

Propidium monoazide와 real-time PCR을 이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의 선택적인 검출

김신영 · 이승종 · 김의성 · 서덕규 · 송윤정 · 정일영*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

SELECTIVE DETECTION OF VIABLE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* USING PROPIDIUM MONOAZIDE IN COMBINATION WITH REAL-TIME PCR

Sinyoung Kim, Seungjong Lee, Euseong Kim, Deoggyu Seo, Yoonjung Song, Ilyoung Jung*

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

Polymerase chain reaction (PCR) can detect bacteria more rapidly than conventional plate counting. However DNA-based assays cannot distinguish between viable and dead cells due to persistence of DNA after cells have lost their vitality. Recently, propidium monoazide (PMA) treatment has been introduced. The purpose of this study is to evaluate the applicability of the PMA treatment and real-time PCR method for cell counting in comparison with plate counting and to evaluate the antibacterial efficacy of 2% CHX on *E. faecalis* using PMA treatment in combination with real-time PCR.

Firstly, to elucidate the relationship between the proportion of viable cells and the real-time PCR signals after PMA treatment, mixtures with different ratios of viable and dead cells were used. Secondly, relative difference of viable cells using PMA treatment in combination with real-time PCR was compared with CFU by plate counting. Lastly, antibacterial efficacy of 2% CHX on *E. faecalis* was measured using PMA treatment in combination with real-time PCR.

The results were as follows :

1. Ct value increased with decreasing proportion of viable *E. faecalis*.
2. There was correlation between viable cells measured by real-time PCR after PMA treatment and CFU by plate counting until Optical density (OD) value remains under 1.0. However, viable cells measured by real-time PCR after PMA treatment have decreased at 1.5 of OD value while CFU kept increasing.
3. Relative difference of viable *E. faecalis* decreased more after longer application of 2% CHX. [J Kor Acad Cons Dent 33(6):537-544, 2008]

Key words: *E. faecalis*, real-time PCR, propidium monoazide, chlorhexidine

- Received 2008.8.8., revised 2008.10.6., accepted 2008.10.14-

I. 서 론

근관내에서 살아있는 세균의 수를 정확하게 측정하는 것은 매우 어려운 일이다. 전통적으로 세균의 검출은 plate counting을 비롯한 다른 cultivation-based approach를

통해서 이루어졌다. 그러나 이런 방법은 시간 소모적이고 배지의 선택이나 대사 활성도, 술자의 경험에 따라 편차가 생길 수 있다. 대조적으로 polymerase chain reaction (PCR) 방법에 따른 검출은 배양 가능한 세균과 배양 불가능한 세균을 모두 빠르게 검출할 수 있다¹⁾.

하지만 PCR 방법은 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하기 때문에, 검출된 세균이 현재 살아있는 세균인지 아니면 살아있다가 후에 죽은 세균인지 구분하는 것이 불가능하다. 세포가 죽은 후에도 세균의 DNA는 장기간 동안 존재할 수 있기 때문에^{2),3)} 죽은 세균의 DNA가 일부만이 남아서 PCR에 의해 검출되고 증폭될 수 있다. 따라서

* Corresponding Author: Ilyoung Jung
Department of Conservative Dentistry
College of Dentistry, Yonsei University
134, Shinchon-dong, Sudaemoon-gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-2228-3151 Fax: 82-2-313-7575
E-mail: juen@yuhs.ac.kr

DNA에 기초한 세균 수의 측정은 과측정되거나 허위 양성 반응의 결과가 나타날 수 있다.

최근에 Nocker 등^{4,5)}은 DNA 추출 전에 propidium monoazide (PMA)를 세균 표본에 처리하면 살아있는 세균만 선택적으로 검출할 수 있다고 주장하였다. 이 방법의 원리는 세균 세포막의 완전함에 있는데 PMA는 손상된 세포막만 통과하여 들어갈 수 있는 염료이기 때문이다. 그 후 PMA의 azide group은 빛 노출 하에서 죽은 세포의 DNA와 공유 결합을 하게 된다. 따라서 PMA 방법은 빠르고 간단하게 완전한 세포막을 가진 세균의 DNA만 한정적으로 분석할 수 있다.

