

Clinical Evaluation of the Multiplex PCR Assay for the Detection of Bacterial Pathogens in Respiratory Specimens from Patients with Pneumonia

Chae Lim Jung, Mi Ae Lee, Wha Soon Chung

Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Background: Community-acquired pneumonia (CAP) is a major infectious disease with significant morbidity and mortality worldwide. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* are common pathogens of CAP; however, the conventional methods used to detect these agents, including culturing, lack sensitivity and are time-consuming. We evaluated a recently developed multiplex PCR assay which can test these agents simultaneously.

Methods: One hundred patients with pneumonia and 99 healthy adults were tested using the Seeplex Pneumobacter ACE Detection assay (Seegene, Inc., Seoul, Korea). Culture and urinary antigen tests were also performed.

Results: In patients with pneumonia, the positive detection rates of PCR for *S. pneumoniae* and *H. influenzae* were 52.0% (52/100) and 30.0% (30/100), respectively, those of *M. pneumoniae* and *L. pneumophila* were 2.0% (2/100) and 1.0% (1/100), respectively, and *B. pertussis* and *C. pneumoniae* were not

detected. In healthy adults, the detection rates of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* revealed similar results, 53.5% (53/101) and 40.4% (40/101), respectively, and the other four pathogens were not detected. The sensitivity and specificity of PCR for *S. pneumoniae* in pneumonia patients were 100% (95% confidence interval [CI], 87.9~100%) and 65.7% (95% CI, 55.2~76.5%), respectively, according to the urinary antigen test and cultures of the respiratory samples and blood.

Conclusion: Differentiating *S. pneumoniae* and *H. influenzae* colonization from infection was difficult using the PCR assay. Therefore, the use of this assay is inappropriate for the diagnosis of pneumonia due to these agents, although multiplex PCR assay would be useful for the detection of *M. pneumoniae* and *L. pneumophila*. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:40-46)

Key Words: Multiplex PCR, Community-acquired pneumonia (CAP), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*

서 론

지역 사회 획득 폐렴은 전 세계적으로 유병률과 사망률이 높은 주요한 감염 질환 중의 하나이며, 우리나라도 예외가 아니다[1-4]. 따라서 적절한 치료를 신속히 수행하는 것이 사망률을 낮추고 사회적 비용을 감소시키는 데 중요하다. 이를 위해서는 정확한 원인균을 분리하는 것이 필요하나, 폐렴의 약 반 정도에서는 원인균이 동정되지 않는다는 보고들[2,3,5]에서 알 수 있듯이 배양 등의 전통적인 진단 검사법으로 원인균을 정확히 검출하는 것은 쉽지 않다. 또한 기존 방법은 예민도가 낮을 뿐

아니라 진단까지의 시간이 오래 소요된다. 이러한 단점을 극복하기 위해 새로운 검사법들이 계속 개발되고 있으며, 그 중에서도 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 원리를 이용한 분자 진단법이 대표적으로 민감도가 높고 보다 신속하고 정확한 진단이 가능하여 사용이 기대되고 있다[6].

최근에 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* 및 *Bordetella pertussis* 등의 6가지 균주를 한꺼번에 검사할 수 있는 다중 PCR 검사가 개발되었다. 이들 균주들은 지역 사회 획득 폐렴의 가장 흔한 원인균들이다[1-3,7]. 그러나 일반적인 배양 검사로 검출하기 어려워 민감도가 높은 분자 진단 방법이 유용할 것으로 기대된다[8].

