

## 치면세균막내의 *Fusobacterium nucleatum*과 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 동정을 위한 세균배양법 및 Multiplex PCR법의 비교

김화숙<sup>†</sup> · 임선아  
전남과학대학 치위생과

### Comparison between Bacterial Culture Method and Multiplex PCR for Identification of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the Dental Plaques

Hwa-Sook Kim<sup>†</sup> and Sun-A Lim

Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College, Chunnam 516-911, Korea

**Abstract** This study was carried out for the purpose of comparing bacterial culture method, single PCR, and multiplex PCR for identification of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult periodontitis. Targeting 20 patients with adult periodontitis, the subgingival plaque was collected in teeth, respectively, for #16, #36, #44. A bacillus was cultivated by painting it over the solid selective media of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*. Bacterial species were detected in 0 tooth with 12 pieces, respectively. Through single PCR and multiplex PCR, the positive reaction was indicated in 43 teeth with 45 pieces, respectively, as for *F. nucleatum*, and in 1 tooth with 4 pieces, respectively, as for *A. actinomycetemcomitans*. In the comparative analysis between bacterial identification methods, *F. nucleatum* showed the more statistically significant difference ( $p = 0.000$ ) in comparison between single PCR and multiplex PCR. Even *A. actinomycetemcomitans* was indicated significantly ( $p = 0.067$ ) in a case that is based on 0.1 in significant level in the comparison between single PCR and multiplex PCR. In conclusion, as a result of comparing the bacterial identification methods, the detection frequency was indicated to be higher in PCR than in bacterial culture method. Single PCR and multiplex PCR showed the mutually similar detection frequency. Accordingly, given thinking of economic efficiency, quickness, and reduction in labor force, it is thought to be more efficient method to use single PCR as the bacterial identification method.

**Key words** *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Culture method, Multiplex PCR, Single PCR

## 서 론

치주질환은 치아를 지지하는 구조 즉, 치은, 치주인대 및 치조골에 발생하는 염증성 질환으로, 치면세균막에 존재하는 혐기성 세균이 주요한 원인인자로 알려져 있다. 구강 내에는 약 700여종 이상의 세균이 존재하고 있는데<sup>1)</sup>, 성인성 치주염은 치은연하 치면세균막 내의 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 및 *Bacteroides forsythus* 등의 세균과 깊은 관련성이 있는 것으로 보고되었다<sup>2)</sup>.

*F. nucleatum*은 혐기성 그람음성 간균으로 nuclease, phosphatase, lipopolysaccharide(LPS) 등을 생성하여 치주 조직을 파괴하는 세균이다. 건전한 치주조직이나 모든 형태의 염증이 있는 치주질환 부위에서 가장 우점종으로 존재하는 세균<sup>3,5)</sup>으로 치주질환 부위에서 혐기성 세균들이 성장할 수 있도록 혐기적인 환경을 만드는데 중요한 역할을 담당하고<sup>6)</sup>, 구강내 대다수의 세균과 응집(coaggregate)할 수 있어서 초기(그람양성 세균) 및 후기(그람음성 세균) 치면세균막 형성시 집락화하는 세균들 사이에서 교량 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

*A. actinomycetemcomitans*는 통성 그람음성 간균으로 숙주조직을 직접 침투하며 LPS와 leukotoxin 등을 생성하여 숙주의 방어기전을 파괴하고 국소성 유년성 치주염과 급성 파괴성 치주질환에 관여한다. 치주병소가 없는 건강한 사람의 치은연하 뿐만 아니라 치은연상 치면세균

<sup>†</sup>Corresponding author  
Tel: 061-360-5375  
Fax: 061-360-5377  
E-mail: marblehall76@hanmail.net

막에서도 매우 적은 수로 존재하는 세균이다<sup>8)</sup>. 또한 구강의 여러 부위로 전파되어 감염성 심내막염의 원인이 되기도 한다.