성공적인 근관치료를 위해서는 근관내의 세균을 완전히 제거하는 것이 필요하다. 근관내의 세균을 제거하기 위해서는 file을 이용한 기계적인 제거 뿐만 아니라 약제를 이용한 화학적인 제거도 필요하다. 여러 임상연구들에 의하여 수산화칼슘 등이 효과적인 약제로써 추천되었고 널리 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 *Enterococcus faecalis*와 같이 약제에 저항성이 있는 세균이 밝혀졌고, 이런 세균이 괴사된 치수에서 근관치료의 실패에 중요한 원인 인자로 생각되고 있다. Molander 등⁶⁾은 치근단 병소가 있는 근관치료된 치아의 32%에서 *E. faecalis*를 발견하였으며, Möller⁷⁾은 29%, Sundqvist 등⁸⁾도 38%의 *E. faecalis*를 치근단 병소가 있는 근관치료된 치아에서 배양할 수 있었다. 또한 재발한 치근단 질환을 가진 한국인의 치아에서 배양한 세균을 살펴본 연구에서, 가장 많이 발견된 세균이 *E. faecalis*이며 전체의 64%를 차지하고 있었다⁹⁾. *E. faecalis*에 대한 관심은 이들이 통상적인 근관내 약제인 수산화칼슘에 저항성을 가지기 때문에 더욱 높아졌는데, 이러한 사실은 여러 연구가에 의해서 실험적으로 밝혀졌다¹⁰⁾. *E. faecalis*의 제거를 위해 chlorhexidine (CHX)이 사용된 것은 실험을 통해 효과가 밝혀진 후부터인데, CHX은 넓은 범위의 항균성을 가지며, 상아질 상에 결합하여 장기간 효과를 가져온다고 알려졌기 때문이다.

약제의 효과와 연관하여 또 다른 고려해야 할 사항은 근관내에서 세균은 biofilm을 형성하며 존재하여 약제에 대한 저항성을 가진다는 사실이다¹¹⁾. Mah 등¹²⁾은 이러한 저항성은 다당류 기질이 물리적, 화학적으로 항생제의 확산을 막고 세균자체도 제한된 영양분에 의해 천천히 자라기 때문에 대사활동이 저하되어 항생제에 저항성을 가진다는 가설을 제시하였다. 이러한 biofilm의 약제에 대한 저항성에 대한 연구들 중에 Lima 등¹³⁾은 *E. faecalis* biofilm의 CHX에 대한 저항성이 통상의 planktonic 상태의 세균보다 높다는 실험 결과를 제시했다. *E. faecalis*의 약제에 대한 저항성 및 biofilm 상태의 세균이 가지는 저항성을 생각한다면, 이러한 세균들에 의해 발생하는 근관치료의 실패 가능성에 대하여 인지하고 이를 제거하기 위한 전략적 접근이 필요

하다.

이번 연구의 목적은 세균 수의 측정에 있어서, PMA 처리와 real-time PCR 방법의 적용 가능성을 기존의 plate counting 방법과 비교하여 알아보는 것이다. 또한 *E. faecalis*에 대한 2% CHX의 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 알아보는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. PMA의 효과 검증

1.1 세균 표본의 준비

E. faecalis (ATCC 29212, KCCM 11814, DSM 2570; KCCM, Seoul, Korea)를 표본으로 사용하였다. Brain heart infusion agar (BHI agar) (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) broth에 접종한 후, 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100 µl를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 optical density (OD at 600nm) 값이 1.0에 도달할 때의 suspension을 덜어내어 살아있는 세균으로 준비하였다. 또한 *E. faecalis*를 2% CHX을 이용하여 40분간 처리하여 완전히 죽은 세균으로 준비하였다. 이는 예비 실험에서 plate counting을 통해 세균이 모두 죽을 때의 시간을 측정된 후 시행한 것이다. 2% CHX은 20% chlorhexidine gluconate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 10배 희석하여 사용하였다. 이후 죽은 세균을 살아있는 세균과 적절한 비율로 섞어서 살아있는 세균의 양이 전체의 0%, 0.1%, 1%, 10%, 100%가 되도록 하였다.

1.2 Propidium monoazide crosslinking

Propidium monoazide (PMA) (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethyl ammonio)-propyl]-6-phenyl dichloride; Biotium Inc., Hayward, CA, USA)는 20%의 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Ducksan Pure Chemicals Co., Ansan, Korea)에 녹여서 20 mM로 몰농도를 맞춘 후, -20℃에서 보관하였다. 각 표본을 500 µl씩 1.5 ml eppendorf tube에 옮겼다. 1.25 µl의 PMA를 처리하여 최종 몰농도를 약 50 µM이 되도록 했다. 이후 eppendorf tube를 은박지에 싼 후 5분 동안 shaker위에서 incubation 하였다. 650W halogen light (sealed beam lamp, DWE 41667, 110V, 3200K, GE Lighting; General Electric Co., Fairfield, CT, USA)를 이용하여 표본에 2분 동안 빛을 노출시켰다. 표본은 과도한

열을 피하기 위하여 얼음 위에 수평으로 눕히고, halogen light로부터 20 cm의 거리를 유지하도록 하였다. 빛에 의한 crosslinking이 일어난 후에, 표본은 8000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상부의 액을 제거한 후 PBS로 처리하였다.