국내에서는 이제까지 폐렴의 원인균을 주로 배양 등의 전통적인 방법으로 검출해 왔으며, 실제 폐렴 환자를 분자 진단법으로 검사한 연구는 드물었다. 이에 본 연구에서는 폐렴 환자

Received 29 September, 2009, Revised 2 November, 2009
Accepted 20 December, 2009

Correspondence: Mi Ae Lee, Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University Mokdong Hospital, 911-1, Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-056, Korea. (Tel) 82-2-2650-5222, (Fax) 82-2-2650-5222, (E-mail) miae@ewha.ac.kr

의 호흡기 검체에서 다중 PCR 검사로 원인균들을 검출해 보고자 하였다. 또한 PCR 검사는 민감도가 높아 *S. pneumoniae* 같은 집락을 형성하는 균에서는 유용성이 떨어질 수 있으므로[5] 호흡기 질환이 없는 성인의 인후 검체에서 다중 PCR 검사를 시행해 결과를 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2008년 10월에서 2009년 4월까지 본원을 방문하여 다중 PCR 시스템인 Seeplex Pneumobacter ACE Detection assay (Seegene Inc., Seoul, Korea)를 시행한 폐렴 환자들 중 100명을 무작위로 선정하였다. 폐렴은 발열, 기침, 객담, 호흡곤란 및 청진상 수포음 등의 특징적인 임상 증상이 있고 흉부 방사선학적 소견상 폐침윤이 있는 경우로 정의하였다. 지역 사회 획득 폐렴 진단 시는 입원 후 3일 이상 경과한 경우와 내원 1주 전까지 입원한 과거력이 있는 경우는 제외하였다[2,3].

대조군으로 호흡기 질환의 증상이나 징후가 없는 정상인 99명을 선정하였다. 공고를 통해 피험자를 모집하여 모두 동의서를 받았고 본원 임상시험심사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 심의를 통과하였다.

폐렴 환자군의 평균 연령은 65.4±16.5세(26~91세)였고, 남자 60명, 여자 40명이었다. 지역 사회 획득 폐렴 환자가 92명으로 대부분이었고, 나머지 8명은 입원 중 폐렴이 발생한 경우였다. 정상인군에서의 평균 연령은 30.6±9.4세(19~58세)였고, 남자 39명과 여자 60명이었다.

2. 연구 방법

폐렴 환자 100명 모두에서 호흡기 검체와 혈액 배양 검사, *S. pneumoniae*와 *L. pneumophila*에 대한 소변 항원 검사를 시행하였다. 호흡기 검체 종류는 객담 84예, 경기관 흡인액 12예, 기관지폐포세척액 2예, 기관지흡인액 1예, 흉수 1예 순이었고, 객담은 모두 저배율에서 상피세포가 25개 이하이고 호중구가 25개 이상인 양질의 객담이었다[9]. 정상인 99명에서는 인후면봉 검사를 시행하여 얻은 인후 검체로 다중 PCR 검사와 배양 검사를 동시에 시행하였다.

폐렴군과 정상인군에서 다중 PCR 검사, 소변 항원 검사 및 배양 검사에 대한 각 원인균들에 대한 양성률을 산출하여 서로 비교하였다. 또한 폐렴군에서 소변 항원 검사와 배양 검사를 기준으로 *S. pneumoniae*에 대한 다중 PCR의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 등을 산출하여 다중 PCR의 정확도를 평가하였다.

1) 배양: 환자의 호흡기 검체와 정상인의 인후 검체를 5% 면양 혈액을 포함한 혈액 한천 배지와 초콜릿 배지에 접종하여 35~37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 24시간과 48시간에

판독하였다. 특징적인 집락이 관찰되면 그람 염색을 하였고 *S. pneumoniae*의 경우 optochin 감수성 검사, *H. influenzae* 경우 X, V 인자 요구 시험 등을 시행하여 확인하였고 최종적으로 *S. pneumoniae*는 Vitek II ID-GP Card (bioMérieux, Durham, NC, USA), *H. influenzae*는 Vitek II ID-NH Card (bioMérieux)를 통해 균주를 동정하였다.

2) 소변 항원 검사: 면역크로마토그래피법 원리를 이용한 BinaxNOW 키트(Binax Inc., Scarborough, ME, USA)를 사용하여 검사하였다.

