

Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Randomly Amplified Polymorphic DNA

Byoung-Seon Yang[†]

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

Pseudomonas aeruginosa is a commonly isolated nosocomial pathogen. DNA fingerprinting of *P. aeruginosa* is examined by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). In this study, *P. aeruginosa* were isolated from environmental and clinical specimens and the molecular typing of the microorganisms was investigated by RAPD. Thirty strains of *P. aeruginosa* were selected from the strains isolated formerly and submitted for type identification to the University Hospital. 15 strains of *P. aeruginosa* were received from Chungnam University Hospital and 14 strains from Gyeongsang University Hospital. DNA of *P. aeruginosa* was extracted by Qiagen genomic DNA kit. PCR mixtures were set up and incubated. Reactions mixtures were made to be optimal for *P. aeruginosa*. RAPD typing analysis was carried out by the multivariate statistical program (MVSP) V3.0. RAPD type I was the most common pattern and included 23 strains. Most of strains from Gyeongsang University Hospital belonged to RAPD type Ib and 15 strains from Chungnam University Hospital to RAPD type I or II. RAPD typing of *P. aeruginosa* isolated from the environmental and clinical specimens was very simple and reproducible.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

서 론

Pseudomonas aeruginosa 균주는 호기성 그람음성 비발효성 간균으로 병원환경을 비롯하여 자연계에 널리 존재하며 오염된 의료장비나 의료진의 손에 의해서 인체감염을 일으키는 균으로 1990년대부터 원내감염의 원인균으로 급격한 증가를 보이고 있다. 인체감염은 하부호흡기 감염이 가장 흔하고, 비뇨기감염, 창상감염 및 패혈증 등 다양한 감염증을 유발한다. 병원감염균의 역학적 조사를 위한 방법으로 표현형 (phenotype)과 유전자형 (genotype)에 의한 분류방법이 있는데 표현형에 의한 *Pseudomonas aeruginosa* 균주의 형별분류에는 항생제 감수성검사, 생물형 (biotyping), 혈청형 (serotyping) 등을 이용하며²⁾ 유전자형 (genotype)에 의한 방법으로 여러 가지 형태의 분자 유전학적 기법 중에서 restriction fragment length polymorphisms (RFLP)와 pulse-field gel electrophoresis (PFGE), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)방법 등이 이용되고 있다¹³⁾. 표현형은 많은 시간과 노동력을 요하며

재현성이 부족하여 균종간에 변별력 떨어져 때로는 부적절한 결과를 내기도 하며 유전자형 PFGE의 경우 변별력은 양호하나 제한효소로 절단한 염색체 DNA를 전류의 방향을 주기적으로 바꾸면서 전기영동하는 등의 방법은 재현성과 변별력은 뛰어나나 특별한 장치가 필요하고 실험 소요시간이 3일 정도로 길어 일반적인 검사실에서 사용하기에는 어려운 점이 많다⁷⁾. RAPD 방법은 한 개의 임의의 primer를 이용하여 증폭된 DNA의 단편들의 다형성을 관찰하는 방법으로 유전자 연관 지도 작성에 응용되고 있다⁶⁾. RAPD 방법은 분자역학적인 형별구분 방법으로서 사용하기 쉬우며 다양한 세균에 대해서 동일한 primer를 이용하여 시도해 볼 수 있고, 하나의 primer만 이용한 반응에서 균주 사이의 변별력이 높은 결과를 보고하고 있다⁴⁾. 병원환경에서 동일한 균종이 일정한 기간 동안에 통상적인 분리비율보다 높게 분리되거나 한 장소에서 지속적으로 다수의 환자로부터 분리되면 병원 감염이 발생하였거나 그 병동의 환경에 병원감염균의 클론을 추정할 수 있다^{5,6)}. 병원감염 균주에 적절한 분자 유전학적 구별방법을 이용하여 동일한 클론에 의한 감염을 확인하고 감염원을 밝혀 더 이상 병원감염이 발생하지 않도록 조치를 취할 수 있다. 본 연구에서는 대학병원의 환경 및 임상검체에서 *P. aeruginosa*을 분리하고 RAPD 방법을 이용하여 형별분류와 역학조사 방법으로서의 유용성을 알아보려고 하였다.

