 알려져 있다<sup>43)</sup>. 배 등<sup>44)</sup>은 9 균종의 혐기성 세균 변연누출 연구(anaerobic bacterial leakage model)에서, *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*만이 bpBHI 또는 bpPYG broth에서 최소 14일 동안 생존(viable)하며, leakage후 1일 만에 검출되었다고 하였다. *F. nucleatum*의 clinical infection으로부터의 빈번한 검출은 genus *Fusobacterium*의 병원성 역할(pathogenic role)을 암시하지만, 세포독성 결정인자(virulence determinants)는 많이 알려져 있지 않은 상태이다<sup>12)</sup>. Baumgartner와 Falkler<sup>45)</sup>는 실험적으로 유도 감염시킨 생쥐 모델에서 *F. nucleatum*, *P. anaerobius*가 농양 형성(abscess formation)과 관련이 있다고 하였는데, 혐기성 세균 20 strain 중 *F. nucleatum*, *P. anaerobius*가 다른 균주(strain)에 비해 더 농양 형성력이 크다(abscessogenic)고

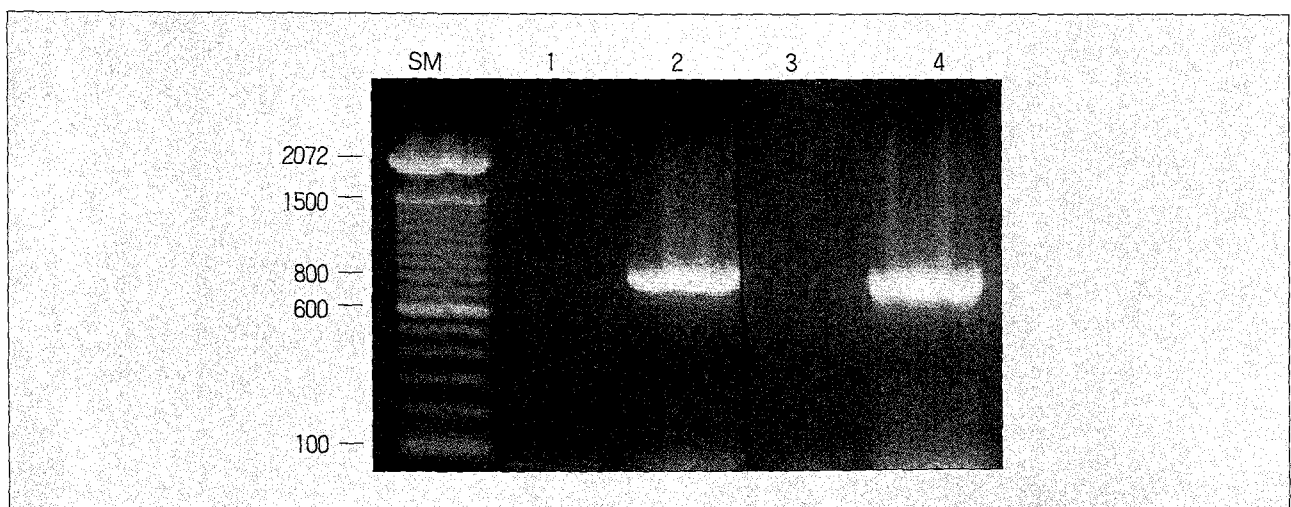


Fig. 2. PCR products using primer nucl/nuc2 and nec1/nec2. 820 bps amplicon of *F. nucleatum*(VPI 10197) and 817 bps amplicon of *F. necrophorum*(ATCC 25286) are shown. SM: size marker, Lane 1: *F. nucleatum*(VPI 10197) using primer nec1/nec2, Lane 2: *F. nucleatum*(VPI 10197) using primer nucl/nuc2, Lane 3: *F. necrophorum*(ATCC 25286) using primer nucl/nuc2, Lane 4: *F. necrophorum*(ATCC 25286) using primer nec1/nec2.

