

소아의 세균성 호흡기감염의 진단을 위한 Seeplex™ Pneumobacter Multiplex PCR 키트의 평가

박주원 · 김재경 · 임인수 · 김종완

단국대학교병원 진단검사의학과

Evaluation of Seeplex™ Pneumobacter Multiplex PCR Kit for the Detection of Respiratory Bacterial Pathogens in Pediatric Patients

Joowon Park, M.D., Jae Kyoung Kim, M.T., Insoo Rheem, M.D., and Jongwan Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital, Cheonan, Korea

Background : Rapid identification of the causative agent among potential bacterial and viral pathogens is important for the management of acute respiratory disease. In this study, we evaluated the analytical performance and clinical usefulness of a recently-introduced multiplex PCR assay, Seeplex™ Pneumobacter detection kit (Seegene Inc., Korea) for the identification of respiratory bacterial pathogens.

Methods : One hundred and eighty one nasopharyngeal aspirates were collected from pediatric patients with respiratory symptoms and analysed by multiplex PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* (S.P), *Haemophilus influenzae* (H.I), *Mycoplasma pneumoniae* (M.P), *Chlamydia pneumoniae* (C.P), *Bordetella pertussis* (B.P) and *Legionella pneumophila* (L.P). A comparison of multiplex PCR with conventional culture for the isolation of S.P and H.I was performed on 112 specimens. The cross reactivity of multiplex PCR was also evaluated.

Results : Of 181 cases, 81 cases were positive by multiplex PCR (44.8%): 52 cases for S.P (28.7%), 47 cases for H.I (26.0%), 9 cases for M.P (5.0%), 3 cases for B.P (1.7%) and 1 case for C.P (0.6%) including multiple infection cases. The agreement rates between multiplex PCR and culture for S.P and H.I were 92.9% (kappa index=0.84, $P<0.001$) and 91.1% (kappa index=0.75, $P<0.001$), respectively. There was no cross reactivity with common bacterial and viral pathogens.

Conclusions : Seeplex™ Pneumobacter detection kit could be a useful screening tool for the rapid detection of respiratory bacterial pathogens. Further studies with lower respiratory tract specimens would be needed for the clinical evaluation of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* detected by multiplex PCR. (*Korean J Lab Med* 2009;29:307-13)

Key Words : Multiplex PCR, Respiratory infection, *Mycoplasma pneumoniae*

서론

Received : March 19, 2009
Revision received : July 9, 2009
Accepted : July 10, 2009

Corresponding author : Joowon Park, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital, 16-5 Anseo-dong, Cheonan 330-715, Korea
Tel : +82-41-550-7033, Fax : +82-41-550-7055
E-mail : bjwon@hitel.net

Manuscript No : KJLM09-041

급성 호흡기 감염증은 소아에서 흔히 발생하는 질환으로 대부분 경미한 증상을 보이거나 환자상태에 따라서는 입원을 요하는 중증의 호흡기 질환을 유발하기도 한다[1]. 세균성 호흡기감염은 바이러스성 감염에 비하여 발생빈도는 적으나 치료에는 흔히 경

협적 항생제요법이 사용되므로 질환초기의 신속한 감별진단이 중요하다. 특히 소아에서 심각한 임상양상을 나타낼 수 있는 지역사회 획득 폐렴(community-acquired pneumonia, 원외폐렴)의 경우 주요 세균성 원인으로는 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* 및 *Chlamydia pneumoniae* 등이 알려져 있으나, 증상이 대체로 유사하고 중복감염이 흔하여 상당 예에서는 원인균의 진단이 어렵고 임상적으로 바이러스성 감염과의 감별도 용이하지 않다[2-4]. 따라서 진단을 위해서는 검사실적 동정이 중요한데 미생물학적 검사를 위한 흉막액(pleural fluid) 등의 하기도 검체의 채취는 통상적으로 시행하기에는 부적절하며, 혈액배양검사는 민감도가 떨어지고 최종 동정까지 시간이 소요된다. 또한 *M. pneumoniae*와 같이 배양이 까다로운 균주의 경우 임상에서 많이 의뢰하는 혈청학적 검사는 항체의 비특이적인 증가를 보일 수 있고, 회복기 혈청과의 비교가 필요하므로 적절한 치료 시기를 놓칠 수 있는 제한점이 있다[5].