*논문 접수: 2003년 11월 8일

수정재접수: 2003년 11월 27일

[†]별책 요청 저자: 양병선, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142, 진주보건대학 임상병리과

Tel: 055-740-1851, Fax: 055-740-1846

e-mail: ybseon@chc.ac.kr

재료 및 방법

1. 사용균주

본 연구에 사용된 균주는 환경 및 임상검체로부터 분리한 충남대학병원 15균주, 경상대학병원 14균주, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 1균주 등 총 30균주였다. DNA추출을 위한 배지로는 Tripcase soy broth를 사용하였다.

2. Oligonucleotides

Primer는 Operon (USA)의 10 mer A kit 20가지 primer 중에서 Table 1과 같이 208, 228, 241, 270, 272에 해당하는 것을 Bioneer (Korea)에 제작 주문하여 사용하였다 (Table 1).

3. 미생물 자동화 동정기기에 의한 동정

생화학적 특성조사는 미생물자동화 동정기기인 ATB Expression system (BioMerieux)를 이용하여 시험하였다. 영양한천 배지에서 생성된 집락을 백금이를 사용하여 McFarland 0.5 표준농도로 조절하여 ID 32 GN 동정 kit에 접종하고 35°C에서 배양 후 결과를 ATB reader을 이용하여 동정하였다.

4. RAPD 분석

배양된 균을 모아서 DNA Qiagen kit을 이용하여 사용설명서대로 실험하여 DNA을 추출하였고, PCR을 위한 혼합액은 dNTP (2.5 mM) 4 µl, 10x Buffer 2 µl, Primer (100 pmol) 각각 1 µl, genomic DNA (25 ng) 1 µl, Taq DNA polymerase (2 units) 1 µl, 그리고 반응 용액이 20 µl 되게 증류수를 넣어서 제조하여 PCR을 실시하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer)에서 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 40°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분의 순서로 30회를 시행하고 72°C, 5분간 final extension하였다. PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel, 0.5x TBE buffer에서 70 volts, 100mA로 3시간 동안 전기영동을 실시한 다음 gel은 ethidium bromide에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고 po laroid camera로 사진을 촬영하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for RAPD for *Pseudomonas aeruginosa*

Primer	Sequence (5' to 3')
208	ACGGCCGACC
228	GCTGGCCGAC
241	GCCCGAGCGG
270	TGCGCGCGGG
272	AGCGGGCCAA

5. Computer analysis

각 시험 균주간의 유사도 측정을 위하여 사진 상에 나타난 PCR 생성물을 각각 하나의 형질로 간주하여 생성된 band의 유무에 따라 1과 0으로 표시하여 data matrix를 작성하고 통계처리 프로그램인 MVSP (MultiVariate Statistics package Ver-

Table 2. RAPD genotyping of *P. aeruginosa* from various isolated

Strains	Source of isolation	RAPD type
CUH1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	Ia
CUH2	Patient (GS), CUH	IIa
CUH3	Patient (GS), CUH	IIa
CUH4	Floor (GS), CUH	IIa
CUH5	Patient (ICU), CUH	IIb
CUH6	Patient (ICU), CUH	IIb
CUH7	Patient (ICU), CUH	IIb
CUH8	Toilet (ICU), CUH	IIb
CUH9	Corridor (ICU), CUH	Ib
CUH10	Patient (CS), CUH	Ia
CUH11	Patient (CS), CUH	Ia
CUH12	Floor (CS), CUH	Ia
CUH13	Patient (PED), CUH	Ia
CUH14	Patient (ICU), CUH	Ia
CUH15	Patient (NS), CUH	Ia
CUH16	Floor (NS), CUH	Ia
GUH1	Patient (ICU), GUH	Ib
GUH2	Patient (GS), GUH	Ib
GUH3	Patient (ICU), GUH	Ib
GUH4	Floor (GS), GUH	Ib
GUH5	Floor (GS), GUH	Ib
GUH6	Patient (ICU), GUH	Ib
GUH7	Patient (ICU), GUH	Ib
GUH8	Floor (ICU), GUH	Ib
GUH9	Corridor (ICU), GUH	Ib
GUH10	Patient (IM), GUH	Ia
GUH11	Patient (CS), GUH	Ib
GUH12	Floor (CS), GUH	Ib
GUH13	Corridor (PED), GUH	Ib
GUH14	Patient (ICU), GUH	Ib

CUH, Chunnam University Hospital; GUH, Gyoungsang University Hospital; ATCC, American Type Culture Collection; GS, general surgery; ICU, intensive cure unit; CS, chest surgery; Ped, pediatrics; NS, neurosurgery; IM, internal medicine

sion 3.1)를 이용하여 UPGMA법으로 Jaccard's coefficient를 산출하고 이를 바탕으로 각 시험균주간 similarity matrix를 작성하고, plot program을 이용하여 시험균주의 phenogram을 작성하였다.

