

## 중이 삼출액 미생물의 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응을 이용한 분자생물학적인 진단

이정구<sup>1,3</sup> · 이인숙<sup>1,2</sup> · 박지연<sup>1</sup> · 정상운<sup>1</sup> · 오충훈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>단국대학교 의학레이저연구센터, <sup>2</sup>단국대학교 미생물학과, <sup>3</sup>단국대학교 이비인후과

본 연구에서는 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응을 이용하여 중이 삼출액에서 미생물 병인에 대한 특성을 알아보았다. 중이염환자의 중이 삼출액에서의 미생물 병인은 주로 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*와 *Moraxella catarrhalis*이다. 26 명의 환자로부터 39 개의 중이염의 삼출액을 얻었고, 중이 삼출액에서 DNA를 추출하였다. PCR은 16S rDNA의 C4 region에서 21 base pair의 common primer와 각각 bacterium specific primers [(i) *Haemophilus*-specific primer, (ii) *Moraxella*-specific primer, and (iii) *Streptococcus*-specific primer]를 이용하여 수행하였다. 39 개의 중이염의 삼출액 시료 중에서, *H. influenzae*가 24 개(61.5%) 검출되었고, *M. catarrhalis*는 10 개(25.6%), *S. pneumoniae*는 3 개(7.7%)가 검출되었다. 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응 진단 결과, 11 개(28%)의 중이삼출액 시료에서 음성을 나타내었다. 중이염의 중복감염은 9 개의 중이 삼출액시료에서 관찰되었고, 이들은 모두 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*에 의한 중복감염이었다. 본 연구에서 저자 등은 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응이 병원성 미생물을 빠르게 진단하고, 중이삼출액의 미생물 병인론을 추적할 수 있는 좋은 방법으로 제시하는 바이다.

**Key words** □ *Haemophilus influenzae*, middle ear effusion, *Moraxella catarrhalis*, multiplex PCR, *Streptococcus pneumoniae*

만성 삼출성 중이염은 고막의 천공을 나타내지 않고 중이강내에 장액성 또는 점액성의 삼출액이 지속되는 질환으로, 항생제 및 수술 방법의 발전에 힘입어 화농성 중이염의 빈도는 감소 추세에 있으나 삼출성 중이염의 경우 오히려 증가하는 경향이 있어 소아 난청 및 언어 장애의 중요한 원인이 되고 있다(1). 삼출성 중이염시 삼출액은 중이의 내강을 둘러싸고 있는 염증상태의 점막에서 기인하며, 이 삼출액이 지속되는 기간에 따라 3 주까지는 급성, 3 주에서 3 개월까지는 아급성, 3 개월 이상 지속되면 만성으로 정의될 수 있다(9).

중이 삼출액은 1958 년 Senturia 등(2)이 중이 삼출액의 미생물배양 검사에서 미생물을 검출하기 전까지 무균성이라고 생각 되어졌고, 그 후 중이 삼출액의 세균학에 대해서 많은 연구가 있었으나 이들은 중이 삼출액 검체에 대한 균 배양검사에 주로 의지해 왔다(3,6). 그러나, 이런 배양법에 의한 중이염 검출방법은 만성 삼출성 중이염에 있어서 20~30%의 낮은 균 검출율을 나타내었을 뿐만 아니라 많은 시간과 노력이 필요하였다(7). 따라서 중이 삼출액에 대하여 보다 높은 균 검출율을 나타낼 수 있는 방법의 필요성이 제시되었다. 최근에 PCR방법을 이용하기 시작하였고, PCR을 이용한 진단방법은 일반적인 배양검사의 균 검출율보다 훨씬 높은 70~80%의 미생물 검출율을 보였다(4,10).

본 연구에서 저자들은 빠르고 경제적이고 간편한 방법인 복합중합효소반응(multiplex PCR) 방법을 이용하여 소아중이염환자에서 중이염 원인균 검출을 시행하였다.