치주질환의 진단, 치료 및 예후를 평가하기 위해 다양한 치주 병원성 세균들을 검사하는 방법들이 있는데 세균 배양법은 가장 고전적이면서 정확성이 높은 방법이다. 하지만 많은 시간, 노동력, 경제력을 필요로 하기 때문에 현실적으로 세균 동정에 이용하기에는 매우 어려움이 크다. 반면에 multiplex polymerase chain reaction(PCR)법<sup>9-12)</sup>은 individual PCR법<sup>13-15)</sup>을 포함한 기존의 세균 검출 방법들에 비해 좀 더 신속하고, 경제적이며, 노동력 절감과 함께 단시간에 다양한 세균을 동시 다발적으로 검출할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

Kim 등<sup>10)</sup>은 16S rRNA 유전자(rDNA) 염기서열을 바탕으로 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*를 동시에 동정할 수 있는 multiplex PCR 프라이머를 개발하여, 특이성 및 민감도 조사를 실시하여 우수성을 보고하였고, 성인성 치주염 환자의 치은연하 치면세균막 샘플을 이용해 multiplex PCR법과 single PCR법을 비교하였다.

본 연구는 Kim 등<sup>10)</sup>의 연구를 바탕으로 성인성 치주염의 치은연하 치면세균막에서 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위한 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법을 비교하여 효율적인 세균

동정법을 알아보려고 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 치면세균막 채취

C 대학교 치과병원에 내원한 20명의 성인성 치주염[관정기준: pocket depth  $\geq$  4 mm, bleeding on probing(+)] 환자를 대상으로 각각 #16, #36, #44 치아의 치은연하 치면세균막을 멸균된 paper point를 이용하여 채취한 뒤 1×PBS 500  $\mu$ l에 담아 다음의 실험에 사용하였다.

### 2. 세균 배양

각각의 부위에서 채취한 샘플은 즉시 실험실로 옮겨 혐기성 세균배양기 안에서 원액 50  $\mu$ l를 1×PBS로 10,000배 희석한 다음 멸균된 면봉을 이용하여 *F. nucleatum*에 대한 고형 선택배지(1% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 1.5% Bacto agar, 5% defibrinized sheep blood, 4  $\mu$ g/ml erythromycin, 5  $\mu$ g/ml crystal violet)와 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 고형 선택배지[tryptic soy borth(TSB; Difco, USA); 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 1.5% Bacto agar, 75  $\mu$ g/ml bacitracin, 5  $\mu$ g/ml vancomycin]에 각각 도말하였다. 37°C 혐기성배양기(85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>,