1.3 DNA extraction

DNA는 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. Proteinase K를 1.5ml eppendorf tube에 20 μ 씩 넣고 여기에 준비한 표본을 200 μ 씩 넣은 후, Binding buffer를 200 μ 넣고 즉시 Vortex를 이용하여 혼합하였다. 10분 동안 60 $^{\circ}$ C에서 incubation한 후, 100 μ 의 Isopropanol (Duksan Pure Chemicals Co., Ansan, Korea)을 넣고 pipet을 이용하여 섞었다. 액을 Binding column tube로 옮긴 후, 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다. Binding column tube를 새로운 2 ml tube로 옮긴 후, Washing buffer 1을 500 μ 처리한 후, 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다. 하부의 액을 버린 후, Washing buffer 2를 500 μ 처리하고 다시 원심분리 하였다. Binding column tube를 새로운 1.5ml tube로 옮긴 후, Elution buffer를 200 μ 처리하고 상온에서 5분 동안 기다렸다. 마지막으로 8000 rpm으로 1분 동안 원심분리 하였다.

1.4 Real-time PCR

Real-time PCR과 data분석은 MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)을 이용하여 시행하였다. Cycle threshold (Ct) value는 MiniOpticon에 의해 자동적으로 계산되었다. 추출된 genomic DNA 1 μ 에 PCR mixture 19 μ 를 넣은 후 pipet을 이용하여 기포가 생기지 않도록 혼합하였다. PCR mixture는 SYBR Green (iQ[™]SYBR[®] Green Supermix, Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)과 10 pmol의 두 개의 primer (Bioneer Co., Daejeon, Korea), 그리고 멸균 증류수를 포함한다. Quantification을 위해 사용된 primer는 EF-Forward (TCG GTG ATT AAC CCT CGT CA)와 EF-Reverse (ACG GAG ATA ACA CCG GAA CC)이다. 사용된 primer는 universal primer pair를 사용하였고, 먼저 primer가 제대로 역할을 하는지 확인 후 사용하였다¹⁴⁾. *E. faecalis*를 quantification 하기 위한 cycling 순서는 다음과 같이 진행하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지하였다. 이후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 57 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 45 cycles를 반복하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였다. Melting curve의 분석은 0.2 $^{\circ}$ C 간격으로 65 $^{\circ}$ C에서부터 95 $^{\circ}$ C까지 상승시켰다. 이후 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였다.

2. Real-time PCR의 적용 가능성

2.1 Real-time PCR

BHI agar plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI broth에 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100 μ 를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 주기적으로 OD 값을 측정하여 각 OD 값에 해당하는 suspension을 500 μ 씩 두 개 준비하여 1.5ml eppendorf tube에 옮겼다. 준비된 500 μ 의 표본 중에 하나에만 1.25 μ 의 PMA를 처리한 후, 위에 제시한 방법대로 PMA crosslinking을 시행하고 DNA extraction을 한 후에 real-time PCR을 시행하였다.

2.2 Plate counting

각 OD 값에 해당하는 suspension을 덜어내어 이들을 각각 10배의 연속희석 (10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸)을 시행하고, 희석된 sample들을 BHI agar plate에 20 μ 씩 세 부위에 나누어 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 24시간 후에 colony의 수를 세어 정리한 후, 1ml 안에 있는 colony의 수로 환산하였고 log CFU로 표시하였다.

3. 2% CHX의 *E. faecalis*에 대한 살균 효과

3.1 세균 표본의 준비

BHI agar plate에서 한 개의 colony를 채취하여 10 ml BHI broth에 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 suspension에서 100 μ 를 덜어내어 20 ml BHI broth에서 재배양하였다. 이후 OD 값을 1.0이 되도록 조정하여, 이 때의 suspension을 표본으로 사용하였다.

3.2 *E. faecalis* biofilm의 재현

*E. faecalis*의 biofilm은 멸균된 membrane filters (0.2 μ pore size, 13mm diameter; Whatman International Ltd., Maidstone, U.K.)를 사용하여 형성하였다¹⁵⁾. BHI agar plate 상에 membrane filters를 올려놓고 OD 값이 1.0으로 조정된 suspension을 90 μ 접종하였다. 접종 후에 10분 정도 건조시킨 후, 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 배양하였다. 이는 starvation phase의 *E. faecalis*를 만들기 위해서 시행한 것이다¹⁶⁾.

3.3 CHX의 처리

Membrane filter를 3ml PBS가 담긴 tube로 옮긴 후, 1분간 Vortex를 이용하여 membrane filter상의 세균을 떨어지게 하였다. 이 중에서 500 μ 씩 따로 덜어내어 1.5ml eppendorf tube에 옮긴 후, 8000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상부의 액을 제거하였다. 각각 2% CHX를 1ml

씩 5분, 15분, 30분, 40분 동안 처리하고, 대조군으로 PBS를 1ml 처리한 것을 사용하였다. 이후 원심분리하여 상부의 액을 제거한 후에 CHX inactivating agent를 1ml씩 10분간 처리하였다. CHX inactivating agent는 TWEEN® 80 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 3 ml을 0.43%의 멸균된 식염수 97ml에 희석하여 제작하였다¹⁷⁾. 이후 위에 제시한 방법대로 PMA crosslinking을 시행하고 DNA extraction을 한 후에 real-time PCR을 시행하였다.