3) 분자 진단법: 다중 PCR을 포함한 전 과정은 Seeplex Pneumobacter ACE Detection assay (Seegene Inc.)를 이용하여 시행하였다. 이 진단법은 dual priming oligonucleotide (DPO) 기술을 사용해서 비특이적인 priming을 차단하여 민감도와 특이도를 높이는 원리를 이용하며, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* 및 *B. pertussis*의 6가지 균주를 동시에 검출할 수 있는 다중 PCR 검사 방법이다. 제조 회사에 따르면 *S. pneumoniae*는 *ply* 유전자, *H. influenzae*는 P6 유전자, *M. pneumoniae*는 ITS1 유전자, *C. pneumoniae*는 *ompA* 유전자, *L. pneumophila*는 *mip* 유전자, *B. pertussis*는 *prn* 유전자를 표적으로 한다. 검출한계는 10 copy/reaction (10 copy/3 μL DNA)이다.

(1) 검체 전처리: 객담을 포함한 호흡기 검체는 4% NaOH와 1:1로 혼합하여 1분간 vortex mixing 한 후 실온에서 15분간 정치시켰다. 1.5 mL를 새 용기에 옮겨 16,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 PBS 1 mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 10분간 16,000 g에서 원심분리한 후 상청액을 버리고, PBS 150 μL를 첨가 후 vortexing하였다.

(2) 다중 PCR: 모든 과정은 제조사의 지침대로 시행하였다. 핵산 추출은 Viral Gene-Spin, viral DNA/RNA 적출 키트 (Intron, Seoul, Korea)를 이용하여 시행하였다. 0.2 mL PCR 시험관에 PCR mastermix 17 μL를 준비하고 추출한 검체의 핵산 3 μL를 첨가하였다. GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Singapore, Singapore)에서 94°C에서 15분간 반응시킨 후 94°C에서 0.5분, 60°C에서 1.5분, 72°C에서 1.5분 반응시키는 과정을 40회 반복하였고 그 후 72°C에서 10분간 반응시켰다.

증폭 산물 5 μL를 etidium bromide를 포함한 2% agarose gel에서 전기영동 후 자외선을 조사하여 나타난 증폭 산물을 키트 내에 포함되어 있는 표지자와 비교하여 해석하였다. 각각 순서대로 583 bp, 472 bp, 350 bp, 257 bp, 200 bp, 146 bp는 *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *B. pertussis*, *C. pneumoniae*를 나타내었다(Fig. 1).

3. 통계 분석

통계프로그램인 SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc.,

Chicago, IL, USA)를 사용하여 비연속 변수 간의 비교를 위해 카이제곱 검정을 이용하였다. P value가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 폐렴균과 정상인군의 검사별 양성률

다중 PCR 검사 결과 폐렴균은 *S. pneumoniae*가 52.0% (52/100), *H. influenzae*가 30.0% (30/100)에서 양성이었다. 정상인군도 *S. pneumoniae*가 53.5% (53/99), *H. influenzae*가 40.4% (40/99)에서 양성으로 비슷한 결과를 보였고, 두 군에서 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 양성률에는 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$). 폐렴균에서 *M. pneumoniae*와 *L. pneumophila*는 PCR 검사의 각각 2.0% (2/100), 1.0% (1/100) 양성률을 나타냈고, *C. pneumoniae*와 *B. pertussis*는 검출되지 않았다. 정상인에

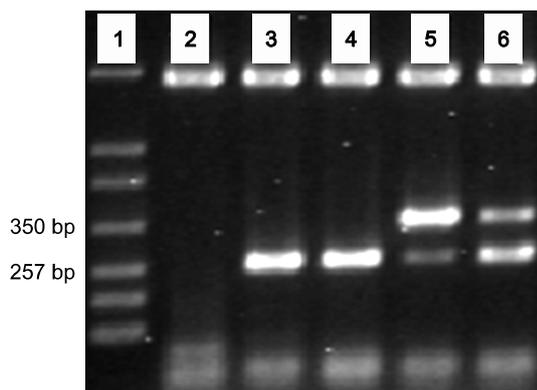


Fig. 1. The results for PCR products from the multiplex PCR on agarose gel. Lane 1, Molecular weight marker (350 bp band indicates *Streptococcus pneumoniae* and 257 bp band indicates *Haemophilus influenzae*); Lane 2, Negative; Lane 3 and 4, *H. influenzae*; Lane 5 and 6, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*.