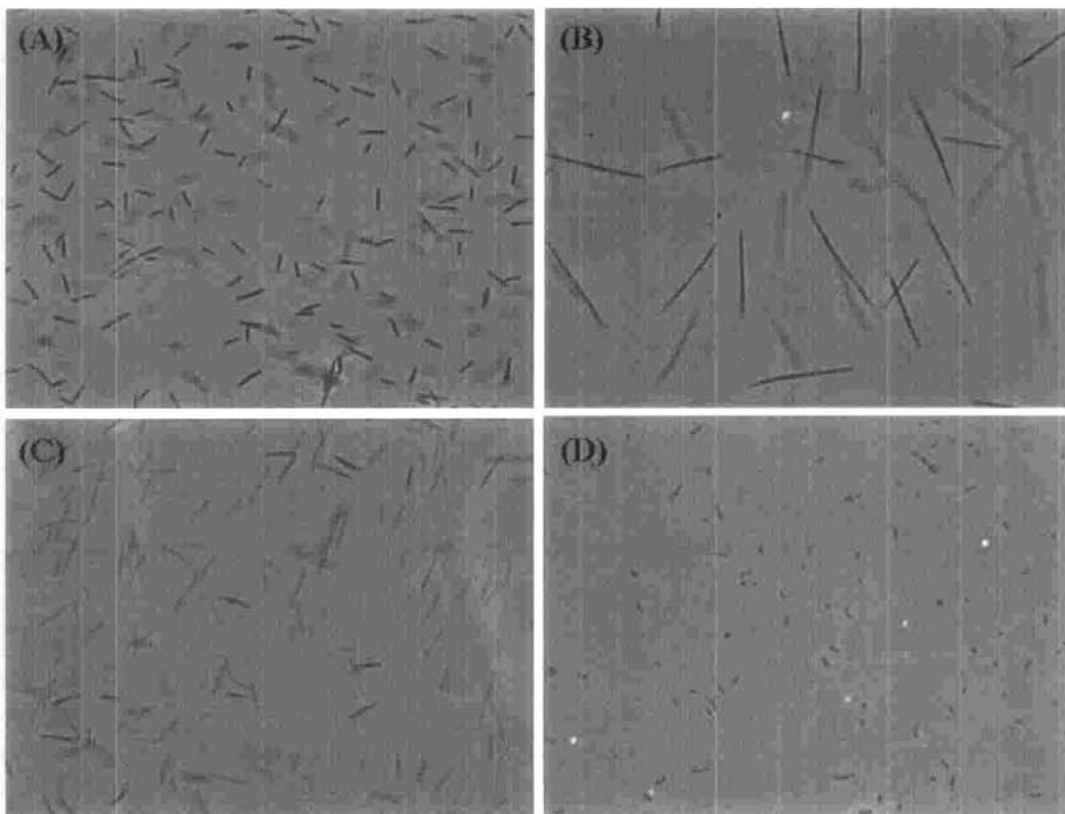


Fig. 1. Phase-contrast microscopy of (A) *F. nucleatum* subspecies *nucleatum* ATCC 25586, (B) *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953, (C) *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 51190, (D) *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384.

10% H<sub>2</sub>, Model Bactron I, Cornelius, OR, USA)에서 2~3일 동안 배양하였다<sup>16-18)</sup>. 각각의 선택배지에서 자란 균락을 동정하기 위해 *F. nucleatum*은 crystal violet에 의해 보라색의 둥글고, 볼록하며, 매끄러운 모양을 갖는 균락으로, *A. actinomycetemcomitans*는 회백색의 반투명, 매끄러운, 균락내 십자 또는 별 모양을 갖는 균락을 선택하여 그림염색법으로 그림 음성을 확인하고, 위상차현미경을 통해 *F. nucleatum*은 크기가 아중에 따라 다양하며, 양 끝이 뾰족한(fused) 방추형태, *A. actinomycetemcomitans*는 크기가 작고, 짧은(0.1~1 μm), 곧거나 구부러진 막대형태를 확인하였다(Fig. 1). 세균의 신속하고, 정확한 동정을 위해 추가로 직접 colony PCR을 실시하여 양성 반응을 보인 것을 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*로 판정하였다.

### 3. Single PCR법

치은연하 치면세균막에서 채취한 샘플의 DNA 추출은 Lee 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 원액 50 μl를 2× Lysis buffer(2 mM EDTA, 1% Triton X-100)와 혼합하여 10분 동안 끓여서 DNA를 얻었다. *F. nucleatum*을 동정하기 위해 AII-F6(5'-CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT-3')와 Fn-R6(5'-TTG CTT GGG CGC TGA GGT

TC-3') 프라이머를 사용하였고, *A. actinomycetemcomitans*를 동정하기 위해 AII-F6(5'-CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT-3')와 ChDC-AaR(5'-CAT CGC TGG TTG GTT ACC CTC TG-3') 프라이머를 사용하였으며, AccuPower<sup>®</sup> Premix[5 nmole deoxynucleoside triphosphate, 0.8 umole KCl, 0.2 umole Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 umole MgCl<sub>2</sub>, 1 unit *Taq* DNA polymerase](Bioneer Co., K0orea) 및 PTC-200 PCR machine(MJ Research Inc., USA)를 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR의 조건은 다음과 같았다. 20 μl의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 썬의 프라이머쌍과 4 μl의 세균 DNA를 넣고, *F. nucleatum*을 동정하기 위한 16S rDNA 증폭은 94에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C에서 1분간 변성, 65에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension 단계를 30회 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. *A. actinomycetemcomitans*를 동정하기 위한 16S rDNA 증폭은 94°C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94에서 1분간 변성, 68°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 단계를 32회 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 그리고 최종 반응물을 4 μl씩 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다. *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*