III. 결 과

1. PMA의 효과 검증

먼저 37°C에서 12시간 동안 배양한 *E. faecalis*를 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하였다. 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. 연속적으로 Ct value를 계산한 결과, 가장 높은 Ct value는 10⁵배 연속희석을 시행한 표본 A에서 관찰되었고 가장 낮은 Ct value는 10배 희석을 시행한 표본 E에서 관찰되었다 (Figure 1). 즉 *E. faecalis*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소하였다.

다음으로 살아있는 세균과 죽은 세균을 적절하게 다른 비율로 섞어서 (Figure 2A) PMA를 처리한 후에 각 비율에 대한 real-time PCR을 시행하였다. 그 결과 살아있는 세균의 비율이 증가할수록, 즉 표본 I에서 V로 갈수록 Ct value는 단계적으로 감소하였고 (Figure 2B), PCR 기계에서 나타난 세균의 relative difference는 단계적으로 증가하였다 (Figure 2C). 표본 I의 경우에는 죽은 세균만 존재하기 때문에 relative difference가 거의 없는 것으로 나타났고, 표본V에서는 살아있는 세균만 존재하기 때문에 relative difference가 가장 많이 나타났다.

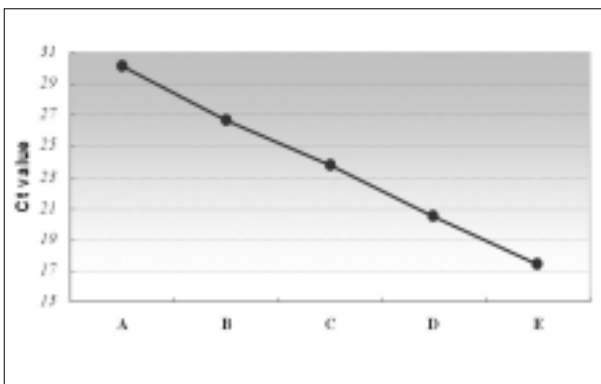


Figure 1. Ct value measured by real-time PCR after serial dilutions of *E. faecalis* (A. 10⁵ dilution, B. 10⁴ dilution, C. 10³ dilution, D. 10² dilution, E. 10 dilution)

2. Real-time PCR의 적용 가능성

시간에 따라 OD 값을 측정된 결과 OD 값이 0.5일 때부터 1.0일 때까지 세균이 급속하게 성장하는 것을 알 수 있었다. 그리고 OD 값이 1.0부터 1.5에 도달할 때까지는 세균의 성장 속도가 저하되었다.

각 OD 값을 시간에 따라 측정하여 OD 값이 0.23, 0.53, 1.0, 1.5일 때의 표본을 구하여 real-time PCR을 시행한 결과, OD 값이 1.0일 때까지는 PMA를 처리한 것 (Figure 3, group A)과 처리하지 않은 것 (Figure 3, group B) 사이에 살아있는 세균의 relative difference가 거의 비슷하게 나타났다. OD 값이 1.5일 때의 표본에서는 PMA를 처리한 것과 처리하지 않은 것 사이에 큰 차이가 나타났다.

각 OD 값에서의 log CFU를 비교해 볼 때는, OD 값이 커질수록 세균의 수가 점차적으로 증가함을 알 수 있었다. (Figure 3, group C)

3. 2% CHX의 *E. faecalis*에 대한 살균 효과

2% CHX을 5분, 15분, 30분, 40분 동안 처리한 결과 Ct value가 점차 증가함을 알 수 있었고 (Figure 4A), 살아있는 세균의 양은 감소하는 것을 알 수 있었다 (Figure 4B). 대조군과 비교하여 살아있는 *E. faecalis*의 relative difference를 볼 때, CHX을 5분 동안 처리하였을 때에도 상당한 양의 세균이 죽는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 완전한 세균의 사멸은 2% CHX을 40분 동안 처리한 경우에 나타났고, 이는 추가적으로 plate counting을 통해 CFU를 측정 한 결과에서 확인할 수 있었다 (data not shown).

IV. 고 찰

*E. faecalis*는 광범위한 항균, 항생제에 저항성을 가지는 동시에 재발하는 만성 치근단 치주염의 원인이 되는 세균이기 때문에 이번 연구에서 사용하였다. 또한 근관내에서 세균은 biofilm을 형성하여 약제에 대한 저항성을 가지기 때문에, 근관치료의 실패 가능성을 인지하고 전략적 접근을 하여야 한다. 따라서 *E. faecalis*에 대한 CHX의 살균 효과를 알아보기 위해 살아있는 세균의 검출이 필요했고, 기존의 plate counting 방법의 대체 방법으로써 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는 것을 알아보았다.