중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 분자유전학적 진단법은 호흡기감염을 유발하는 바이러스 및 세균의 조기검출을 가능하게 함으로써 전통적인 검사법의 단점을 보완할 수 있다. 특히 다중(multiplex) PCR법은 여러 종류의 감염균을 동시에 검사할 수 있어서 다양한 원인균을 신속하게 감별해야 하는 호흡기 감염질환의 진단에 유용하다[6-10]. 최근에 소개된 Seeplex™ Pneumobacter detection 키트(Seegene Inc., Seoul, Korea)는 dual priming oligonucleotide (DPO) 기법을 이용한 다중 PCR 검사법으로 *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Bordetella pertussis* 및 *Legionella pneumophila* 등의 6가지 호흡기 감염균을 동시에 검출한다. 본 연구에서는 호흡기 증상으로 입원한 소아환자를 대상으로 Pneumobacter multiplex PCR 키트의 진단적 유용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

2008년 3월부터 12월까지 호흡기 증상을 주소로 단국대학교 병원에 내원하여 호흡기 감염균 다중 PCR 검사가 의뢰된 소아환자의 비인두흡인액(nasopharyngeal aspirates) 181검체를 대상으로 분석하였다. 검체는 DNA 추출 전까지 4°C에 보관하였고 추출한 DNA는 검사 실시 전까지 -70°C에 보관하였다.

2. 방법

1) 다중 PCR

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 비인두흡인액 300 μ L에서 DNA 30 μ L를 추출하였고, Seeplex™ Pneumobacter Detection 키트를 이용하여 PCR 반응액 20 μ L (DNA 3 μ L, 5 \times Pneumobacter primer 4 μ L, 8-methoxypsoralen 3 μ L, 2 \times Multiplex Master Mix 10 μ L)를 제조하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에서 15분 반응 후 94°C 30초, 60°C 1.5분, 72°C 1.5분의 반응을 40회 반복하였고 최종 연장반응을 72°C에서 10분간 시행하였다. PCR 결과물 5 μ L를 덜어내어 ethidium bromide를 포함한 2% 아가로오즈겔에서 전기영동하였고 marker DNA와 비교하여 개별 균주의 밴드유무를 판독하였다(Fig. 1). 검사에 사용된 표적유전자의 특징에 대해서는 Table 1에 정리하였다.

2) 다중 PCR의 교차반응 평가

표준균주와 임상검체에서 분리한 21종의 바이러스 및 세균 균주를 이용하여 다중 PCR법의 교차반응성을 평가하였다.

3) 호흡기 바이러스 PCR

대상군 중 128명에 대해서는 호흡기 바이러스 다중 역전사

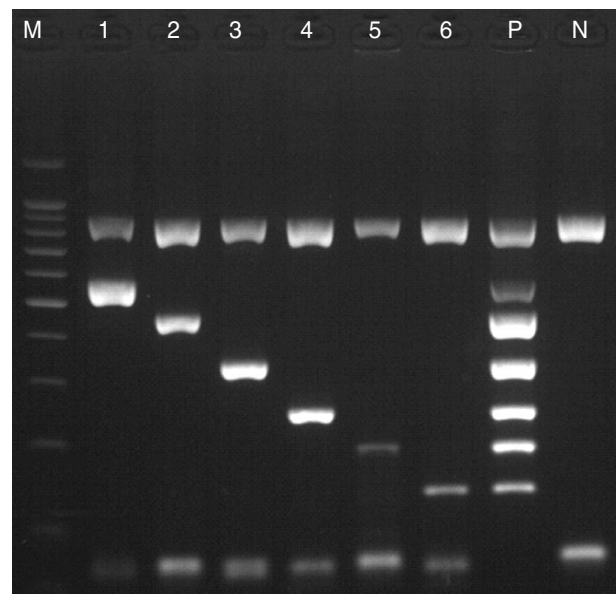


Fig. 1. Multiplex PCR products of six positive samples. M, 100 bp DNA ladder; lane 1, *M. pneumoniae* (583 bp); lane 2, *L. pneumophila* (472 bp); lane 3, *S. pneumoniae* (350 bp); lane 4, *H. influenzae* (257 bp); lane 5, *B. pertussis* (200 bp), lane 6, *C. pneumoniae* (146 bp); P, positive control ladder; N, negative control.