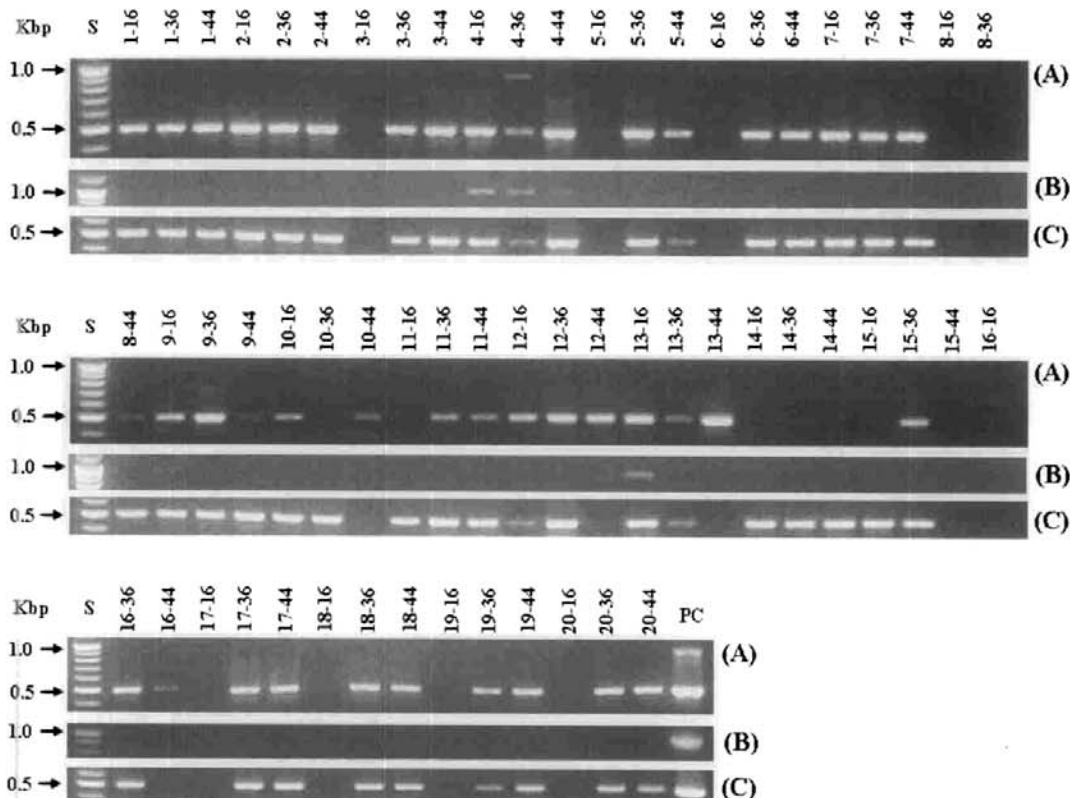


Fig. 2. Coincidence test of the multiplex PCR and single PCRs performed with the plaque samples. (A) Multiplex PCR for simultaneous detection of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*, (B) Single PCRs for the detection of *A. actinomycetemcomitans*, and (C) *F. nucleatum*. Lane; S, 100base pair DNA ladder; PC, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (positive control) The open and filled arrowheads indicate the PCR products of *A. actinomycetemcomitans*(925 bp) and *F. nucleatum*(495 bp), respectively.

의 PCR 증폭물의 크기는 각각 495 bp와 923 bp이고, 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다.

비교는 SPSS 12.0을 이용하여  $\chi^2$ -test(Fisher's exact test)를 실시하여 분석하였다.

4. Multiplex PCR법

치주질환 환자의 치은연하 치면세균막에 *F. nucleatum* 및 *A. actinomycetemcomitans*의 존재 유무를 동시에 알아보기 위하여 All-F6, Fn-R6, 및 ChDC-AaR 프라이머를 동시에 사용하였다. 이때 PCR 조건은 위의 *A. actinomycetemcomitans*를 동정하기 위한 16S rDNA 증폭 조건과 동일하게 실시하였다.

94°C에서 1분간 변성, 68°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 단계를 30회 반복한 후, final extension을 위해 72°C에서 10분간 시행하였다.