결 과

1. 분리균주의 생리·생화학적 특성

분리된 29개 균주는 Oxidase 양성, catalase 양성, 용혈성 시험 양성, 42°C 성장으로 나타났고, ID 32 GN 동정 Kit를 사용하여 *P. aeruginosa* 균주를 확인 동정하였다.

2. *P. aeruginosa*의 RAPD 양상

30균주의 RAPD 결과에 따라 distance value 0.74에서 I군, II군의 2개의 군으로 나누어졌으며, I군은 다시 2개의 소그룹 (Ia, Ib)으로 나누었다. I군이 23주 (76.7%), II군이 7주 (23.3%)로 대부분 I군에 속하였다. I군에는 충남대학교병원 분리주 9균주와 경상대학교병원 분리주 14균주로 나타났고, Ia군에 속하는 9균주 (39%) 중 8균주는 충남대학교병원 균주이고 1균주는 경상대학교병원 균주로 나타났다. Ib군에 속하는 14균주 (61%) 중 1균주는 충남대학교병원 균주이고 13균주는 경상대학교병원

균주로 나타났다. 분리원이 다른 충남대학교병원 분리주 7균주는 RAPD양상이 모두 동일한 II군에 속했다. IIa군에 속하는 CUH2, 3, 4균주 (43%)는 충남대학교병원외과 환경 및 환자에

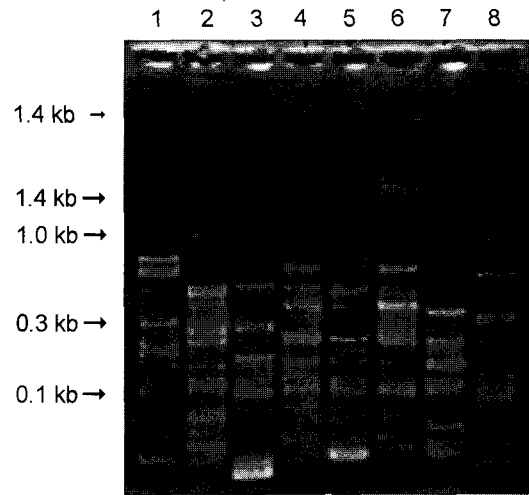


Fig. 1. RAPD patterns of *P. aeruginosa* isolates produced by primer 228. Lane 1, CUH1; lane 2, CUH2; lane 3, CUH3; lane 4, CUH4; lane 5, GUH1; lane 6, GUH2; lane 7, GUH10; lane 8, GUH11.