먼저 *E. faecalis*에 대한 real-time PCR의 효과 검증을 시행하였다. OD 값이 1.0으로 조정된 *E. faecalis*를 단계적으로 희석하여 real-time PCR을 시행하였다. Figure 1에 나타난 결과를 보면 세균이 약 10배 정도로 단계적인 양이 증가할수록 Ct value도 단계적인 차이를 나타냈다. MiniOpticon에 나타난 증폭곡선 그래프에서도 DNA 양이

A	I	II	III	IV	V
Viable <i>E. faecalis</i> (μ l)	0	0.5	5	50	500
Dead <i>E. faecalis</i> (μ l)	500	499.5	495	450	0
Viable bacteria (%)	0	0.1	1	10	100

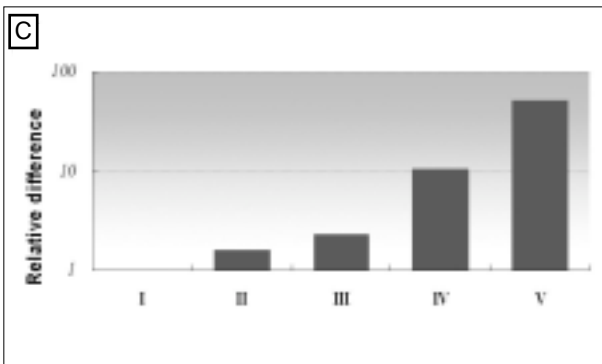
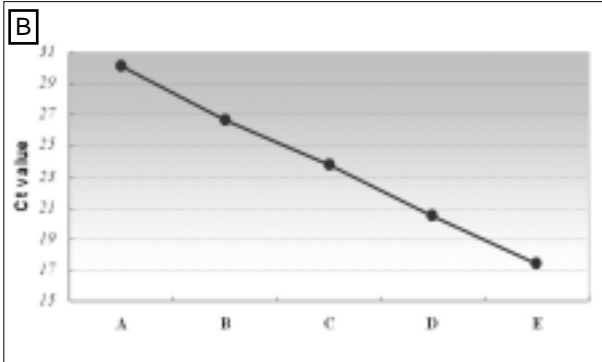


Figure 2. Effect of PMA on the amplification of different ratios of viable and dead *E. faecalis* (A. Table showing mixing ratios of viable and dead *E. faecalis*, B. Ct value of amplified genomic DNA shown as a function of the percentage of viable *E. faecalis*, C. Relative difference of viable *E. faecalis* measured by real-time PCR)

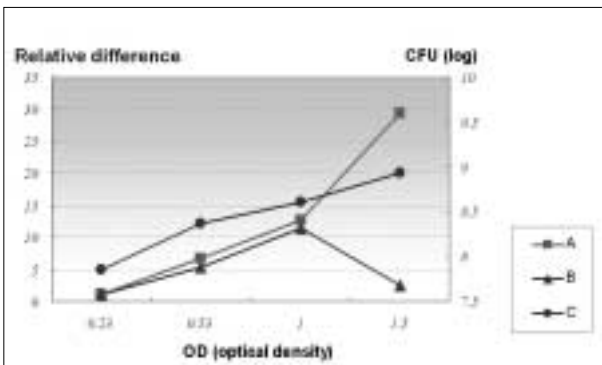


Figure 3. Correlation between relative difference measured by real-time PCR and log CFU by plate counting (group A. Relative difference of non-PMA treated *E. faecalis* at each optical density, group B. Relative difference of PMA treated *E. faecalis* at each optical density, group C. Log CFU by plate counting at each optical density)

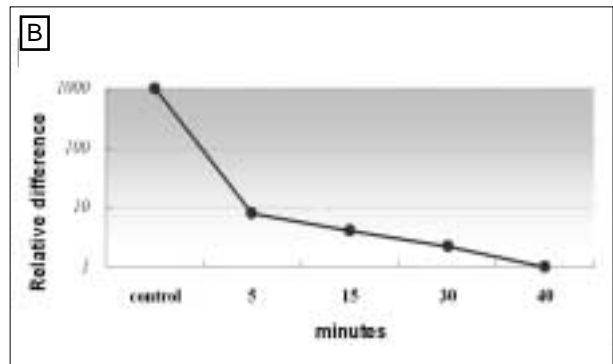
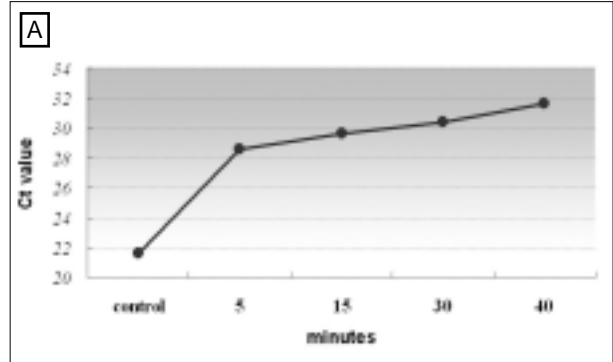