5. 통계분석

*F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위한 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법 간의

결 과

성인성 치주염 환자 총 20명의 60개 치아를 대상으로 하여 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위해 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법을 실시한 결과, *F. nucleatum*은 각각 12개(20.0%), 45개(75.0%), 43개(71.7%) 치아에서 양성반응, 48개(80%), 15개(25.0%), 17개(28.3%) 치아에서 음성반응을 보였다. *A. actinomycetemcomitans*는 각각 0개(0.0%), 4개(6.7%), 1개(1.7%) 치아에서 양성반응, 60개(100%), 56개(93.3%), 59개(98.3%) 치아에서 음성반응이 나타났다(Fig. 2, Table 1).

세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법 사이의 통계 분석 결과, *F. nucleatum*은 single PCR법과 multiplex PCR법의 비교에서 통계적으로 더 유의한 차이를 보였고

Table 1. The detection of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* using multiplex PCR, single PCR, and bacterial culture methods

Pt's No.	Tooth Site (#)	Fn <sup>1</sup>			Aa <sup>2</sup>			Pt's No.	Tooth Site (#)	Fn			Aa		
		CC <sup>3</sup>	SP <sup>4</sup>	MP <sup>5</sup>	CC	SP	MP			CC	SP	MP	CC	SP	MP
1	16	-	+	+	-	-	-	11	16	-	+	-	-	-	-
	36	-	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	+	+	+	-	-	-		44	-	+	+	-	-	-
2	16	-	+	+	-	-	-	12	16	-	+	+	-	-	-
	36	-	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	+	-	+	-	-	-
3	16	-	-	-	-	-	-	13	16	-	+	+	-	+	-
	36	+	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	-	-	+	-	-	-
4	16	+	+	+	-	+	-	14	16	-	+	-	-	-	-
	36	-	+	+	-	+	+		36	-	+	-	-	-	-
	44	+	+	+	-	+	-		44	-	+	-	-	-	-
5	16	-	-	-	-	-	-	15	16	+	+	-	-	-	-
	36	-	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	-	-	-	-	-	-
6	16	-	-	-	-	-	-	16	16	-	-	-	-	-	-
	36	-	+	+	-	-	-		36	+	+	+	-	-	-
	44	+	+	+	-	-	-		44	-	-	+	-	-	-
7	16	+	+	+	-	-	-	17	16	-	-	-	-	-	-
	36	-	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	-	+	+	-	-	-
8	16	-	-	-	-	-	-	18	16	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	-	+	+	-	-	-
9	16	-	+	+	-	-	-	19	16	-	-	-	-	-	-
	36	+	+	+	-	-	-		36	-	+	+	-	-	-
	44	-	+	+	-	-	-		44	-	+	+	-	-	-
10	16	-	+	+	-	-	-	20	16	-	-	-	-	-	-
	36	-	+	-	-	-	-		36	+	+	+	-	-	-
	44	-	-	+	-	-	-		44	+	+	+	-	-	-

Fn<sup>1</sup>, *Fusobacterium nucleatum*; Aa<sup>2</sup>, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; CC<sup>3</sup>, Cell culture method; SP<sup>4</sup>, Single PCR method; MP<sup>5</sup>, Multiplex PCR method.

Table 2. Comparison between single PCR and cell culture

Species	No. of sample(%)				Detection frequency of the bacteria(%)		P-value
	Cell culture(+)		Cell culture(-)		Single PCR	Cell culture	
	Single PCR (+)	Single PCR (-)	Single PCR (+)	Single PCR (-)			
Fn <sup>1</sup>	11(18.3)	1(1.7)	34(56.7)	14(23.3)	45(75.0)	12(20.0)	.262
Aa <sup>2</sup>	0(0)	0(0)	4(6.7)	56(93.3)	4(6.7)	0(0)	*

\*Non available, Fn<sup>1</sup>: *Fusobacterium nucleatum*, Aa<sup>2</sup>: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Table 3. Comparison between single PCR and multiplex PCR

Species	No. of sample(%)				Detection frequency of the bacteria(%)		P-value
	Multiplex PCR(+)		Multiplex PCR(-)		Single PCR	Multiplex PCR	
	Single PCR (+)	Single PCR (-)	Single PCR (+)	Single PCR (-)			
Fn <sup>1</sup>	39(65.0)	4(6.7)	6(10.0)	11(18.3)	45(75.0)	43(71.7)	.000
Aa <sup>2</sup>	1(1.7)	0(0)	3(5.0)	56(93.3)	4(6.7)	1(1.7)	.067