Table 1. Results of multiplex PCR in patients with pneumonia (N=100) and healthy adults (N=99)

Tests	% of positivity		
	Pneumonia	Normal	P value*
Multiplex PCR			
<i>S. pneumoniae</i>	52.0	53.5	0.828
<i>H. influenzae</i>	30.0	40.4	0.124
<i>S. pneumoniae</i> & <i>H. influenzae</i>	22.0	20.2	0.756
<i>M. pneumoniae</i>	2.0	0.0	NT
<i>L. pneumophila</i>	1.0	0.0	NT
<i>B. pertussis</i>	0.0	0.0	NT
<i>C. pneumoniae</i>	0.0	0.0	NT

*Statistical analysis between patients with pneumonia and healthy adults by chi-square test showed no significant difference. Abbreviation: NT, not tested.

서 *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* 및 *B. pertussis*는 검출된 경우가 없었다(Table 1). *S. pneumoniae*에 대한 소변 항원 검사 결과 폐렴균의 19.0% (19/100)에서 양성으로 나타났다. 폐렴균에서 호흡기 검체 배양 결과 *S. pneumoniae*는 12.0% (12/100), *H. influenzae*는 2.0% (2/100)에서 검출되었다. 혈액 배양 검사에서는 *S. pneumoniae*가 4.0% (4/99)에서 양성이었다. 정상인군은 인후 배양 검사에서 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*가 검출된 경우가 없었다(Table 2).

2. 폐렴균에서 다중 PCR 검사의 민감도, 특이도, 양성 및 음성 예측도

폐렴균에서 *S. pneumoniae*의 다중 PCR 검사에 대한 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 호흡기 검체 배양 검사를 기준으로 했을 때는 100% (95% 신뢰구간, 75.8~100%), 54.5% (95% 신뢰구간, 44.2~64.5%), 23.1%, 100%, 소변 항원 검사, 호흡기 검체 및 혈액 배양 검사를 모두 고려했을 때는 100% (95% 신뢰구간, 87.9~100%), 66.7% (95% 신뢰구간, 55.2~76.5%), 53.8%, 100%였다(Table 3).

3. 폐렴균에서 검체별 *S. pneumoniae*의 검사법 비교

객담 검체인 경우 다중 PCR 검사와 소변 항원 검사의 일치율은 64.3%, 다중 PCR과 배양 결과의 일치율은 61.9%였고, 경기관지 흡인액 등 다른 호흡기 검체인 경우 각각 81.3%, 75.0%로 더 높은 일치율을 보였다(Table 4).

고 찰

폐렴을 진단하기 위한 전통적인 방법 중 이제까지 표준검사법으로 여겨지던 배양 검사는 시간이 많이 소요되고 약 절반 정도에서 원인 균주가 동정되지 않아 예민도가 떨어지는 단점

Table 2. Comparison of the urinary antigen test and cultures in respiratory specimens and blood for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among patients with pneumonia (N=100) and healthy adults (N=99)

Tests	% of positivity	
	Pneumonia	Normal
Urinary antigen for <i>S. pneumoniae</i>	19.0	NT
Urinary antigen for <i>L. pneumophila</i>	0.0	NT
Culture in respiratory specimen		
<i>S. pneumoniae</i>	12.0	0.0
<i>H. influenzae</i>	2.0	0.0
Blood culture		
<i>S. pneumoniae</i>	4.0	NT
<i>H. influenzae</i>	0.0	NT

Abbreviation: NT, not tested.