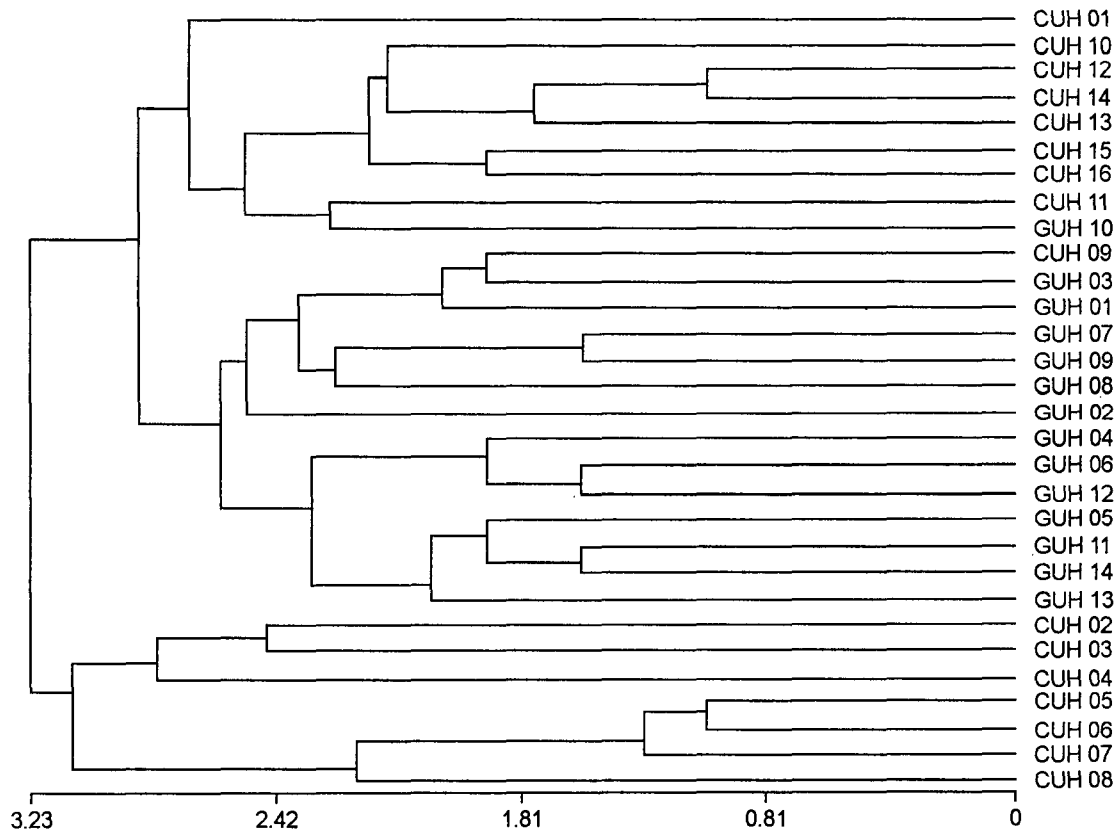


Fig. 2. Dendrogram showing the cluster analysis results for 30 strains of *P. aeruginosa* by RAPD patterns with primer 228.

게서 분리한 균주이고, IIb에 속하는 CUH5, 6, 7, 8균주 (57%)는 충남대학병원 중환자실환경 및 환자에게서 분리한 균주로 나타났다 (Table 2). 각각의 primer를 사용하여 실험한 결과 228 primer는 *P. aeruginosa*에 대하여 평균 11~18개의 band를 형성하여 균주간 및 균주간 변별력이 양호하였고 208 primer는 평균 5~8개의 band를 보여 241 primer와 동일한 양상을 보였다. 270 primer와 271 primer는 평균 12~18개의 band를 형성하여 일부 균주들은 증폭산물이 매우 약하거나 형성되지 않았다. 1차 분리한 genomic DNA와 1개월 뒤인 2차에 분리한 genomic DNA로 RAPD를 시행하여 비교한 결과 양호한 재현성을 보였다 (Fig. 1, 2).

고 찰

원내감염은 여러 가지 경로를 통하여 발생하나 최근 각종 소독, 멸균법과 항생제의 개발 그리고 일회용품 등의 사용으로 과거보다 위생적인 환경에도 불구하고 면역억제제의 사용, 장기이식 등에 각종 시술 또는 검사에 침습적 처치가 증가함으로 인하여 오히려 병원감염이 증가하고 있으며³⁾, 특히 *P. aeruginosa*는 원내감염 세균으로 중요시되고 있으며 심각한 문제가 되고 있다^{10,11,12)}. 전파경로에 대한 선의 의료인이나 환자의 교류를 통한 전파가능성을 제시한 연구도 있는 반면, 넓은 지역에 걸친 전파와 대륙간 전파가 가능하려면 의료인이나 환자보다는 지역사회를 통한 전파가 있을 것이라고 추정하기도 한다^{8,9)}. 따라서 이들 균주에 대한 빠른 진단에 의한 감염의 확산 및 숙내 전파를 막는 것이 중요시되고 있으며, 감염질환의 역학적 조사에 표준화된 방법이 절실히 필요하다. PCR을 이용한 DNA fingerprinting법은 비용이 저렴하고 단시간 내에 손쉽게 시행할 수 있으며, 세균을 표현형이 아닌 유전형으로 분류할 수 있는 실험기법으로 세균의 분류와 역학조사에 많이 이용되고 있다. 최근 변별력이 뛰어나 가장 선호되는 역학적 타이핑 방법으로 PFGE가 이용되고 있으나 특별한 장비와 시간과 비용이 많이 소요된다. 역학조사의 도구로서의 유용성은 간편하고 신속하게 감염원을 선별하는 방법으로 요약되어지는데 이러한 조건을 만족시킬 수 있는 방법은 없다. 그러나 주어진 역학적 조건하에서 가장 적절한 방법은 실제로 시행하여 검사가 잘되는 방법이라고 하였다¹⁴⁾. RAPD 방법은 PFGE에 비해 검사 시간이 짧고, 특별한 장비가 필요하지 않아 역학조사에 많이 이용되고 있는 기법이다¹⁾.