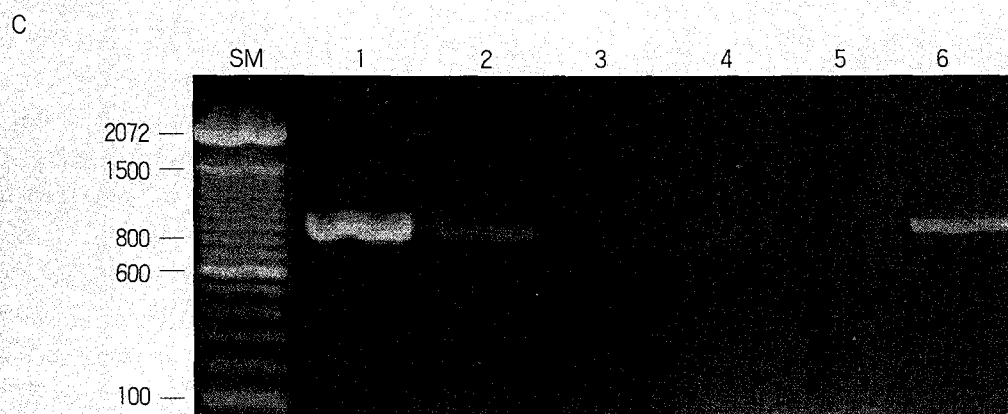
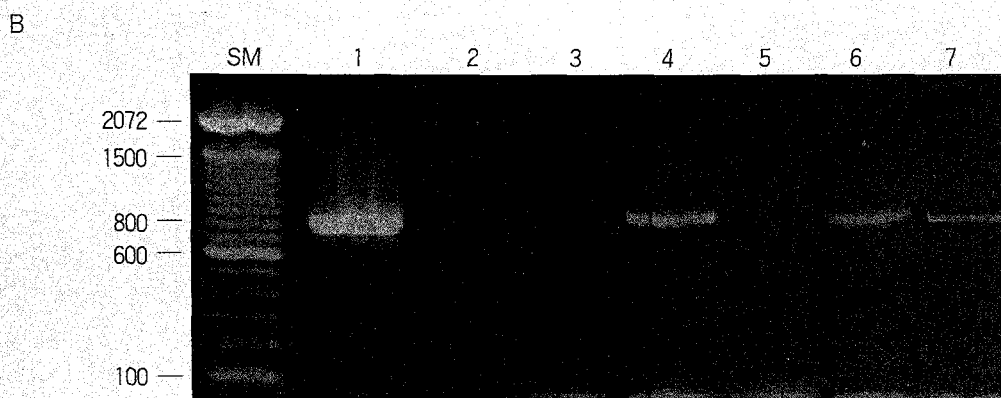
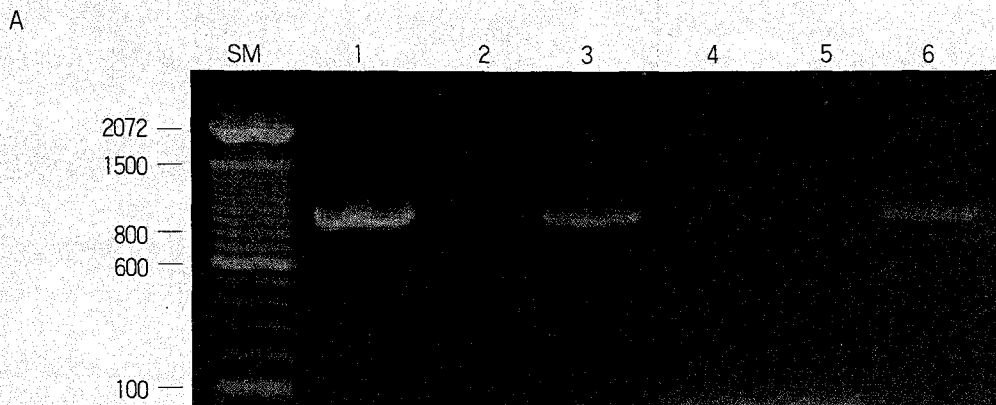


Fig 3. Running agarose gel with PCR products of original samples. SM: size marker, Lane 1; *F. nucleatum*(VPI 10197), Lane 3; sample no. 9, Lane 6; sample no. 12, A. Lane 1; *F. nucleatum*(VPI 10197), Lane 4; sample no. 16, Lane 6; sample no. 18, Lane 7; sample no. 19, B. Lane 1; *F. necrophorum*(ATCC 25286), Lane 2; sample no. 10, Lane 6; sample no. 16, C.