Table 3. Performance of multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae* in patients with pneumonia according to diagnostic methods

	Reference tests			
	Urinary antigen test	Respiratory specimen culture	Blood culture	Urinary antigen test or Culture
Sensitivity N, (%)	19/19 (100.0)	12/12 (100.0)	4/4 (100.0)	28/28 (100.0)
Specificity N, (%)	48/81 (59.3)	48/88 (54.5)	48/96 (50.0)	48/72 (66.7)
PPV N, (%)	19/52 (36.5)	12/52 (23.1)	4/52 (7.7)	24/52 (53.8)
NPV N, (%)	48/48 (100.0)	48/48 (100.0)	48/48 (100.0)	48/48 (100.0)

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 4. Concordance rate between multiplex PCR and culture for *Streptococcus pneumoniae* in patients with pneumonia according to clinical specimens

		% (N) of concordance	
		Urinary antigen test	Culture (Respiratory specimen or Blood)
Multiplex PCR	Sputum	64.3 (54/84)	61.9 (52/84)
	Other respiratory specimens	81.3 (13/16)	75.0 (12/16)
	TTA	83.3 (10/12)	83.3 (10/12)
	BAL	50.0 (1/2)	50.0 (1/2)
	Bronchial aspiration	100.0 (1/1)	0.0 (0/1)
	Pleural fluid	100.0 (1/1)	100.0 (1/1)
	Total	67.0 (67/100)	64.0 (64/100)

Abbreviations: TTA, transtrachial aspiration; BAL, bronchoalveolar lavage.

이 있다. 그 중 객담 배양 검사는 균동정 시 숙련된 경험을 요하고, 혈액 배양 검사는 민감도가 훨씬 낮다. 소변 항원 검사는 어른에서 유용할 것으로 여겨지나 소아에서는 *S. pneumoniae* 보균율이 높아서 유용성이 떨어진다[10,11]. 이에 반해 PCR 검사는 배양 검사보다 민감도가 높고, 신속한 진단이 가능하며 항균제 사용에도 영향을 적게 받고 적은 양으로도 검출이 가능한 장점이 있다. PCR 검사는 특히 *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* 및 *C. pneumoniae* 등 사람 호흡기에 집락을 잘 형성하지 않고 배양이 어려운 균의 검출에 유용할 것으로 여겨진다[5,8].

본 연구 결과, *S. pneumoniae*는 폐렴 환자의 52.0% (52/100)에서, *H. influenzae*는 30.0% (30/100)에서 다중 PCR 양성되었고, 정상인균의 인후 검체에서 시행한 다중 PCR 결과도 비슷하게 나타났다. Murdoch 등[12]의 연구에서도 폐렴 환자와 정상인의 인후 검체에 대한 PCR 검사 결과 각각 55%와 58%로 거의 차이가 나지 않았다. 또한 Strålin 등[13]도 폐렴이 아닌 대조군의 기관지폐포세척액에서 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 양성률이 각각 17%와 39%로 나타났다고 하였다. 따라서, 정상인의 PCR 양성 결과가 감염보다는 집락 형성을 더 반영하는 것으로 추정된다. *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 보균율은 성인에서 대략 3~36% 정도로 보고되고 있다[14-16]. 본 연구에서는 다중 PCR 검사로 호흡기 질환이 없는 성인에서도 40.4~53.5% 검출되는 것을 확인하였고 이는 기준에 배양 검사로 보고한 것보다 매우 높은 비율이다. Brugger 등[17]의 연

구에서도 *S. pneumoniae*의 집락형성 비율이 배양 검사로는 40.0%였는데 PCR 검사를 시행했을 때는 51.6%로 높아진 것을 볼 수 있다. 본 연구에서 정상인의 인후 배양 검사에서는 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*가 동정되지 않았는데 이는 배양조건이 까다롭고 다른 상재균이 많이 존재하여 검출되지 못했을 가능성이 있다.