(reverse transcriptase) PCR 검사가 함께 의뢰되었으며, See-plex™ RV Detection 키트(Seegene Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다[9].

4) 미생물 검사

대상검체 중 추가검사가 가능했던 112검체는 혈액천배지와 chocolate 배지에 접종하여 24시간 배양 후 생화학적 검사와 VITEK II (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA)를 이용해서 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae* 동정검사를 시행하였고, 혈액배양검사가 의뢰된 106명에 대해서는 BacT/Alert 자동혈액 배양기(bioMérieux)를 이용하여 검사를 실시하였다.

5) *M. pneumoniae* 혈청학적 검사

대상군 중 98명에 대하여 *M. pneumoniae* 항체검사가 의뢰되었고, Serodia-MycoII 키트(Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)

를 이용한 입자응집(particle agglutination)법으로 시행하였다. 양성 판정기준은 제조사의 지침에 따라 단일혈청 항체가 1:40 이상인 경우 혹은 급성기 혈청과 회복기 혈청간에 4배 이상의 항체가 증가를 보인 경우로 하였다.

6) 통계

통계분석에는 SPSS version 15.0 K (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

결 과

1. 다중 PCR 결과

총 181검체 중 81예(44.8%)에서 다중 PCR 결과가 양성이었다. 중복양성을 포함한 *S. pneumoniae* 양성은 52예(28.7%)이었으며, *H. influenzae*와 *M. pneumoniae* 양성은 각각 47예(26.0%)와 9예(5.0%)이었다. *B. pertussis*와 *C. pneumoniae*

Table 1. Target genes used in multiplex PCR

| Organism | Target gene | Amplicon size (bp) | Accession No. |
|-----------------------|---|--------------------|---------------|
| <i>S. pneumoniae</i> | Pneumolysin (<i>ply</i>) | 350 | NC000912 |
| <i>H. influenzae</i> | Outer membrane protein (<i>P6</i>) | 257 | NC007146 |
| <i>M. pneumoniae</i> | 16S-23S rRNA intergenic spacer (<i>ITS1</i>) | 583 | NC000912 |
| <i>C. pneumoniae</i> | Major outer membrane protein (<i>ompA</i>) | 146 | NC000922 |
| <i>L. pneumophila</i> | Macrophage infectivity potentiator (<i>mip</i>) | 472 | NC009494 |
| <i>B. pertussis</i> | Outer membrane protein (<i>prn</i>) | 200 | NC002929 |

Abbreviations: *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*; *M. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*; *C. pneumoniae*, *Chlamydomydia pneumoniae*; *L. pneumophila*, *Legionella pneumophila*; *B. pertussis*, *Bordetella pertussis*.

Table 2. Results of analysis on 181 nasopharyngeal aspirates by multiplex PCR

| Organisms isolated | Positive N (%) |
|---|----------------|
| <i>S. pneumoniae</i> (S.P) | 23 (12.7%) |
| <i>H. influenzae</i> (H.I) | 20 (11.0%) |
| <i>M. pneumoniae</i> (M.P) | 6 (3.3%) |
| <i>C. pneumoniae</i> (C.P) | 1 (0.6%) |
| <i>B. pertussis</i> (B.P) | 2 (1.1%) |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> | 25 (13.8%) |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>M. pneumoniae</i> | 1 (0.6%) |
| <i>S. pneumoniae</i> + <i>B. pertussis</i> | 1 (0.6%) |
| <i>S. pneumoniae</i> +H.I+M.P | 2 (1.1%) |
| Total | 81 (44.8%) |

Abbreviations: See Table 1.