Figure 4. Monitoring exposure of *E. faecalis* to increasing time periods of 2% chlorhexidine (A. Increase of Ct values as increasing exposure time of 2% CHX, B. Decrease of relative difference of viable cells as increasing exposure time of 2% CHX)

많은 순서에서 적은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭곡선이 얻어졌고, DNA 양이 많아질수록 같은 간격으로 감소하는 Ct value를 보였다. 이 결과로 보아서 *E. faecalis*에 대한 primer도 잘 만들어졌고 real-time PCR의 시행 조건도 적절하다는 것을 확인하였다.

따라서 다음단계로 PMA의 효과 검증을 시행하였다. Nocker 등^(4),5),18),19)의 연구에 따르면 PMA와 quantitative PCR을 같이 사용하였을 때, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는 데 성공적인 결과를 보였다. 하지만 그의 연구에서는 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Mycobacterium avium* 등의 세균이 사용되었고, 어떤 연구에서도 *E. faecalis*를 이용하여 실험한 적은 없었다. 따라서 *E. faecalis*에서도 PMA와 죽은 세균이 반응하여, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는지를 확인하는 과정이 필요했다.

살아있는 세균의 비율이 단계적으로 10배의 차이가 나도록 Figure 2A와 같이 살아있는 세균과 죽은 세균을 섞어서

실험하였다. 살아있는 세균의 비율을 10배 차이가 나도록 한 이유는 작은 양의 차이에서는 Ct value의 큰 차이가 없었기 때문이다. 살아있는 세균이 양이 10배 정도의 차이가 나도록 하였을 때 Ct value는 약 3 정도의 차이를 보였다 (Figure 1). 위의 결과에서도 살아있는 세균의 양이 증가할수록 Ct value는 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2B). 물론 Ct value의 차이가 Figure 1에서 나타난 차이 만큼 크게 나타나지는 않았지만, 유의할만한 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 PMA가 빛 노출 하에서 죽은 세균의 DNA와 crosslinking이 일어난 것이라고 추정할 수 있었고, PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행하는 것이 살아있는 *E. faecalis*만 선택적으로 검출할 수 있는 효과적인 방법이라는 것을 알 수 있었다.

다음으로 plate counting으로 얻어진 CFU가 real-time PCR을 통해 측정된 살아있는 세균의 relative difference와 연관되어 비교되었다. 각 OD 값은 세균의 양에 있어서 어느 정도의 차이를 만들기 위하여 약 0.2, 0.5, 1.0, 1.5의 값으로 정하였다. *E. faecalis* suspension 100 μ l를 20 ml BHI broth에 넣은 후 약 3시간 30분 경과시에 OD 값이 0.23에 도달했고, 이후 급속히 증가하면서 5시간 경과시에 OD 값이 1.0에 도달했다. OD 값이 1.0에서 1.5로 도달할 때는 세균의 성장속도가 늦어서 많은 시간이 소요되었다. 약 7시간 경과시에 OD 값이 1.5에 도달하였다. PMA를 처리한 표본과 처리하지 않은 표본에서 세균의 relative difference의 차이를 비교해 보면 OD 값이 1.0에 도달할 때까지는 어느 정도 비슷한 것을 알 수 있다. 따라서 OD 값이 증가하여 1.0에 도달할 때는 표본에 살아있는 세균이 대부분인 것으로 해석된다. 또한 OD 값이 1.0에서 1.5로 올라갈 때는 PMA를 처리하지 않은 표본은 계속 살아있는 세균의 relative difference가 증가하는 데 비해, PMA를 처리한 표본에서는 살아있는 세균의 relative difference가 확연히 감소하는 것이 관찰되었다. 이를 통해서 OD 값이 1.5일 때는 살아있는 세균과 죽은 세균이 함께 존재하며, 죽은 세균의 DNA가 PMA와 crosslinking이 일어나서 검출되지 않았다고 생각할 수 있다.

실험 결과에서 의문이 생긴 점은 CFU (Figure 3C)는 OD 값이 1.5일 때 계속 증가하였음에 비해서 PMA를 처리한 표본의 relative difference (Figure 3B)는 OD 값이 1.5일 때 많이 감소하였다는 점이다. PMA를 처리한 표본에서 살아있는 세균만 검출된다는 점을 생각해 보면, CFU와 PMA를 처리한 표본의 relative difference 사이에는 상관관계가 있어야 한다. 하지만 실제로 둘 사이에 OD 값이 1.5일 때 큰 차이를 보였다. CFU는 OD 값이 1.0일 때보다 1.5일 때 계속 증가하였다. 하지만 PMA를 처리한 표본의 real-time PCR에서 측정된 relative difference는 OD 값이 1.0일 때보다 1.5일 때 훨씬 많이 감소하였다. 즉,