보고했다.

*Fusobacteria*는 실험실(clinical laboratory)에서 확인(recognize)하기 어렵다<sup>10)</sup>. 비록 *fusobacteria*의 명명과 분류는 명백해졌지만, 실험실에서 구분하기 위한 안정적이고 특이성 있는 검사는 드물다<sup>46)</sup>. *F. nucleatum*만이 그람염색에서 방추형(spindle-shape)으로 일정하게 나타나며, 많은 검출체(isolates)들은 *bacteroides strains*과 쉽게 구별되지 않는다. fatty acid 대사산물의 GLC analysis에서 *Fusobacterium* spp.는 n-butyric acid를 주로 생산하며, iso-butyric acid나 iso-valeric acid는 생산하지 않는다. 하지만 이것은 속(genus)내의 종(species)의 동정에는 도움이 되지 않는다. Lactate로부터 만들어지는 propionate의 검출은 *F. necrophorum* 진단의 근거가 된다<sup>10)</sup>. *Fusobacteria*는 종종 다른 편성혐기성 세균 또는, 통성혐기성 세균과 mixed culture 상에 존재하므로, 선택 배지(selective medium)의 사용이 동정시 필요한데, 각각 100, 5, 3mg/L의 erythromycin, vancomycin, josamycin을 함유한 배지가 사용되어 왔으며<sup>47)</sup>, 최근에는 각각 3, 4, 1mg/L의 josamycin, vancomycin, norfloxacin이 다른 세균의 성장을 방해하는 것으로 보고되었다<sup>48)</sup>. 이러한 배지에 egg yolk를 첨가하게 되면 lipase의 생산으로 *F. necrophorum*이 쉽게 확인되게 된다. *F. nucleatum*은 반점 있는 진주 빛의 군락(speckled, iridescent colony), 빵부스러기 형태(breadcrum-type colony), 매끄러운 형태의 군락(smooth colony) 등의 3가지 군락 형태(colony type)가 있다. Speckled colony는 쉽게 인지되지만, 그람염색에서 fusiform으로 나타나는 *Capnocytophaga* spp.로 오인될 수 있다. *F. nucleatum*은 항상(consistently) 방추형 간균(fusiform-shaped bacilli)으로 나타나는 유일한 *fusobacterium*이다; 이것은 *L. buccalis*의 방추형과 혼동되어서는 안되는데, *L. buccalis*는 그람 양성 입자를 지닐 수 있다. 혐기성 그람 음성 간균의 동정은 *fusobacterium* 또는 *leptotrichia*와 다른 포자 비형성 그람 음성 혐기성 간균과의 구분(differentiation)에서 시작된다. Short chain-fatty acid 대사산물의 GLC analysis가 "gold standard"로 알려져 있지만, 항상 유용한 것은 아니다. Phosphomycin sensitivity는 매우 간단하고 효과적인 검사방법으로, 혐기성 그람 음성 간균 중 *Fusobacterium*과 *Leptotrichia*의 모든 균주(strain)가 100 mg/L의 농도에 sensitive한데 비해 다른 속(genera)의 대부분의 균종(species)은 500 mg/L까지 저항성을 지닌다. 그 예외로는 *B. ureolyticus*가 있는데, *B. ureolyticus*는 urease positive하므로 이 검사는 *fusobacterium*이나 *Leptotrichia*의 추정동정(presumptive identification)을 가능하게 한다<sup>10,46)</sup>. *F. necrophorum*은 대개 egg-yolk agar상에서 lipase를 생산하고, glucose로부터 많은 양의 gas를 생산한다. *F. nucleatum*은 두 검사에서 음성반응을 보인다<sup>10)</sup>. Lawson<sup>11)</sup> 등은 *Fusobacterium* 11 균종을 구분하는 방법으로 small-subunit