본 연구와 다른 연구들[12,13]에서 폐렴이 아닌 대조군에서도 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 양성률이 높았던 것과 대조적으로, 다른 연구들은 감염 질환의 증거가 없는 성인의 비인두 검체에서 *S. pneumoniae*가 PCR 검사 결과 3~8%에서만 검출되었다고 보고하였고, *H. influenzae*에 대한 PCR 결과도 마찬가지로 폐렴군보다 정상군에서 적게 검출된다고 하였다[18,19]. 이와 같이 PCR 검사에 의한 *S. pneumoniae* 보균율 결과가 연구에 따라 다른 것은, 연구 대상의 특성이나 위험 요인, 진단 기준, 검사 방법, 검체 종류 등에 따라 결과가 큰 영향을 받기 때문에 각 연구마다 결과가 매우 다양할 수 있을 것으로 생각한다.

폐렴군에서 혈액 배양 검사를 기준으로 했을 때 *S. pneumoniae*에 대한 PCR 검사의 민감도는 29~100%, 객담 배양 결과 기준 시 민감도는 26~88% 정도로 보고되고 있다[5,12]. 본 연구에서 호흡기 검체와 혈액에 대한 배양 검사를 기준으로 했을 때, 다중 PCR 검사의 민감도는 모두 100%로 매우 높았고, 그에 비해 특이도는 50.0~54.5%로 낮았다. 소변 항원 검사, 호흡

기 검체 및 혈액 배양 검사를 모두 기준으로 했을 때 민감도는 역시 100%였고, 특이도는 66.7%로 상승하였다. PCR 검사가 매우 예민하므로 결과가 음성인 경우 *S. pneumoniae* 감염을 배제할 수 있으나, 양성일 경우에는 위양성의 가능성도 고려하여 해석에 주의할 필요가 있다.

위양성의 원인으로서는 앞에 언급한 집락 형성을 생각해 볼 수 있다. PCR 검사는 매우 민감하기 때문에, 현성 호흡기 질환이 없는 정상인에서 질환을 유발하지는 않을 정도의 적은 양이 존재하는 경우에도 검출될 가능성이 있다. 집락 형성과 감염과는 양에서 차이가 나기 때문에 대안으로 정량 PCR 검사법을 들 수 있다[20,21]. 다른 가능성으로는 PCR 검사의 표적 유전자에 따른 특이도의 차이를 생각해 볼 수 있다. 본 검사법은 *S. pneumoniae*는 *ply* 유전자를, *H. influenzae*는 P6 유전자를 표지자로 사용하였다. *ply* 유전자를 표지자로 이용했을 때, PCR 결과가 양성인 경우의 29% 정도가 *S. pneumoniae* 외 다른 병원균에 감염되어 있었다는 연구 결과가 있다[17]. 이를 방지하기 위해 보다 특이적인 PCR 탐색자가 필요할 것으로 생각한다. 최근 *lytA* 표지자를 사용해서 특이도를 향상시켰다는 보고가 있다[22]. *H. influenzae* 검사시는 P6 유전자를 단독으로 사용하는 것보다 P6 유전자와 16S rRNA 유전자를 함께 사용하는 것을 추천한 연구가 있다[8]. 한편, 본 연구에서와 같은 키트를 사용한 Park 등[23]의 연구에서는 다른 균주와의 교차반응은 없는 것으로 보고하여, 표지자의 특이도 문제보다는 집락 형성의 문제가 위양성의 주된 원인일 것으로 생각한다.