### 재료 및 방법

#### 대상

2000 년 9 월부터 2001 년 2 월까지 고막 천자술 및 환기튜브 삽입술을 시술한 26 명의 환자들로부터 총 39 개의 중이 삼출액 검체를 얻었다. 환자들의 나이는 1 세부터 7 세까지였으며 평균 연령은 3 세였다. 중이 삼출액은 이경과 고막운동성 검사를 통해 삼출성 중이염으로 진단되어진 환자들에게서 고막천자술과 환기튜브삽입술로 추출하였다.

#### 검체의 채취

외이도는 70% isopropyl alcohol을 투입 후 1 분 뒤에 제거하였다. 고막의 전하방에 고막천자술을 시행한 후 무균 처리된 흡입관(Juhn tray)과 흡입장치를 이용해 삼출액을 채취하였다. 검체는 PCR을 위해 바로 -70°C로 냉각시켰다.

#### 미생물 DNA분리

중이 저류액으로부터 미생물 DNA의 추출은 다음과 같은 방법으로 시행되었다. 먼저 검체들을 lysis cocktail (10 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.2 mg/ml proteinase K)에 넣고

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 041-550-1787, Fax: 041-550-1788  
E-mail: choh@dankook.ac.kr

균질화시킨 이후 하룻밤동안 37°C에서 유지시킨다. 그 후, 각 검체를 넣은 튜브에 300 µl의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 넣고 흔들고 10,000×g로 15 분간 원심분리를 시행하였다. 원심분리 후, 각 튜브의 위쪽 용액을 분리하여 새 용기에 담고 600 µl의 100% ethanol과 3 M sodium acetate 30 µl를 넣은 후 침전시킨다. 4°C에서 10,000×g으로 20 분간 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 80% cold ethanol로 세척 후 건조하여 20 µl dH<sub>2</sub>O로 DNA를 녹인다. 같은 방법으로 미리 배양되었던 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*와 *Moraxella catarrhalis*로부터 각각의 DNA를 추출하였다.

**복합중합효소연쇄반응과 PCR Primer**

16S rDNA의 보존 부위(conserved sequence) 중의 하나인 C4 region의 21 base pair의 염기 서열을 공통적인 anti-sense primer로 사용하였다(Table 1). *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*의 공통적인 anti-sense primer는 Panu가 제작한 것을 사용하였고(7), *S. pneumoniae*의 primer는 Whitehead Institute/MT Center for Genome Research에서 개발한 primer3을 이용하여 제작하였다. 이 염기서열은 *H. influenzae* (GenBank accession no. M35019)의 경우 679~699 사이에 위치하고, *M. catarrhalis* (GenBank accession no. L13736)의 경우에는 630~650 사이, 그리고 *S.*

*pneumoniae* (GenBank accession no. X58312)의 경우 567~587 사이에 존재한다. *H. influenzae*에 특이적인 primer는 *H. influenzae*의 16S rDNA의 177~200 사이에 위치한 24 mer의 primer를 sense primer로 제작하였다. *M. catarrhalis*의 경우, 416~435 사이에 위치한 20 mer, *S. pneumoniae*의 경우, 192~212 사이에 위치한 21 mer의 primer를 sense primer로 제작하였다. 이 primer들과 중이 삼출액에서 추출된 DNA와 배양된 미생물로부터 추출된 DNA를 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응을 시행하였다(Fig. 1). 복합중합효소연쇄반응의 조건은 DNA thermal cycler (MJ Reserch, Waltham, USA)를 사용하여 95°C에서 변성(denaturation), 50°C에서 결합(annealing), 72°C에서 중합(polymerization)의 3 단계를 30 회 시행하였다. 중합효소반응의 산물은 각각 3 µl를 2% agarose gel에서 100 volt, 20 분간 전기영동을 실시하였고 0.5% ethidium bromide 염색후 자외선 하에서 관찰하였다.