rRNA sequence의 비교분석(comparative analysis)법을 제시하였는데, 비록 모든 균종이 비교적 높은 수준의 sequence similarity를 보이지만 상당한 유전자간 이질성(intergeneric heterogeneity)을 보이며, 균종 간의 분리가 가능한 특징적인 차이를 관찰할 수 있다고 하였다.

1984년 Kary Mullis에 의해 처음 소개된 PCR법은 전통적인 배양법의 문제점을 극복할 수 있는 획기적인 방법으로, 실제 본 연구에서도 혐기성 배양으로 동정하지 못한 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*을 중합효소연쇄반응법을 이용하여 동정할 수 있었다. 실험에 사용된 primers로 PCR을 시행한 결과 각각 5개와 3개의 sample에서 *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*이 검출되었으나 혐기성 배양에서는 전혀 검출되지 않았다. 이는 *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*의 감염근관과 치근단 병소에서의 발견 빈도나 생존력에 대한 기존의 연구<sup>4,9,12,43,44)</sup>와, 군락의 형태(colonial morphology)는 숙련되지 않은 관찰자에게는 별 도움이 되지 못한다<sup>10)</sup>는 점들을 고려해볼 때, 계대배양(subculture)시 누락되었을 가능성이 가장 큰 것으로 여겨진다. 그 외에도 실험에 사용된 생화학적 동정방법의 민감도(sensitivity) 역시 그 원인의 하나가 될 수 있을 것이다. *F. nucleatum*이 검출된 5 sample 중 4 sample이 화농성 삼출액이 있었으며, 3 sample에서 동통이나 타진반응 등의 임상증상이 있었다. *F. necrophorum*이 검출된 2 sample중 한 sample에서는 누공이 있었으며, 다른 한 sample은 화농성 삼출액과 타진반응 등의 임상증상이 있었다.

QIAamp tissue kit를 사용한 DNA 추출과정은 신속하고 편리하게 진행되었는데, 이 정제과정에서는 phenol 또는 chloroform 추출이나 알코올 침강이 필요 없으며, AE Buffer나 증류수에서 용출(elution)된 DNA는 PCR이나 다른 효소 반응 등에 즉시 사용할 수 있고 -20°C에서 안전하게 보관될 수 있다. 제조사에 의하면 QIAamp tissue kit를 사용해 정제한 DNA는 protein, nuclease, 또는 다른 오염물이나 억제물이 없고, 용출된 DNA는 대략 30kb 정도의 길이로 얻어지는데, 이 정도 길이의 DNA는 변성이 용이하고 PCR 반응의 증폭효율에 적당하다고 한다. 각각의 QIAamp spin column은 핵산 100 µg까지 bind할 수 있으나 실제 산출량은 sample 크기에 따라 달라지며, 200 µl (25mg)정도가 적절한 sample 크기이나 1 µl에서 1 ml까지도 정제될 수 있다고 한다. 정제과정은 QIAamp spin columns을 사용하여 수행되는데, QIAamp spin columns은 대부분의 standard microfuse tube에 맞도록 되어 있으며 최종적으로 용출된 DNA는 standard 1.5 ml microfuse tube에 모으게 된다.

AccuPower™ PCR PreMix-Top(BIONEER Co., Korea)은 dNTP, PCR reaction buffer, DNA polymerase 등의 PCR 수행에 필요한 성분이 미리 혼합되어 있어, 증폭시키고자 하는 template DNA 및 primer set와 증류수

만 가해 바로 PCR과정을 신속하고 용이하게 할 수 있으며, 실험과정에서의 오류를 감소시킬 수 있었다. 또한, agarose gel 전기영동시 필요한 tracking dye 및 침강제가 포함되어 있어 별도로 sample loading buffer를 가할 필요가 없으며, aerosol 발생에 의한 carry-over contamination을 극소화시킬 수 있다고 하며, polymerase의 안정성을 증가시켜 주는 안정화 물질이 첨가되어 용액상태에 비해 10배 이상, 안정화 물질을 포함하지 않는 동결건조에 비해 3배 이상 안정성이 증가되고, 상온(25℃)에서도 활성이 1개월 이상 유지되며, 냉동보관을 할 경우 2년 이상 활성이 지속적으로 유지되는 장점이 있다고 한다.