본 연구에서 *L. pneumophila*는 폐렴 환자 100명 중 1명에서 PCR 양성이었다. 환자는 유방암으로 수술 후 항암화학 치료 중이던 분으로, 소변 항원 검사는 음성이었으나 배양에서 다른 세균이 검출되지 않았고 1주일 만에 폐렴으로 사망한 경과를 보여 원인균으로 배제할 수는 없는 경우였다. *M. pneumoniae*는 폐렴 환자 100명 중 2명에서 PCR 양성이었었는데, 2명 다 *M. pneumoniae* IgM 항체가 음성이었다. 그러나 1예는 첫 검사 시보다 1주일 후 시행한 검사 시 혈청 IgG 항체가 277 U/mL에서 2,333 U/mL로 8배 상승하여 임상적으로 의심되는 경우였고 azithromycin으로 치료하였다. 다른 1예는 *M. pneumoniae* 항체 검사에서 혈청 IgG 항체가 524 U/mL로 양성이었었는데, 추적 검사를 시행하지 못하였다. *C. pneumoniae*와 *B. pertussis*는 검출된 경우가 없었다. 4균주 모두 정상인에서는 검출된 경우가 없었고, Kumar 등[18]의 연구에서도 감염 질환의 증거가 없는 성인의 비인두 검체에서 이 4가지 균주가 모두 검출되지 않아 다중 PCR 검사가 진단에 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서 다중 PCR 검사와 다른 검사 결과를 비교했을 때 검체가 객담인 경우의 일치율은 61.9~64.3%인데 비해 경기관지 흡인액 등 다른 호흡기 검체일 경우의 일치율은 75.0~81.3%로 더 높았다. 이로 보아 결과의 정확성을 높이기 위해서

는 객담보다는 상대적으로 오염이 적은 침습적 검체가 더 유용할 것으로 생각한다.

결론적으로, *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*에 대한 PCR 검사는 민감도가 우수하여 결과가 음성인 경우 감염을 배제할 수 있지만 정상 성인에서도 검출되어 결과가 양성인 경우 집락 형성과 감별이 어려워져 분자 유전 검사를 적용하기 적합하지 않다고 생각한다. *M. pneumoniae*와 *L. pneumophila*는 정상인에서 검출되지 않았고 배양하기도 어려워 다중 PCR 검사가 신속한 진단에 도움이 될 것으로 생각한다.

감사의 글

일부 검사키트와 자료를 제공해 주신 씨젠생명과학연구소와 연구 수행에 많은 도움을 주신 김경희, 이석준 임상병리사께 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious diseases society of America/American thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis 2007; 44(Suppl 2):S27-72.
- Song JH, Oh WS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Ko KS, et al. Epidemiology and clinical outcomes of community-acquired pneumonia in adult patients in Asian countries: a prospective study by the Asian network for surveillance of resistant pathogens. Int J Antimicrob Agents 2008;31:107-14.
- Woo JH, Kang JM, Kim YS, Shin WS, Ryu JH, Choi JH, et al. A prospective multicenter study of community-acquired pneumonia in adults with emphasis on bacterial etiology. Korean J Infect Dis 2001;33:1-7.
- Jung KS. Pneumonia in the elderly patients. Korean J Med 2008;75:129-40.
- Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. APMIS 2004;112:713-27.
- Chan YR, Morris A. Molecular diagnostic methods in pneumonia. Curr Opin Infect Dis 2007;20:157-64.
- Jeon BH, Kim M, Kim JH, Shin SY, Lee J. The etiologic agents and clinical outcomes of adult community-acquired pneumonia in Jeju. Tuberc Respir Dis 2009;66:358-64.
- Strålin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. APMIS 2005;113:99-111.
- Croft AC and Woods GL. Specimen Collection and Handling for Diagnosis of Infectious Diseases. In: McPherson RA and Pincus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed, Philadelphia; WB Saunders, 2007: 1188-203.
- Klugman KP, Madhi SA, Albrich WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2008;47(Suppl 3):S202-6.