Fn<sup>1</sup>: *Fusobacterium nucleatum*, Aa<sup>2</sup>: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Table 4. Comparison between cell culture and multiplex PCR

Species	No. of sample(%)				Detection frequency of the bacteria(%)		P-value
	Multiplex PCR(+)		Multiplex PCR(-)		Cell Culture	Multiplex PCR	
	Cell Culture (+)	Cell Culture (-)	Cell Culture (+)	Cell Culture (-)			
Fn <sup>1</sup>	11(18.3)	32(53.3)	1(1.7)	16(26.7)	12(20.0)	43(71.7)	.151
Aa <sup>2</sup>	0(0)	1(1.7)	0(0)	59(98.3)	0(0)	1(1.7)	*

\*Non available, Fn<sup>1</sup>: *Fusobacterium nucleatum*, Aa<sup>2</sup>: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

( $p = 0.000$ ), *A. actinomycetemcomitans*는 single PCR법과 multiplex PCR법의 비교에서 유의수준 0.05에서는 차이가 없었지만 0.1을 기준으로 할 경우 유의성 있게 나타났다( $p = 0.067$ )(Table 3). *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans* 모두 세균배양법과 single PCR법, 세균배양법과 multiplex PCR법 간의 비교에서는 통계적으로 유의한 의미는 없었다(Table 2, 4).

## 고 찰

치주질환과 관련이 깊은 세균을 동정하기 위한 가장 전통적인 방법은 세균배양법이다. 세균배양법은 고형배지 및 액체 배지에서 자란 세균을 그람염색법을 통해 그람 양성과 그람 음성 세균으로 분류하고, 고형배지에서 자란 균락 모양, 생화학적 검사 및 세균 대사에 의한 최종 산물의 분석법을 실시하여 세균을 식별하는 방법이다. 이러한 전통적인 세균배양법은 다양한 세균을 검사할 수 있는 장점을 가지고 있지만, 배양조건이 까다롭고, 배양시간이 길며, 여러 가지 기술적인 어려움을 가지고 있다<sup>20</sup>. 그리

고 21 alloenzyme법, immunoenzymatic assay, 단백질 전기영동법 및 DNA-DNA hybridization 등이 세균을 동정하기 위해 이용되지만, 이 방법들은 교차반응 및 위양성(false-positive)의 결과를 보이는 경우가 있다<sup>21</sup>. 현재 계통분류학적 측면에서 세균을 종(species) 수준으로 분류하는데 있어 기준이 되는 방법은 16S rDNA 염기서열비교법이다<sup>22,23</sup>. 그리고 치은연하 치면세균막에서 치주질환 원인균을 검출하기 위한 가장 효과적인 방법은 세균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 설계된 종-특이 프라이머를 이용한 PCR법이라고 할 수 있다<sup>15</sup>.

Kim 등<sup>10</sup>은 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*를 동시에 동정할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하였는데 5'은 16S rDNA 염기서열 가운데 공통으로 보존된 부위(AII-F6), 3'은 각각 특유한 부위에서 Fn-R6와 ChDC-AaR 프라이머를 디자인하였다. Multiplex PCR 프라이머의 특이성을 보기 위해 4개의 *F. nucleatum* 표준균주(ATCC 25586, ATCC 10953, ATCC 49256, ATCC 51190)와 3개의 *A. actinomycetemcomitans* 표준균주(ATCC 43717, ATCC 43718,



ATCC 33384) 및 구강 내에 존재하는 그람음성 세균 중 7종 8균주의 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시한 결과, *F. nucleatum*은 495 bp에서 *A. actinomycetemcomitans*는 925 bp에서 균주 특이성을 가졌고, 민감도 조사에 있어서도 두 세균 모두 single PCR법 및 multiplex PCR법에서 4 fg까지 검출 가능한 것으로 보고하였다. 그리고 성인성 치주염 환자의 치은연하 치면세균막 샘플 20개를 이용하여 multiplex PCR법과 single PCR법의 일치성을 검사한 결과 증폭물의 농도와 크기가 유사하게 나타난 것으로 보고하였다.