*Fusobacterium nucleatum*(VPI 10197)과 *Fusobacterium necrophorum*(ATCC 25286)의 16S rDNA sequence로부터 제작한 각각의 primers를 이용하여 PCR을 시행한 본 연구 결과는, PCR법이 혐기성 세균 동정시 유용한 방법이라는 기존의 연구들<sup>22,23)</sup>과 일치하였다. 또한 혐기성 배양방법으로 동정하지 못한 *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*이 검출되어, 그 민감도 역시 혐기성 배양법에 비해 나음을 확인할 수 있었다. 그러나 PCR법이 치료실에서 진단을 위해 직접 이용되기에는 아직 여러 제약이 따른다. 따라서 PCR을 이용한 세균의 동정과 임상에서의 연계성 및 PCR과정의 편의성에 대한 보다 많은 연구와 검증이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 감염관과 치근단 병소에서 자주 발견되는 *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*에 대해 종 특이성을 지닌 primers를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*의 16S rDNA sequence를 이용하여 제작한 primers 중 *F. nucleatum*의 종 특이성 primers인 nuc1/nuc2 primers는 *F. nucleatum*(VPI 10197)과 반응하였고, *F. necrophorum*의 종 특이성 primers인 nec1/nec2 primers는 *F. necrophorum*(ATCC 25286)과 반응하여 각각 820 bps와 817 bps의 amplicon을 생성하였다.
2. Primers nuc1/nuc2와 nec1/nec2는 각각 *F. necrophorum*과 *F. nucleatum*에 대해 amplicon을 생성하지 않았고, 감염관과 치근단 병소에서 자주 발견되는 다른 균종들인 *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406), *P. gingivalis*(ATCC 33277), *Prevotella intermedia*(ATCC 25611), *P. nigrescens* (ATCC 33563)와도 반응하지 않아서, 각각 *Fusobacterium nucleatum*과 *Fusobacterium necrophorum*에 종 특이성이

있음이 확인되었다.

3. 혐기성 배양으로 동정하지 못한 *F. nucleatum*과 *F. necrophorum*을 중합효소연쇄반응법을 이용하여 동정할 수 있었다.

## 참고 문헌

1. Dahlen G, Bergenholtz G. Endodontic activity in teeth with necrotic pulps. J Dent Res 59: 1033-1040, 1980.
2. Kantz WE, Henry CA Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. Arch Oral Biol 19: 91-96, 1974.
3. Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. J Endod 2: 146-148, 1976.
4. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol 7: 257-262, 1992.
5. Gharbia SE, Shah HN, Lawson PA, Haapsalo M. The distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. Oral Microbiol Immunol 5: 324-327, 1990.
6. Hillman JD, Socransky SS. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch Oral Biol 30: 791-795, 1985.
7. Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. Infect Immun 38: 1137-1148, 1982.
8. Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect Immun 48: 507-519, 1985.
9. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. Oral Microbiol Immunol 3: 1-7, 1988
10. Bennet KW, Eley A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. J Med Microbiol 39: 246-254, 1993.
11. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR. Intrageneric relationships of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. Int J of Syst Bacteriol 41: 347-354, 1991.
12. Morris ML, Andrews RH, Rogers AH. Investigations of the taxonomy and systematics of *Fusobacterium nucleatum* using allozyme electrophoresis. Int J of Syst Bacteriol 47: 103-110, 1997.
13. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum*. Int J of Syst Bacteriol 40: 74-78, 1990.
14. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR. Recognition of *Fusobacterium nucleatum* subgroups Fn-1, Fn-2 and Fn-3 by ribosomal RNA gene restriction patterns. FEMS Microbiol Lett 65: 41-46, 1989.
15. Gharbia SE, Shah HN. Isolation, purification and characterization of 2-oxoglutarate reductase from *Fusobacterium nucleatum*. FEMS Microbiol 80: 283-288, 1991.
16. Lemierre A. On certain septicaemias due to anaerobic organisms. Lancet 1: 701-703, 1936.
17. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. Int J Syst Bacteriol 46: 341-343, 1996
18. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conven-