PMA 처리시에는 죽은 세균으로 판단되었던 것이 실제 배양을 해보면 배양이 된다는 결론을 내릴 수 있다. 이는 세균 세포막에 미세한 손상만 받아도 PMA가 세포막을 통과하여 real-time PCR 시행시에 증폭되지 않는데 반해, 배양시에는 세포막이 일부 손상을 받았더라도 BHI agar plate를 통해 영양분이 공급되면 세포막이 회복되어 세균이 성장할 수 있기 때문으로 추측된다. 하지만 투과성이 있던 세포막이 성공적으로 재생되는 경우는 보고된 적이 없으므로 이에 대한 연구가 추후 더 필요하리라고 생각된다.

아직까지 살아있는 세균만을 정확하게 검출할 수 있는 방법은 없다. Cultivation-based approach에서도 살아있는 세균이 배양이 안되는 현상 (viable but non-culturable)이 나타난다고 한다²⁰⁾. 따라서 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하는 것이 100% 정확할 수는 없고, 세균이 살아있다는 것의 정의도 생식 증식 (reproductive growth), 대사 활동도 (metabolic activity), 세포막의 완전함 (membrane integrity)에 따라 달라질 수 있다. PMA 처리 방법 역시 세포막의 완전함에 따라 세균이 살아있는지 유무를 평가하게 되므로, 완전히 살아있는 세균만 100% 확률이 검출된다고 말하기에는 무리가 있을 것 같다.

*E. faecalis*에 대하여 CHX이 가지는 항균성은 Heling 등²¹⁾에 의하여 이미 밝혀진 바 있으며, Lima 등¹³⁾은 1일과 3일 동안 배양된 *E. faecalis* biofilm에 2% CHX을 처리하였을 때 완전한 세균의 사멸을 관찰할 수 있었다고 하였다. 이번 연구에서도 3일 동안 membrane filters에서 배양한 *E. faecalis* biofilm에 2% CHX을 처리하였을 때 살아있는 세균이 시간에 따라 점차적으로 감소함을 알 수 있었다. 3일 동안 세균을 배양한 것은 세균의 성장곡선을 통해 starvation phase때의 세균을 만들기 위해서였고, 이 시기의 세균이 가장 저항성이 높아서 disinfectant에 의해 쉽게 제거되지 않기 때문이다¹⁶⁾. 이번 실험의 결과 2% CHX을 5분 동안 처리하였을 때에도 많은 양의 세균이 사멸했지만, 배양 후 CFU로 확인해 본 결과 CHX을 40분 동안 처리하였을 때 완전히 세균이 사멸하는 것을 알 수 있었다 (data not shown). 따라서 PMA 처리 후 real-time PCR을 시행할 때도 CHX을 40분까지 처리하였고, 처리시간이 길수록 Ct value가 커지고 살아있는 *E. faecalis*의 relative difference가 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 4). 이는 CHX의 처리 시간이 증가할수록 죽은 세균이 많아져서 상대적으로 살아있는 세균의 양이 감소하는 것을 나타내는 것이다. 이를 통해서 disinfectant로 2% CHX을 사용하여 *E. faecalis*에 대한 살균 효과를 평가하는 데 있어서도, PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는 것이 가능하다고 하겠다.

이번 연구의 결과 첫째로 살아있는 *E. faecalis*의 비율이 감소할수록 Ct value는 증가하였다. 둘째로 PMA 처리 후

real-time PCR 방법을 이용하여 세균의 양을 측정할 것과 plate counting으로 얻은 CFU 사이에는 OD 값이 1.0일 때 까지는 상관관계가 있었다. 하지만 OD 값이 1.5 이상일 때는 한계가 있었다. 셋째로 2% CHX을 오래 적용할수록 살아있는 *E. faecalis*의 상대적인 양이 감소하는 것을 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 사용하여 확인하였다.

PMA 처리와 real-time PCR 방법은 빠르고 간단한 방법으로 앞으로 DNA-based assay를 더욱 활발하게 할 것이다. 특히 기존의 PCR 방법이 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하고 함께 증폭시키는 반면, 이번 PMA를 이용한 연구 방법은 완전한 세포막을 가진 세균만 선택적으로 검출하여 증폭시킨다는 점에서 더욱 의미가 있다. 또한 PMA 처리와 real-time PCR 방법이 이전의 연구^{(4), (5), (18), (19)}와 달리, *E. faecalis*를 표본으로 사용하고 disinfectant로 CHX을 사용한 경우에도 성공적으로 적용됨을 확인할 수 있었다.

물론 PMA 처리시에 살아있는 세균의 상대적인 양과 배양에 의해 얻어진 CFU가 OD 값이 1.5일 때 여러 원인에 의해 직선적인 상관관계를 보이지는 않았다. 하지만 disinfectant에 노출된 후 세포막의 완전함을 평가하는 데 있어서 PMA 처리방법이 빠르고 재현 가능한 방법임을 알 수 있었고, 그러므로 이는 plate counting의 대체 방법으로써 가치가 있을 것이다.