Table 3. Analytical specificity of multiplex PCR with 21 different microorganisms

| Organism | ATCC No. | PCR result | Organism | ATCC No. | PCR result |
|-----------------------------------|------------|------------|------------------------------|------------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 700699D-5 | (-) | <i>Chlamydia trachomatis</i> | VR-1500 | (-) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 35984D-5 | (-) | Influenza A | VR-544 | (-) |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | BAA-611D | (-) | Influenza B | VR-101 | (-) |
| <i>Streptococcus mitis</i> | KCTC 13047 | (-) | PIV 1 | VR-1380 | (-) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 700721D-5 | (-) | Rhinovirus A | VR-1131 | (-) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 700324D | (-) | RSV A | VR-26 | (-) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 47085D | (-) | hMPV | Korean isolation | (-) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 14041 | (-) | CoV OC43 | VR-11558 | (-) |
| <i>Haemophilus aphrophilus</i> | KCCM 41597 | (-) | CoV 229E | VR-740 | (-) |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | KCTC 5485 | (-) | Human gDNA | | (-) |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 33530D | (-) | Plasmid vector | | (-) |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | 23114D | (-) | | | |

Abbreviations: PIV, parainfluenza virus; RSV, respiratory syncytial virus; hMPV, human metapneumovirus; CoV, coronavirus.

는 각각 3예(1.7%)와 1예(0.6%)에서 검출되었고, *L. pneumophila*는 양성 예가 관찰되지 않았다(Table 2).

2. 다중 PCR의 교차반응평가 결과

호흡기감염의 흔한 원인 바이러스와 세균 및 검출 대상균과 유사한 균주 등에 대한 다중 PCR법에서 교차반응은 관찰되지 않았다(Table 3).

3. 호흡기 바이러스 PCR 결과

호흡기 바이러스 다중 역전사 PCR 검사를 함께 시행한 128예 중 세균 PCR 양성인 검체에서 호흡기바이러스가 양성인 경우는 47예(36.7%)이었다. *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 중복 양성 환자에서 human metapneumovirus (hMPV)가 같이 발견된 경우가 5예로 가장 많았으며, 바이러스 단독양성은 30예

Table 4. Results of multiplex PCR for potential respiratory bacterial and viral pathogens

| Respiratory viruses | S.P | S.P+H.I | H.I | S.P+H.I+M.P | M.P | B.P | Virus only |
|---------------------|-----|---------|-----|-------------|-----|-----|------------|
| Influenza A | 3 | 1 | 1 | | | | 8 |
| Influenza B | 1 | 3 | 2 | | | | 3 |
| PIV 1 | | | 1 | | | | 1 |
| PIV 2 | | | 1 | | | | |
| PIV 3 | | | 2 | | | | |
| RSV A | 3 | 2 | 1 | | 2 | | 3 |
| RSV B | 2 | 2 | 1 | | | | 5 |
| Adenovirus | 2 | | 1 | 1 | | | 4 |
| Rhinovirus | 2 | 1 | 3 | | 1 | | 4 |
| hMPV | | 5 | 1 | | | | 1 |
| CoV 229E | | 1 | | | | 1 | |
| CoV OC43 | | | | | | | 1 |
| Total | 13 | 15 | 14 | 1 | 3 | 1 | 30 |

Abbreviations: See Table 2, 3.

Table 5. Comparison of multiplex PCR and conventional culture method for the detection of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* in 112 patients

| Culture | Multiplex PCR | | N of concordance | Kappa | P |
|----------------------|---------------|------------|------------------|-------|--------|
| | + | - | | | |
| <i>S. pneumoniae</i> | | | | | |
| + | 34 (30.4%) | 0 (0.0%) | | | |
| - | 8 (7.1%) | 70 (62.5%) | 104 (92.9%) | 0.84 | <0.001 |
| <i>H. influenzae</i> | | | | | |
| + | 21 (18.8%) | 0 (0.0%) | | | |
| - | 10 (8.9%) | 81 (72.3%) | 102 (91.1%) | 0.75 | <0.001 |

(23.4%)에서 관찰되었다(Table 4).