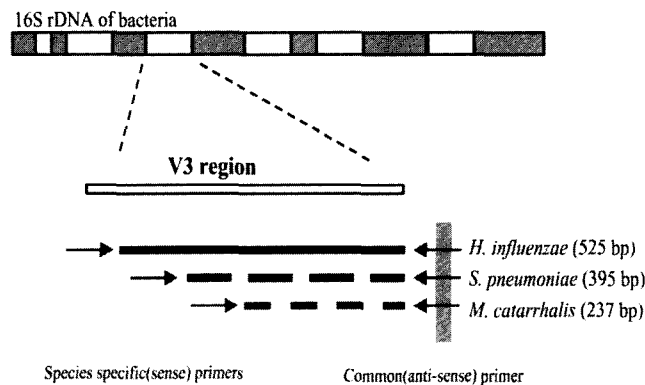
**결 과**

**배양된 중이염 원인균의 복합중합효소연쇄반응**

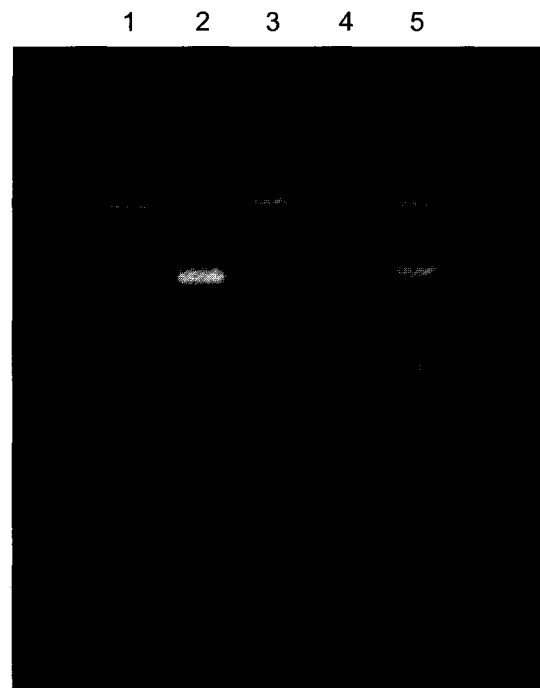
*S. pneumoniae*, *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*를 배양한 후 각 미생물에 특이적인 sense primer와 모든 미생물에 공통적인 anti-sense primer를 사용하여 최초로 한국인의 중이염 원인균에 대하여 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응 진단을 시행하였다. *H.*

**Table 1.** List of primers used for the multiplex PCR of bacterial pathogens

| Primers                       | Sequences                       |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Common (anti-sense)           | 5'-CTACGCATTTACCGCTACAC- 3'     |
| <i>H. influenzae</i> (sense)  | 5'-CGTATTATCGGAAGATGAAAGTGC- 3' |
| <i>M. catarrhalis</i> (sense) | 5'-CCCATAAGCCCTGACGTTAC- 3'     |
| <i>S. pneumoniae</i> (sense)  | 5'-CGACCTGAGAGGGTAATCGG- 3'     |



**Fig. 1.** Scheme of the 16S rDNA multiplex PCR. The PCR was done with DNA extracts with the common primers, which is located at C4 region in the 16S rDNA gene of all bacterial species, and species-specific primers of V3 region: (i) *Haemophilus*-specific primer, (ii) *Moraxella*-specific primer, and (iii) *Streptococcus*-specific primer.



**Fig. 2.** Results of the 16S rDNA multiplex PCR for the cultured pathogens. Lane 1, 100 bp ladder marker; Lane 2, *Moraxella catarrhalis* (237 bp); Lane 3, *Haemophilus influenzae* (525 bp); Lane 4, *Streptococcus pneumoniae* (395 bp); Lane 5, mixture of three pathogens.

*influenzae*의 DNA를 주형으로 복합중합효소연쇄반응 진단을 시행한 경우 2% agarose gel 상에서 525 base pair의 DNA 띠가 관찰되었고, *S. pneumoniae*의 경우는 395 base pair, 그리고 *M. catarrhalis*의 경우는 237 base pair의 DNA 띠를 관찰할 수 있었다. 또한 미생물을 혼합배양한 후 DNA를 추출하여, 이를 주형으로 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응 진단을 시행한 결과, 미생물을 나타내는 띠가 모두 관찰되었다(Fig. 2).