V. 결 론

1. PMA 처리와 real-time PCR 방법을 이용하여 죽은 세균을 제외하고 살아있는 *E. faecalis*만 선택적으로 검출할 수 있다.
2. 기존의 plate counting 방법의 대체 방법으로써 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 적용하는 것이 가능하지만, OD 값이 1.5 이상일 때는 한계가 있다.
3. Starvation phase의 *E. faecalis*를 제거하기 위해서 2% chlorhexidine의 장시간 적용이 필요하다.

참고 문헌

1. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 32:715-21, 2006.
2. Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* 33:1417-20, 2007.
3. Josephson KL, Gerba CP, and Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 59:3513-5, 1993.
4. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 73:5111-7, 2007.
5. Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 70:252-60, 2007.
6. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31:1-7, 1998.
7. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 74:1-380, 1966.
8. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:86-93, 1998.
9. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* 30:504-8, 2004.
10. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66:1375-9, 1987.
11. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agent. *J Med Microbiol* 44:79-87, 1996.
12. Mah TF, O Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9:34-9, 2001.
13. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 27:616-9, 2001.
14. Fouad AF, Kum KY, Clawson ML, Barry J, Abenoja C, Zhu Q, Caimano M, Radolf JD. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp. and *Streptococcus* spp. in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 18:249-55, 2003.
15. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 31:30-6, 2005.
16. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medications. *J Endod* 31:380-6, 2005.
17. Zamany A, Spångberg LS. An effective method of inactivating chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:617-20, 2002.
18. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67:310-20, 2006.
19. Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* 72:1997-2004, 2006.
20. De Vos MM, Nelis HJ. An improved method for the selective detection of fungi in hospital waters by solid phase cytometry. *J Microbiol Methods* 67:557-565, 2006.
21. Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J* 25:15-9, 1992.

국문초록

Propidium monoazide와 real-time PCR을 이용한 살아있는 *Enterococcus faecalis*의 선택적인 검출

김신영 · 이승중 · 김의성 · 서덕규 · 송윤정 · 정일영*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

세균의 검출에 있어서 polymerase chain reaction (PCR) 방법은 기존의 plate counting과 달리 빠르게 세균을 검출할 수 있다. 하지만 세균이 죽은 후에도 DNA는 장기간 존재할 수 있기 때문에, DNA에 기초한 분석은 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분할 수 없다. 최근에 DNA extraction전에 propidium monoazide (PMA)를 처리하여 살아있는 세균만 선택적으로 검출하는 방법이 제시되었다. PMA는 손상된 세포막만 통과하여 죽은 세포의 DNA와 빛 노출 하에서 결합하여 PCR이 증폭되는 것을 막는다.

*Enterococcus faecalis*는 근관치료의 실패에 있어서 중요한 원인이 되는 세균으로 제시되어 왔다. 그리고 chlorhexidine (CHX)은 *E. faecalis*의 제거에 있어서 효과적인 약제임이 밝혀졌다.

이번 실험의 목적은 세균 수의 측정에 있어서, PMA 처리와 real-time PCR 방법의 적용 가능성을 기존의 plate counting과 비교하여 알아보는 것이다. 또한 *E. faecalis*에 대한 2% CHX의 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 알아보는 것이다.

실험 방법으로 먼저 살아있는 세균과 죽은 세균을 다른 비율로 섞어서 PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행하여 PMA가 빛 노출 하에서 죽은 세균의 DNA와 결합하는 효과를 나타내는지 알아보았다. 다음으로 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 이용하여 살아있는 세균의 양을 측정한 것을 plate counting으로 얻은 CFU와 비교하였다. 마지막으로 2% CHX의 처리시간을 다르게 하였을 때 *E. faecalis*에 대한 살균 효과를 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 알아보았다.

실험 결과로 살아있는 *E. faecalis*의 비율이 감소할수록 Ct value는 증가하였다. 그리고 PMA 처리 후 real-time PCR 방법을 이용하여 세균의 양을 측정한 것과 plate counting으로 얻은 CFU 사이에는 Optical density (OD) 값이 1.0일 때까지는 상관관계가 있었다. 하지만 OD 값이 1.5일 때는, PMA를 처리한 후 real-time PCR을 시행했을 때 측정된 살아있는 세균의 양이 감소하였음에 반해서 plate counting에 의한 CFU는 계속 증가하였다. 마지막으로 2% CHX을 오래 적용할수록 살아있는 *E. faecalis*의 상대적인 양이 감소하는 것을 PMA 처리와 real-time PCR 방법을 이용해 확인하였다.

주요단어 : *E. faecalis*, real-time PCR, propidium monoazide, chlorhexidine