본 연구는 Kim 등<sup>10)</sup>의 연구를 바탕으로 한국인의 성인성 치주염 환자의 치은연하 치면세균막에서 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*를 동정하기 위한 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법을 비교하고자 시행되었다. 성인성 치주염 환자에서 채취한 총 60개 샘플을 대상으로 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위해 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법을 실시한 결과 *F. nucleatum*은 각각 12개(20.0%), 45개(75.0%), 43개(71.7%) 치아에서 양성반응을 보였지만, *A. actinomycetemcomitans*는 각각 0개(0.0%), 4개(6.7%), 1개(1.7%) 치아에서 양성반응이 나타났다. *F. nucleatum* 동정을 위해 세균배양법과 single PCR법, 세균배양법과 multiplex PCR법을 비교 분석한 결과 검출빈도에 있어서는 세균배양법에 비해 single PCR법 및 multiplex PCR법이 높은 검출 빈도를 보여 좀 더 효율적인 세균 동정법으로 생각되었지만 통계적으로는 유의한 차이가 없었다. *A. actinomycetemcomitans*는 세균배양법에서 검출되지 않으니 통계적으로 검정할 수 없었고, 세균 동정법간의 비교도 어려웠다. 이와 같이 두 세균에 대한 동정법 비교에 있어서 통계적 유의성을 보장받지 못한 이유는 실험에 이용된 샘플수가 너무 적어서 나타난 결과로 생각된다. Single PCR법과 multiplex PCR법 간의 비교에 있어서는 두 세균 모두 검출 빈도에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 통계적으로 유의한 차이를 보였고, *F. nucleatum*의 경우  $p=0.000$ 으로 더 유의성 있게 나타났다. 이는 *F. nucleatum*의 검출 빈도가 *A. actinomycetemcomitans*에 비해 훨씬 높게 나타났기 때문에 통계적인 차이를 나타낸 것으로 보인다. 그리고 Kim 등<sup>10)</sup>은 single PCR법과 multiplex PCR법 모두 민감도 조사에서 4 fg까지 검출 가능하고, 증폭물의 농도와 크기도 유사하다고 하였지만, 본 연구에서는 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans* 모두 multiplex PCR법에 비해 single PCR법에서 각각 2개, 3개 정도 많이 검출되어 약간의 차이를 보였다. 이는 치은연하 치면세균막에서 채취한 샘플에서 Lee 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 DNA를 추출하여 4  $\mu$ l의 세균 DNA를 이용하여 PCR을 실시하였는데, DNA 양은 일정하지만, 농도에 있어서 각 튜브마다 약간의 차이를 보여 나타난 결과라고 생각된다.

사람의 구강 내에서 *F. nucleatum*은 5가지 아종으로 동정되는데 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*은 건강한 치은열구, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*은 치주질환 부위에서 발견된다고 한다.<sup>24)</sup> 따라서, *F. nucleatum*은 치주상태와 관계없이 구강내에서 발현 빈도가 높은 세균이라 할 수 있다. *A. actinomycetemcomitans*는 국소성 유년성 치주염의 주요 원인균으로 유년성 치주염과 급성 파괴성 치주질환 부위에서 빈도가 높다고 할 수 있다. 본 연구 결과 성인성 치주염 샘플에서 *F. nucleatum*의 발현 빈도는 높았지만, 대조적으로 *A. actinomycetemcomitans*는 낮게 나타났는데, 그 이유는 한국인에서 국소성 유년성 치주염을 갖는 환자의 빈도가 낮기 때문에 *A. actinomycetemcomitans*의 발현을 역시 많지 않은 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 한국인의 성인성 치주염의 치은연하 치면세균막에서 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*를 동정하기 위해 세균 동정법을 비교한 결과 검출 빈도는 세균배양법보다 PCR법에서 높게 나타났고, single PCR법과 multiplex PCR법은 서로 유사한 검출 빈도를 보였다. 따라서 세균 동정을 위해 정확성, 경제성, 신속성 및 노동력 절감을 생각한다면 현재까지는 multiplex PCR법보다는 2-3개 정도 검출률이 높았던 single PCR법을 이용하는 것이 좀 더 효율적인 방법이라 생각된다.

