

## 감염환자에서 분리한 녹농균의 특성에 관한 연구

정기철 · 이영우 · 김민정\* · 임은경\* · 김영부\* · 오양호†

부산대학교 의학과 미생물학교실  
\*부산대학교 의학과 신경외과학교실

## Studies on the *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Infected Patient

Ki-Chul Jung, Young-Woo Lee, Min-Jung Kim, Eun-Gyoung Lim, Young-Bu Kim and Yang-Hyo Oh†

Department of Microbiology and \*Department of Neurosurgery, College of Medicine,  
Pusan National University, Pusan 602-739, Korea

### Abstract

Seventy-two strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the patients were tested for pigment production, exoenzyme production and antimicrobial susceptibility. In the pigment production test, 23.6% of total 72 strains produced both pyocyanine and pyoverdin. Pyoverdin and pyomelanin producing strains were in 9.7%, and 5.5% produced pyoverdin and pyorubin. Strains producing of all of exoenzyme, protease, elastase and lecithinase were in 5.6%. The most common type of exoenzyme production was both protease and elastase producing. Protease producing strain were 23.6%, Among the 72 strains, 50% produced protease. As the result of antimicrobial susceptibility in the isolated 20 strain, most strain were resistant to sulfamethoxazole (90%), but sensitive to other tested antibiotics more than 60%. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> level of tested antibiotics to 72 strains were 128 µg/ml, 512 µg/ml for KM, 8, 256 µg/ml for GM, 8, 128µg/ml for CPZ, and 8, 64µg/ml for PIPC respectively.

**Key words** – Pyocyanine, Pyoverdin, Pyomelanin, Pyorubin, Protease, Elastase, Lecithinase, Minimal Inhibitory Concentration

### 서 론

녹농균 (*Pseudomonas aureuginosa*)은 기회감염성 균으로 다양한 유형의 감염증을 유발하며, 각 유형에서 균력인자로서의 역할이 중요시되는 많은 세포외성 물질을 생성한다[7]. 1970년 이래로 병원감염의 주요한 균종으로는 그람 음성균에 의한 감염이 주류를 이루고 있으며[8], 그 중에 서도 녹농균은 병원 내 감염증의 가장 흔한 원인체중의

하나로 녹농균에 효과적인 항생물질이 몇 종에 불과하며, 주사 시에 매우 독성이 강한 난점을 지니고 있다. 녹농균 감염증은 최근 점차 증가하고 있으며 특히 군교대증, 병원 감염, 기회감염 등으로 인하여 임상에서 녹농균에 대한 관심은 높아지고 있다. 녹농균은 cystic fibrosis (CF) 환자의 만성 폐질환 감염의 주요 병원균이며 CF환자 이외에도 화상이나 급성 백혈병, 기관이식이나 정맥주사에서 빈발하게 나타나고 외이염, 폐염, 뇌막염, 요도감염, 골수염에 관

† Corresponding author

여한다[15]. 녹농균과 관련된 multisystem organ failure는 80%나 되며 전체 치사율 또한 50%나 된다[1].

환자에 병원감염의 빈도는 낮지만 임상적으로 중요한 녹농균 감염의 결과는 매우 심각한 것으로 알려져 있다 [9]. 더욱이 백혈병과 골수 등의 악성 종양환자에서 본 균의 생체내 정착율이 높다고 하며, 위장관 적출수술을 받은 입원환자라든지 항생제를 장기간 투여받은 환자 등에서 녹농균의 장관내 정착율이 높다고 한다[25]. 녹농균 감염증의 구체적 치료법은 약제의 선택에 달려있지만 녹농균이 수종의 항균제에 대하여 내성을 가지므로 녹농균 감염증이 일단 발생되면 그 치료약제가 제한이 되어 실제로 치명율은 타균종보다 높은 것으로 나타나 있다[25]. 현재에는 한가지 약제보다도 서로 작용기전이 다른 약제를 동시에 사용하여 그 상승작용에 의한 효과의 시도가 많이 보고되고 있다[17]. 그러나 이러한 약제에 대해서도 빠르게 내성균주가 나타나고 있으므로 중증 기초질환이 있고 감염 방어 능력이 저하된 환자의 치료에는 안전하고 적절한 화학요법의 확립이 요한다.

이에 본 연구는 녹농균에 의한 병원감염의 감소와 보다 효율적인 치료를 위하여 객담, 농, 뇨, 대변, 화상피부 및 혈액에서 분리한 녹농균의 병원성 인자중 균력과 밀접한 관계가 있는 균체외효소 및 색소생성능 그리고  $\beta$ -lactam계와 aminoglycoside계 항생제에 의한 녹농균 최소발육저지농도 (MIC, minimal inhibitory concentration)를 검토하였다.

## 실험재료 및 방법

### 사용균주

감염환자의 객담, 농, 뇨, 대변, 화상피부 및 혈액에서 분리하여 확인한 20균주와 보관중인 52균주를 사용하였다.

### 색소 생성 시험법

Pyocyanine, pyoverdin, pyorubin 색소생성배지로는 King A 및 King B 배지[19]를 사용하였으며, pyomelanin 생성을 위해서는 육즙한천평판 배지를 사용하였다. 육즙한천평판 배지에서 24시간 배양한 것을 색소생성배지와 한천사면배지에 각각 접종하여 7일간 계속 관찰하였다.