4. 미생물검사 결과

대상군 중 112예에서 시행한 배양검사 결과 *S. pneumoniae*는 34검체(30.4%), *H. influenzae*는 21검체(18.8%)에서 각각 양성이었다. 배양양성 검체는 모두 다중 PCR에서도 양성으로 나온 예였으며, PCR과 배양검사간의 일치율은 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*에서 각각 92.9% 및 91.1%이었다(Table 5). 혈액배양 결과는 검사를 시행한 106예 중 3예에서 양성이었으며 *S. pneumoniae*가 2예, *Staphylococcus epidermidis*가 1예에서 분리되었다. *S. pneumoniae* 양성 2예는 PCR과 배양검사에 서도 모두 *S. pneumoniae*가 동정된 경우였으며, *S. epidermidis*가 분리된 1예는 오염으로 해석하였다.

5. *M. pneumoniae* 혈청학적 검사 결과

대상군 중 98명에 대해 시행한 *M. pneumoniae* 항체검사에서 양성인 경우는 48명(49.0%)이었다. 다중 PCR 결과에서 *M. pneumoniae* 양성을 보인 9명 중 6명은 회복기 혈청과의 비교에서 항체가가 4배 이상 증가했거나 단일혈청에서 1:640 이상의 고항체가를 보였으나 나머지 3명은 항체 음성소견을 나타냈다. 항체검사에서 1:160 이상의 항체가를 보였으나 PCR에서 음성인 경우도 4예가 있었다.

6. PCR 양성군의 임상적 특징

다중 PCR 검사에서 양성을 보인 81명의 환자들의 의무기록을 후향적으로 조회하였다. 환자군의 평균 나이는 4.9세, 연령 분포

Table 6. Disease entities of positive cases by multiplex PCR

| Disease | Bacterial (single) | Bacterial (multiple) | Bacterial and viral | Total |
|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|-------|
| Pneumonia | 10 | 9 | 27 | 46 |
| Bronchiolitis | 4 | | 11 | 15 |
| Asthma exacerbation | 4 | 2 | 5 | 11 |
| Acute otitis media | 1 | | 1 | 2 |
| FUO | 1 | | 1 | 2 |
| Pertussis | 1 | | 1 | 2 |
| Acute tonsillitis | 1 | | | 1 |
| Croup | | | 1 | 1 |
| Sinusitis | 1 | | | 1 |
| Total | 23 | 11 | 47 | 81 |

Abbreviation: FUO, fever of unknown origin.

는 생후 18일부터 16세까지였고, 남자가 46명, 여자가 35명이었다. 임상 진단명은 폐렴이 46예(56.8%), 급성 세기관지염이 15예(18.5%), 급성천식의 악화가 11예(13.6%), 백일해, 급성 중이염 및 불명열이 각각 2예(2.5%), 크룹, 급성 편도염 및 부비동염이 각각 1예(1.2%)이었다(Table 6).

고 찰

본 연구에서 폐렴환자 46예 중 *M. pneumoniae*가 원인으로 진단된 경우는 8예였으며, 이 중 6예는 다중 PCR에서 양성으로 나온 경우였다. PCR 양성 5예는 *M. pneumoniae* 항체검사에서 항체가 4배 이상 증가했거나 단일혈청에서 1:640 이상의 고항체가를 보였으나, 나머지 1예는 항체음성이었다. 항체음성인 1예는 다중 PCR에서 *M. pneumoniae*가 단독양성으로 나온 환자였으며 clarithromycin 치료에도 잘 반응하여 *M. pneumoniae* 폐렴으로 진단된 경우였다. 대상군 중 PCR 음성이나 항체가 1:160인 경우가 1예, 1:320인 경우가 3예가 있었는데, 이 중 항체가 1:320의 2예는 임상적으로 *M. pneumoniae*를 원인으로 의심하고 치료를 시행한 경우였다. 실제 임상에서는 많은 경우 단일 혈청검사에서 고항체가를 보인 경우에 *M. pneumoniae* 감염으로 간주하고 치료를 시행하고 있으나[11], 연구보고에 의하면 호흡기 증상이 없는 건강인에서도 1:160 내지는 1:320의 항체가 관찰될 수 있어 입자응집법을 이용한 단일혈청 항체가만으로는 *M. pneumoniae* 현증감염을 진단하기에는 무리가 있음을 시사한다[12, 13]. 본 연구에서는 대상군 중 5예에서만 회복기 혈청에 대한 비교검사가 가능했던 관계로 PCR 결과와 혈청학적 검사와의 상관성을 규명하기는 어려우며, 다만 검체의 종류에 따라 *M. pneumoniae* PCR 검사의 민감도에 차이가 있다는 연구보고가 있어[14] 추후 다양한 검체를 이용한 비교검사의 시행도 의미가 있을 것으로 사료된다.