### 중이염 삼출액 검체의 복합중합효소연쇄반응

39 개의 중이 삼출액 검체로부터 DNA를 추출한 후, 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응 진단을 시행하였다. 2% agarose gel 상에서 하나 이상의 DNA 단편이 관찰된 시료는 28 개(71.8%) 이었고, 띠가 관찰되지 않은 시료는 11 개(28.2%)이었다. *H. influenzae*의 DNA 증폭 산물로 예측되는 525 base pair의 띠가 관찰된 시료는 24 개(61.5%)이었고, *M. catarrhalis*의 DNA 증폭 산물로 예측되는 237 base pair의 띠가 관찰된 시료는 10 개(25.6%)이었고, *S. pneumoniae*의 DNA 증폭 산물로 예측되는 395 base pair의 띠가 관찰된 시료는 3 개(7.7%)이었다. 중이삼출액 검체의 16S rDNA 복합중합효소연쇄반응 진단 결과, 혼합 감염은 *H. influenzae*와 *M. catarrhalis*의 경우 9 개(23.1%)에서만 관찰되었다. 또한 *M. catarrhalis*에 의한 감염은 한 환자 시료의 경우를 제외하고는 모두 혼합 감염의 양상을 나타내었다(Table 2).

## 고 찰

현재까지 이해되고 있는 중이염의 원인은 크게 3 가지이다. 첫 번째는 바이러스와 미생물의 감염이고 두 번째는 중이와 상기도를 연결시키는 이관의 기능 부전이다. 다음 세 번째는 알레르기나 만성염증의 결과로 중이강내 과도한 분비물이 생성되는 경우이다. 현재까지 중이염의 치료로는 항생제 등의 약물치료와 환기 튜브 삽입술 등이 있다. 이런 항생제 및 수술방법의 발달에 힘입어 화농성 중이염의 빈도는 감소추세에 있으나, 삼출성 중이염의 경우 오히려 증가하는 성향이 있어 소아 난청 및 언어장애의 중요한 원인이 되고 있다. 기존의 보고에 의하면 삼출성 중이염에서 검출된 주된 원인 균은 *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*이며 배지에서 균을 배양하는 방법으로 검출된 빈도는

2~15%, 3~6%, 1~7%로써, 미생물배양에 음성 반응을 보여 미생물 배양의 진단적 가치에 대해 의문이 제기되어 왔다.

Post 등(8)은 소아환자로부터 97 개의 중이 삼출액을 각기 특이적인 항원 생성에 관여하는 단백질의 primer를 고안하여 PCR 방법으로 분석하였다. 분석결과, 53 개에서 *H. influenzae*, 45 개에서 *M. catarrhalis*, 그리고 29 개에서 *S. pneumoniae*에 대한 양성 검출율을 나타내었다. 그러나, 일반 균 배양검사에서는 21 개에서 *H. influenzae*, 5 개에서 *M. catarrhalis*, 5 개에서는 *S. pneumoniae*에 대한 양성 검출율을 나타내었다. 즉, PCR에 의한 원인균 진단률은 일반적인 배양검사의 균 검출율 보다 훨씬 높은 70~80%의 미생물 검출율을 보였다(4,10).

또 다른 급성 중이염의 가장 흔한 원인은 바이러스에 의한 감염이다. 급성중이염 유아 환자에서 바이러스에 의한 질환은 약 41%로 보고되었다(5). 이중 39%가 respiratory syncytial virus에 감염되었고, 18%가 parainfluenza virus, 16%가 enterovirus, 14%가 influenza virus, 13%가 adenovirus에 각각 감염되었다. 또한 바이러스가 검출된 환자의 65%가 세균에 동시에 감염되었다.

미생물의 16S rDNA 염기서열은 생명연장의 필수적인 부분이기 때문에 대부분이 잘 보존될 뿐만 아니라 family- 또는 species specific sequence를 포함하고 있다. 본 연구에서는 16S rDNA 복합 중합효소반응을 이용하여 중이삼출액의 중이염 원인균을 진단한 결과, 기존의 PCR 방법보다 훨씬 빠르고 간편하다는 것과 특히 적은 양의 검체에서 균을 검출하는데 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 말

이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(2000-041-F00247).