## 요 약

본 연구는 성인성 치주염 환자의 치은연하 치면세균막을 총 60개 치아에서 채취하여 *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위해 세균배양법, single PCR법 및 multiplex PCR법을 실시하였고, 세균 동정법간의 비교를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위해 세균배양법, single PCR 및 multiplex PCR을 실시한 결과 *F. nucleatum*은 각각 12개(20.0%), 45개(75.0%), 43개(71.7%) 치아에서 양성반응을 보였지만, *A. actinomycetemcomitans*는 각각 0개(0.0%), 4개(6.7%), 1개(1.7%) 치아에서 양성반응이 나타났다.
2. *F. nucleatum*은 세균배양법에 비해 single PCR법 및 multiplex PCR법에서 높은 검출 빈도를 보여 좀 더 효율적인 세균 동정법으로 생각되었지만, 통계적으로는 유의한 차이가 없었다.
3. *A. actinomycetemcomitans*는 세균배양법에서 전혀 검출되지 않아 통계적으로 검정할 수 없었고, 세균 동정법간의 비교도 어려웠다.
4. *F. nucleatum*과 *A. actinomycetemcomitans*의 동정을 위한 single PCR법과 multiplex PCR법 간의 비교에서 두 세균 모두 검출 빈도에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 통계적으로는 유의한 차이를 보였다.

## 참고문헌

1. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ: Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 41(2): 558-563, 2003.
2. Socransky SS, Haffajee AD: The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 63(4 Suppl): 322-331, 1992.
3. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD: The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15(5): 316-323, 1988.
4. Haffajee AD, Socransky SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 78-111, 1994.
5. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V: Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9(1): 55-71, 1996.
6. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH: *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiol* 148(Pt 2): 467-472, 2002.
7. Roberts GL: Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br J Biomed Sci* 57(2): 156-162, 2000.
8. Mandell RL: A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun* 45(3): 778-780, 1984.
9. Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I, Lampert F, Lütticken R: Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 37(5): 1621-1624, 1999.
10. Kim MK, Kim HS, Kim BO, Yoo SY, Seong JH, Kim DK, Lee SE, Choe SJ, Park JC, Min BM, Jeong MJ, Kim DK, Shin YK, Kook JK: Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rDNA primers for simultaneous detection of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Biotechnol* 14(1): 110-115, 2004.
11. Seong JH, Kim DK, Shin KY, Kim BO, Kim MS, Kim MK, Kook JK: Simultaneous detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* by 16S rDNA-directed multiplex PCR. *J Korean Acad Dent Health* 26: 523-533, 2002.
12. Tran SD, Rudney JD: Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 34(11): 2674-2678, 1996.
13. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 11(4): 266-273, 1996.
14. Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lütticken R, 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(10): 994-1003, 1996.
15. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C: Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 20(Suppl 2): S304-307, 1995.
16. Bakken V, Högh BT, Jensen HB: Utilization of amino acids and peptides by *Fusobacterium nucleatum*. *Scand J Dent Res* 97(1):43-53, 1989.
17. Bakken V, Högh BT, Jensen HB: Growth conditions and outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum*. *Scand J Dent Res* 98(3):215-224, 1990.
18. Holm A, Rabe P, Kalfas S, Edwardsson S: Improved selective culture media for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J Clin Microbiol* 25(10):1985-1988, 1987.
19. Lee SE, Kim SY, Kim SJ, Kim HS, Shin JH, Choi SH, Chung SS, Rhee JH: Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J Clin Microbiol* 36(10): 2887-2892, 1998.
20. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK: Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol* 59(7): 431-438, 1988.
21. Chen C, Slots J: Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 20:53-64, 1999.
22. Amann R, Ludwig W, Schleifer KH: Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60: 360-365, 1994.
23. Jousunues-Sinerm HR, Summanen PH, Finegold SM: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods and cocci. In: Murray, F.C. and Tenenbaum, R.H.(Eds.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM press Washington pp.690-711, 1999.
24. Gharbia SE, Shah HN, Lawson PA, Haapasalo M.: Distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 5(6): 324-327, 1990.

(Received May 7, 2009; Revised June 20, 2009;  
Accepted June 22, 2009)