*C. pneumoniae*의 일차감염은 소아에서 비교적 흔하며 원외 폐렴의 원인 중 약 10%를 차지하고 있어 급성 호흡기감염이 의심되는 소아환자에서 감별해야 할 주요 균주 중 하나이다[15]. *L. pneumophila*는 주로 면역기능이 저하된 환자에서 기회감염을 유발하는 것으로 알려져 있으나, 최근에는 원외폐렴의 원인균으로도 주목받고 있는데 특히 레지오넬라 폐렴의 경우 사망률이 높아 조기진단이 중요하다[16]. 이들 균주는 미생물적 동정이 용이하지 않고 혈청학적 검사 또한 시간이 소요되며 현감염을 반영하지 못하는 등의 제한점이 있으므로[5, 15], 기존의 검사들에 비하여 민감도가 높고 신속하게 결과를 볼 수 있는 분자유전학적 검사가 진단에 유용할 것으로 기대되는데 본 연구에서

C. pneumoniae 양성은 1예만 있었고 *L. pneumophila*의 경우는 양성 예가 관찰되지 않았다. *C. pneumoniae* 양성 예는 생후 1개월된 여아로서 급성 세기관지염 의증하에 내원하여 검사시행 후 타원으로 전원한 경우였으며, 호흡기 바이러스 PCR 검사는 시행하지 않았다. 연구보고에 의하면 비인두검체에서 *C. pneumoniae*와 *L. pneumophila*의 PCR 양성률이 상대적으로 낮은 것으로 나와[7, 17] 본 연구에서 이들 군주가 낮은 양성률을 보인 원인 중 하나로 생각된다. 대상군 중 8명에 대하여 실시한 NOW™ *Legionella* 소변 항원검사(Binax, Scarborough, ME, USA)에서도 양성 예는 관찰되지 않았다(자료 미제시).

B. pertussis 감염은 백신을 접종하지 않은 유아에서 가장 흔하나 청소년 및 성인에서도 잦은 기침을 주소로 하는 호흡기질환을 유발하기도 한다[18]. 본 연구에서 *B. pertussis* 양성 3명은 모두 생후 3개월 미만의 환아로서 백일해 예방접종은 시행하지 않은 경우였는데 그 중 2명은 임상적으로 백일해로 진단받고 azithromycin 치료로 호전되었으며, 1명은 급성 세기관지염 의증으로 내원하여 검사를 시행한 직후 타원으로 전원한 예였다. 백일해 진단을 받은 환자 2명은 모두 다중 PCR에서 *B. pertussis*가 단독으로 검출된 경우였다. 다중 PCR에서 검출된 *B. pertussis* 균주의 염기서열분석을 시행한 결과 GenBank 등록균주와 100%의 일치율을 보였다(GenBank No. EF486277.1).