11. Murdoch DR, Laing RT, Mills GD, Karalus NC, Town GI, Mirrett S, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3495-8.
12. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RT, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;41:63-6.
13. Strålin K, Korsgaard J, Olcén P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006;28:568-75.
14. Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from healthy and sick individuals varies with age. *J Clin Microbiol* 2004;42:4604-9.
15. Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Souza FR, Silva NM. Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update. *Braz J Infect Dis* 2006;10:293-304.
16. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JA. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi district, Kenya. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:59-64.
17. Brugger SD, Hathaway LJ, Mühlemann K. Detection of *Streptococcus pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx. *J Clin Microbiol* 2009;47:1750-6.
18. Kumar S, Wang L, Fan J, Kraft A, Bose ME, Tiwari S, et al. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection. *J Clin Microbiol* 2008;46:3063-72.
19. Strålin K, Törnqvist E, Kältoft MS, Olcén P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol* 2006;44:643-5.
20. Johansson N, Kalin M, Giske CG, Hedlund J. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:255-61.
21. Kais M, Spindler C, Kalin M, Orqvist A, Giske CG. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:169-78.
22. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 2007;45:2460-6.
23. Park J, Kim JK, Rheem I, Kim J. Evaluation of seeplex(TM) pneumobacter multiplex PCR kit for the detection of respiratory bacterial pathogens in pediatric patients. *Korean J Lab Med* 2009;29:307-13.

=국문초록=

호흡기 검체에서 폐렴의 세균성 원인균 검출을 위한 다중 PCR 검사의 임상적 평가

이화여자대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실

정채림, 이미애, 정화순

배경: 지역 사회 획득 폐렴은 전 세계적으로 유병률과 사망률이 높은 주요한 감염 질환 중의 하나이다. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* 등은 지역 사회 획득 폐렴의 흔한 원인균들이나, 배양 등의 전통적인 방법은 민감도가 낮고 시간이 많이 소요된다. 최근 이 균주들을 한 번에 검사할 수 있는 다중 PCR 검사가 개발되어, 본 연구에서는 폐렴 환자의 호흡기 검체에서 다중 PCR 검사를 평가하고자 하였다.

방법: 폐렴 환자 100명과 정상인 99명에 대해 Seeplex Pneumobacter ACE Detection assay (Seegene Inc., Seoul, Korea)를 시행하였다. 소변 항원 검사와 배양 검사도 함께 실시하였다.

결과: 다중 PCR 결과 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*가 각각 폐렴 환자의 52.5% (53/101), 30.7% (31/101)에서 양성되었고, *M. pneumoniae*와 *L. pneumophila*는 각각 2.0% (2/101), 1.0% (1/101)에서 양성이었으며, *B. pertussis* 및 *C. pneumoniae*는 검출되지 않았다. 정상인은 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 양성률이 각각 53.5% (53/99), 40.4% (40/99)로 폐렴군과 비슷하게 나타났고, 나머지 4균주는 검출되지 않았다. 폐렴군에서 *S. pneumoniae*의 다중 PCR 검사에 대한 민감도와 특이도는 소변 항원 검사, 호흡기 검체 및 혈액 배양 검사를 모두 기준으로 했을 때 각각 100% (95% 신뢰구간, 87.9~100%)와 66.7% (95% 신뢰구간, 55.2~76.5%)였다.

결론: *S. pneumoniae*와 *H. influenzae* 균주의 다중 PCR 검사는 집락 형성과 현성 감염의 감별이 어려워 분자 유전 검사를 적용하기 적합하지 않다. *M. pneumoniae*와 *L. pneumophila*는 정상인에서 검출되지 않았고, 배양하기도 어려워 다중 PCR 검사가 유용할 것으로 생각한다. [대한임상미생물학회지 2010;13:40-46]

교신저자 : 이미애, 158-056, 서울시 양천구 목동 911-1
이대목동병원 진단검사의학과
Tel: 02-2650-5222, Fax: 02-2650-5222
E-mail: miae@ewha.ac.kr