## 참고문헌

1. Bluestone, C.D. 1988. Management of otitis media in infants and children: current role of old and new antimicrobial agents. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7, 129-136.
2. Bluestone, C.D., J.S. Stephenson, and L.M. Martin. 1952. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 7-19.
3. Brook, I., P. Yocum, and K. Shah. 1983. Aerobic and anaerobic bacteriological features of serious otitis media in children. *Am. J. Otolaryngol.* 4, 389-392.
4. Edwards, M.C. and R.A. Gibbs. 1994. Multiplex PCR: advantages, development and application. *PCR Methods Appl.* 27, 2488-2491.
5. Heikkinen, T., M. Thint, and T. Chonmaitree. 1999. Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N. Engl. J. Med.* 28, 260-264.
6. Krenke, C., J.S. Stephenson, and E.R. Wald. 1988. Incidence of organisms in otitis media. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 97, 20-21.
7. Panu, H.H., A. Markkanen, J. Ylikoski, and J.J. Wahlfors. 1997. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacteria species in middle ear effusion. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2854-2858.
8. Post, J.C., R.A. Preston, J.J. Aul, M. Larkins-Pettigrew, J.

**Table 2.** Results of the 16S rDNA multiplex PCR of 39 middle ear effusion from 26 patients

| Detected bands                                 | No. of sample positive by PCR/<br>No. of samples tested (%) |         |
|--|---|---------|
| Positive                                       | 28/39   | (71.8%) |
| <i>H. influenzae</i>                           | 24/39   | (61.5%) |
| <i>M. catarrhalis</i>                          | 10/39   | (25.6%) |
| <i>S. pneumoniae</i>                           | 3/39  | (7.7%)  |
| <i>H. influenzae</i> and <i>M. catarrhalis</i> | 9/39  | (23.1%) |
| <i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i>  | 0/39  | (0%)    |
| <i>S. pneumoniae</i> and <i>M. catarrhalis</i> | 0/39  | (0%)    |

- Rydquist-White, K.W. Anderson, R.M. Wadowsky, D.R. Reagan, E.S. Walker, L.A. Kinsley, A.E. Magit, and G.D. Erlich. 1995. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA*. 273, 1598-1604.
9. Senturia, B.H., C.F. Gessart, C.D. Carr, and E.S. Baumann. 1958. Studies concerned with tubotympanitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 67, 440-467.
10. Ueyama, T., Y. Kurono, K. Shirabe, M. Tabeshita, and G. Mogi. 1995. High incidence of *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal secretions and middle ear effusion as detected by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1835-1838.

(Received July 24, 2002 /accepted December 12, 2002)

**ABSTRACT : Molecular Biological Identification of Bacteria in Middle Ear Effusion Using 16S rDNA Multiplex PCR**

**Chung Ku Rhe<sup>1,3</sup>, In Suk Lee<sup>1,2</sup>, Ji Youn Park<sup>1</sup>, Sang Oun Jung<sup>1</sup>, and Chung-Hun Oh<sup>1\*</sup>**  
 (<sup>1</sup>Medical Laser Research Center, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea, and <sup>3</sup>Department of Otolaryngology Head-neck Surgery, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea)

The rapid and reliable 16S rDNA multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay was established to characterize bacterial etiologies of middle ear effusion. These etiologies included *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae*, which were detected in middle-ear effusion (MEE) samples taken from patient with otitis media. A total of 39 MEE samples were aspirated from 26 patients. DNA was extracted from MEE samples, and PCR was done with DNA extracts by using the common primers, which is localized at C4 region in the 16S rDNA gene of all bacterial species, and species-specific primers: (i) *Haemophilus*-specific primer, (ii) *Moraxella*-specific primer, and (iii) *Streptococcus*-specific primer. Among 39 samples tested, 24 (61.5%) were positive for *H. influenzae*, 10 (25.6%) were positive for *M. catarrhalis*, 3 (7.7%) were positive for *S. pneumoniae*, and 11 (28%) were negative for 16S rDNA multiplex PCR reaction. Nine samples (28.6%) exhibited a mixed infection and were positive for both *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. We suggested that 16S rDNA multiplex PCR is a useful method to identify rapidly for rapid identification of the pathogenic bacteria and characterization of bacterial etiologies of middle ear effusion.