하부 호흡기감염의 미생물학적 진단을 위한 검체로는 흉막액, 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage, BAL) 내지는 기관지경 흡인액(bronchoscopy secretions) 등이 가장 적합하겠으나 이러한 침습적인 검체를 통상적으로 채취하기는 여의치 않으며, 객담의 경우 특히 유소아에서는 적절한 검체를 얻기 어려운 단점이 있다. 소아환자에서는 검체의 수집이 용이한 비인두 흡인액이 미생물검사를 위한 검체로 흔히 의뢰되는데 이를 이용한 다중 PCR 검사는 호흡기감염이 의심되는 소아환자의 신속한 선별검사로써 유용할 수 있으나 *S. pneumoniae*나 *H. influenzae*와 같은 상주균의 경우 결과해석의 제한점이 있는 것 또한 사실이다. 실제 본 연구에서 다중 PCR 검사를 시행한 예는 주로 비정형 감염균에 대한 선별검사의 목적으로 의뢰한 경우였으며, *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 양성결과에 대해서는 대부분의 경우 환자의 임상증상과 관련하여 진단적 가치를 부여하지는 않았다. 그러나 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*는 환자의 상태에 따라서는 상기도감염 외에 하기도감염을 유발하기도 하며, 특히 원외폐렴의 주요 원인균으로 알려져 있어 호흡기 증상으로 내원하는 환자에서 이들 균주의 감별진단 역시 중요한 것이므로[19-21] 향후 하기도검체를 이용한 추가연구가 다중 PCR 검사의 임상적 유용성을 평가하는데 필요할 것으로 생각된다.

세균 PCR 양성인 검체에서 호흡기 바이러스가 양성되었던 경우는 47예(36.7%)로 소아의 비인두흡인액 검체를 대상으로 한 이전 연구결과와 유사한 양성률을 보였는데[22], 그 중 세균 PCR 검사에서 *M. pneumoniae*가 검출된 4예 및 *B. pertussis*가 검출된 1예는 임상적으로 세균성 원인으로 진단된 경우였다. 많은 예에서 감염의 주원인을 감별하기는 용이하지 않았으나 바이러스의 선행감염이 폐렴의 발생기전에 관여하는 것으로 알려져 있고[23], 바이러스의 경우 대개는 특정 유행시기가 있으므로 호흡기 감염환자의 선별검사로 호흡기 세균과 바이러스의 PCR 검사를 함께 시행하는 것은 임상에서 치료지침을 결정 내지는 변경할 경우 고려할 수 있는 일차적인 정보를 제공한다는 점에서 도움이 될 것으로 생각된다.

다중 PCR 검사에서 이용된 DPO 기법은 polydeoxyinosine linker가 연결하는 길이가 서로 다른 두 부위로 이루어진 시발체를 사용하는 것이 특징인데 18-25 bp의 5' 부위는 검출하고자 하는 균주의 목표염기서열과의 결합을 촉진시키고, 6-12 bp의 3' 부위는 나머지 목표부위와의 결합을 통해 증폭반응을 진행시킴으로써 민감도와 특이도를 향상시킨 것으로 보고된 바 있다[24]. 본 연구에서 다중 PCR법은 배양결과와의 높은 일치율을 나타내었고, 다양한 종류의 바이러스와 세균 균주에 대한 교차반응성 평가에서도 만족할 만한 분석 특이도를 보였다.

결론적으로 Seeplex™ Pneumobacter Detection 키트를 이용한 다중 PCR 검사는 호흡기 감염균의 신속한 검출을 위한 선별검사로써 유용하리라 생각되며, 호흡기 환자의 치료지침의 결정에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

배경 : 급성 호흡기 감염에서 원인균의 신속한 진단은 환자의 적절한 치료를 위하여 중요하다. 저자들은 최근 소개된 Seeplex™ Pneumobacter Detection 키트(Seegene Inc., Korea)를 이용한 다중(multiplex) PCR 검사의 진단적 유용성을 평가하고자 하였다.

방법 : 소아 호흡기 환자 181명의 비인두흡인액 검체를 이용하여 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* 및 *Legionella pneumophila* 등의 6가지 호흡기 감염균에 대한 다중 PCR 검사를 실시하였다. 대상군 중 112검체에 대해서는 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae* 배양 검사를 시행하여 PCR 결과와 비교하였고, 다중 PCR 검사의 분석특이도 검증을 위하여 교차반응성을 평가하였다.

결과 : 총 대상군 181명 중 81명(44.8%)에서 다중 PCR 결과가 양성이었다. 중복감염을 포함한 양성 예는 *S. pneumoniae*가 52명(28.7%), *H. influenzae*가 47명(26.0%), *M. pneumoniae*가 9명(5.0%), *B. pertussis*가 3명(1.7%), 그리고 *C. pneumoniae*가 1명(0.6%)이었다. 배양검사와의 일치율은 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*에서 각각 92.9% (kappa index=0.84, $P<0.001$) 및 91.1% (kappa index=0.75, $P<0.001$)이었다. 호흡기 감염의 흔한 원인 바이러스와 세균에 대한 다중 PCR법의 교차반응은 관찰되지 않았다.