5종의 primer를 사용한 실험에서 모두 band가 나타났으나 RAPD 분석에서 가장 중요한 증폭된 band의 수는 사용한 primer에 따라서 모두 다르게 나타났다. 208 primer를 사용한 실험에서는 5~8개의 band가 나타나고 band의 선명도가 떨어져 변별력이 낮았으며 다른 primer의 경우 모두 300 bp에서 1 kb의 산물만이 증폭되고 band가 너무 조밀하게 나타나 변

별력과 분석이 힘들었다. 228 primer를 사용한 RAPD 분석에서는 실험에 사용한 30균주에서 300 bp에서 3 kb까지의 분자량을 가진 DNA band가 나타나 균주간 변별력이 가장 높았고 분석에서 있어서도 가장 용이하였다. 본 연구에서는 RAPD 분석이 시행하기가 가장 쉽고 빠른 시간내에 결과를 얻을 수 있으며 균주가 변별력이 또한 높음을 알 수 있었다. 충남대학병원 15균주, 경상대학병원 14균주, 표준균주 1균주 총 30균주 실험한 결과, RAPD type I군과 II군의 두개의 군으로 나타났다. 대학병원 분리균주 대부분 RAPD type I으로 나타났고 충남대학병원에서 분리한 15균주 중 8균주는 I군으로 나타났고 7균주는 II군으로 나타났다. I군으로 나타난 8균주는 Ia군에 속하였고, II군으로 나타난 7균주 중 IIa군에 속하는 3균주는 외과환경 및 환자에게서 분리한 균주이고, IIb에 속하는 4균주는 중환자실환경 및 환자에게서 분리한 균주로 나타났다. 경상대학병원의 13균주는 RAPD type Ib군으로 분리원이 중환자실환경 및 환자이고, 1균주는 Ia군으로 분리원이 내과로 나타났다. 앞으로 역학적으로 관련된 균주들에 대해 추가적인 시간과 노력을 들여서 다양한 방법의 유전자형을 이용한 세균형별을 지속적으로 연구하여 병원내감염의 전파를 차단할 수 있는 대책이 수립되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 진주보건대학 학술연구논문 연구비에 의해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Boom RC, Salimans M and Jansen CL (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, **28**: 495-503.
- 2) Dixon RE (1995): Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs, In R. P. Wenzel(ed.), Prevention and control of nosocomial infections. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Md.
- 3) Fegan M, Francis P and Fuerst JA (1991): Heterogeneity, persistence, and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, **29**: 2151-2157.
- 4) Grundmann H, Schneider C, Hartung D and Pitt TL (1995): Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, **33**: 528-534.
- 5) Hancock REW, Mutharia IM, Chan L, Speert DP and Pier GB (1983): *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun*, **42**: 170-177.

- 6) Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ and Emori TG (1992): A modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **17**: 780-795.
 - 7) Kersulyte DM, Struelens J, Deplano A and Berg DE (1995): Comparison of arbitrary primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **33**: 2216-2219.
 - 8) Mahenthiralingam E and Speert DP (1995): Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. *Infect Immun*, **63**: 4519-4523.
 - 9) Pier GB, Meluleni G and Neuger E (1992): A murine model of chronic mucosal colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **60**: 4768-4776.
 - 10) Ramphal RL, Koo KS, Ishimoto PA and Lory S (1991): Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* pilin-deficient mutants to mucin. *Infect Immun*, **59**: 1307-1311.
 - 11) Saiman LK, Ishimoto S and Prince A (1990): The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers. *J Infect Dis*, **161**: 541-548.
 - 12) Tang H and Prince A (1995): Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary. *Infect Immun*, **63**: 1278-1285.
 - 13) Tenover FC, Arbert RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33**: 2233-2239.
 - 14) Versalovic JT, Koeuth and Lupski JR (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, **19**: 6823-6831.
-