- tional laboratory lab. *Oral Surg* 20: 340-349, 1965.
19. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg* 49: 171-174, 1980.
  20. Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *J of Oral Surg* 50: 457-461, 1980.
  21. Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 16: 534-538, 1990.
  22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
  23. Henry AQ, Erich. PCR Technology. Stockton Press 1989.
  24. Jayarao BM, Dore JE, Baumbach GA, Matews KR, Oliver SP. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 29: 27740-27748, 1991
  25. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 1942-1946, 1990.
  26. Slots J, Flynn J, Li G. PCR analysis of the *P. gingivalis* collagenase gene. *Clin Infect Diseases* 20: 167-168, 1995.
  27. Griffen AL, Leys EJ, Fuerst PA. Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 7: 240-243, 1992.
  28. Leys EJ, Griffen AL, Strong SJ, Fuerst PA. Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1288-1294, 1994.
  29. Watanabe, Frommel TO. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the PCR. *J Dent Res* 72: 1040-1044, 1993.
  30. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of PCR and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Perio Res* 31: 496-501, 1996
  31. Chen C, Slots J. AP-PCR of periodontal pathogens: discriminative primers and genetic diversity. *Clin Infect Dis* 20: 301-303, 1995.
  32. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with PCR. *Clin Infect Dis* 20: 304-307, 1995.
  33. Wahlfors J, Meurman JH, Alakujala P, Korhonen A, Torkko H. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* by a rapid PCR method. *J Dent Res* 74: 1796-1801, 1995.
  34. Milsom SE, Sprague SV, Dymock D, Weightman AJ, Wade WG. Rapid differentiation of *P. intermedia* and *P. nigrescens* by 16S rDNA PCR-RFLP. *J Med Microbiol* 44: 41-43, 1996.
  35. Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lampert F. PCR reaction and dot-Blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol* 67: 994-1003, 1996.
  36. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J Endod* 23: 620-623, 1997
  37. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN. Characterization of *P. intermedia* and *P. nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 65: 56-61, 1994
  38. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of Black-pigmented Bacteroides with endodontic infections. unpublished, 1998.
  39. Conrads G, Gharbia SE, Kishor Gulabivala. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 23: 433-438, 1997.
  40. Pantera MJ. Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented Bacteroides strains. *Infect Immunol* 39: 565-574, 1980
  41. Hanazawa S. Monoclonal antibody against *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. *J Clin Microbiol* 29: 2550-2553, 1991.
  42. Sundqvist G. Prevalence of black-pigmented Bacteroides spp. in human apical periodontitis. *Infect Immunol* 53: 13-19, 1989
  43. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 522-530, 1994
  44. Bae KS, Baumgartner JC, Nakata TT. Development of anaerobic bacterial leakage model. *J Endod* 24: 233-235, 1998.
  45. Baumgartner JC, Falkler WA. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 7: 253-256, 1992.
  46. Bennet KW, Duerden BI. Identification of fusobacteris in a routine diagnostic laboratory. *J Appl Bacteriol* 59: 171-181, 1985.
  47. Morgenstein AA, Citron DM, Finegold SM. New medium selective for *Fusobacterium* species, and differential for *Fusobacterium necrophorum*. *J Clin Microbiol* 13: 666-669, 1981.
  48. Brazier JS, Citron DM, Goldstein EJC. A selective medium for *Fusobacterium* spp. *J Appl Bacteriol* 71: 343-346, 1991.