결론 : Seeplex™ Pneumobacter Detection 키트는 호흡기 감염균의 신속한 검출을 위한 선별검사로써 유용할 것으로 생각된다. 이후 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae* 양성 결과의 임상적 해석을 위한 하기도검체를 이용하는 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Leowski J. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. World Health Stat Q 1986;39: 138-44.
2. McCracken GH Jr. Diagnosis and management of pneumonia in children. Pediatr Infect Dis J 2000;19:924-8.
3. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Mutha SS, Sankey SS, Weissfeld LA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. JAMA 1996;275:134-41.
4. Ostapchuk M, Roberts DM, Haddy R. Community-acquired pneumonia in infants and children. Am Fam Physician 2004;70:899-908.
5. Fedorko DP, Emery DD, Franklin SM, Congdon DD. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay system for serologic diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 23:85-8.
6. Wang Y, Kong F, Yang Y, Gilbert GL. A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization (mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia. Pediatr Pulmonol 2008;43:150-9.
7. Miyashita N, Saito A, Kohn S, Yamaguchi K, Watanabe A, Oda H, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. Respir Med 2004;98:542-50.
8. Strålin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influen-*

- zae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* to be used on sputum samples. APMIS 2005;113:99-111.
9. Sung H, Park SJ, Woo YD, Choi BH, Kim MN. Evaluation of Seeplex RV detection kit for detecting rhinovirus, human metapneumovirus, and coronavirus. Korean J Lab Med 2008;28:109-17. (성홍섭, 박숙자, 우영대, 최병후, 김미나. Rhinovirus, human metapneumovirus, coronavirus 검출을 위한 Seeplex™ RV Detection 키트의 평가 대한진단검사의학회지 2008;28:109-17.)
 10. Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. J Virol Methods 2009;156:111-6.
 11. Waites KB and Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004;17:697-728.
 12. Choi SK, Jung JA, Kim KH, Kim GH. Study of seroprevalence of antimycoplasma antibody in healthy children and its diagnostic value. J Korean Pediatr Soc 1998;41:489-97. (최수경, 정지아, 김경효, 김경희. 건강한 소아에서 Mycoplasma 항체가의 분포 및 이의 진단적 유용성에 관한 연구. 소아과 1998;41:489-97.)
 13. Bae SM, Jang MJ, Song HJ, Jeon DY, Kweon SS, Kang YH. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies in healthy residents of Jeonnam Province. Korean J Clin Microbiol 2007;10:109-13. (배송미, 장미정, 송현제, 전두영, 권순석, 강연호. 전남지역 주민에서 마이코플라스마 폐렴에 대한 항체가 분포. 대한임상미생물학회지 2007;10:109-13.)
 14. Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. J Med Microbiol 2005;54:287-91.
 15. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995;8:451-61.
 16. Benson RF and Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. Semin Respir Infect 1998;13:90-9.
 17. Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. J Infect Dis 1997;175:1523-6.
 18. Hindiyyeh M and Carroll KC. Laboratory diagnosis of atypical pneumonia. Semin Respir Infect 2000;15:101-13.
 19. Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis 1980;142:923-33.
 20. Mandell LA, Marrie TJ, Grossman RF, Chow AW, Hyland RH. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. The Canadian Community-Acquired Pneumonia Working Group. Clin Infect Dis 2000;31:383-421.
 21. Menéndez R, Córdoba J, de La Cuadra P, Cremades MJ, López-Hontagas JL, Salavert M, et al. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1868-73.
 22. Nakayama E, Hasegawa K, Morozumi M, Kobayashi R, Chiba N, Iitsuka T, et al. Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. J Infect Chemother 2007;13:305-13.
 23. Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. N Engl J Med 1994;331:778-84.
 24. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. Nucleic Acids Res 2007;35:e40.