### Pyocyanine

Pyocyanine은 King A 배지에서 생성이 증강되어 배지

색이 초록색으로 변하게 되므로 배지의 색을 관찰하여 초록색을 나타내면 pyocyanine 생성균주로 판명하였다. 배지의 색조에서 pyocyanine생성이 확인되지 않을 경우에는 chloroform을 첨가한 후 진탕하여 정치해 두었다. Pyocyanine이 생성되었을 경우 chloroform에 추출되어 청색층이 생기게 되므로 chloroform 층의 색으로 최종 판정하였다.

### Pyoverdin

Pyoverdin은 King B 배지에서 생성이 증가되어 황록색 형광성을 나타내므로 어두운 곳에서 자외선(파장 360nm 전후)으로 관찰하여 황록색 형광이 관찰되면 pyoverdin 생성균주로 판명하였다.

### Pyorubin

Pyorubin은 King A 배지에서 배양 3일경부터 나타나기 시작하며, 적포도주색을 나타내므로 King A 배지에서 적포도주색을 보이는 균주는 pyorubin 생성균주로 판명하였다.

### Pyomelanin

Pyomelanin은 수용성의 갈색색소로 특별한 색소생성배지가 아니더라도 보통 한천배지나 peptone배지에서도 18~24시간부터 나타나서 배지색을 변화시키므로 한천배지에서 균 발육시 배지색이 갈색으로 변화되는 것을 pyomelanin 생성균주로 판명하였다.

### 세포외효소 검사법

#### 1) Protease 생성 시험

Protease 생성 검출용 배지는 Martley배지를 사용하였으며 제조법은 다음과 같았다. 먼저 milk casein 2g을 0.1 N NaOH 70 ml에 혼합하여 용해시키고, 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>로서 pH 7.6이 되도록 한 다음, 총량이 100 ml이 되도록 증류수를 가하여 2% casein액을 만들었다. 이 casein액과 2배 농도 육즙한천을 동량 혼합하여 고압증기 멸균한 후 1% casein 함유한천평판을 만들었다. 이 평판에 BHI (Brain Heart Infusion : Difco. Lab., Detroit, MI., USA) broth로 37°C 배양기내에서 18~24시간 배양한 상기 균주의 배양액을 멸균한 원판에 적서 이것을 Martley배지 평판상에 두고 37°C 배양기내에서 24~48시간동안 배양한 뒤 배지

내 casein을 분해하여 원판 주위에 투명대를 형성하는 균주를 protease생성 균주로 판정하였다.

## 2) Elastase시험

Elastase생성 검출 배지로는 Sbarra멸균한천 평판배지를 사용하였다. Sbarra 배지는 각기 증류수 100ml에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g을 첨가한 A용액과  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4g, NaCl 0.2g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g,  $\text{MnSO}_4$  0.2g을 첨가한 B용액, 그리고 10% elastin용액을 5:5:100으로 혼합하고 여기에 nutrient agar를 2.3%되게 첨가하여 조제하였다. 이 평판에 BHI broth로 37°C로 배양기내에서 18~24시간 배양한 상기 균주들의 배양액을 멸균한 원판에 적서 이것을 Sbarra배지 평판상에 놓고 37°C 배양기내에서 24~48시간동안 배양한 후에 원판 주위에 나타난 투명대를 관찰하여 elastase 생성균주로 판정하였다.

## 3) Lecithinase 검출법

10% 난황을 가한 BHI 한천배지에 37°C로 2~5일간 배양하여 원판주변에 cream색의 변화가 나타난 것을 lecithinase 생성균주로 판정하였다.

## 항균제 감수성 검사

### 1) 사용배지

항생제 감수성 검사를 위한 증균배지로는 nutrient broth (Difco. lab. Detroit, MI., USA)를 사용하였고, 항생제 감수성 검사에 사용한 배지는 Mueller Hinton broth (Difco. Lab., Detroit, MI., USA)와 Mueller Hinton agar (Difco. Lab., Detroit, MI., USA)를 사용하였다.

### 2) 항생물질

원판확산법을 이용한 감수성 검사에 사용된 항균제 원판은 imipeneme (IPM) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ciprofloxacin (CIP) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , sulfamethoxazol (SXT) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , gentamicin (GM) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , amikacin (AN) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , carumonam (CAR) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ceftazidime (CAZ) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , piperacillin (PIP) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ticarcillin (TIC) 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (BBL, Becton Dickinson Microbiology System Cockeysville, MD, USA)를 사용하였다. 한천회석법에 사용한 항생제로는 aminoglycoside계 2종, kanamycin (KM, Difco. Lab., Detroit, MI, USA), gentamicin (GM, 제일제당 제약, 한국),  $\beta$ -lactam계열 항생제 2종, cefoperazone (CPZ, 한국화이자, 한국), piper-

acillin (PIPC, Sigma Co. St. Louis, USA)을 사용하였다. 각 항균제는 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)가 추천한 바에 따라 용해시킨 후 분리하여 -70°C에 냉동보존하면서 1개씩 취하여 회석하여 사용하였다[22].

### 3) 원판확산법

항생제 감수성 검사를 위하여 Mueller Hinton broth에서 18-24시간 배양한 균액을 표준 백금이를 이용하여 일정량을 Mueller Hinton agar 표면에 균등하게 이식한 후 화염멸균된 forceps를 이용하여 paper 원판을 Mueller Hinton agar 표면에 균등한 간격으로 놓고 4°C에서 2시간 두었다가 37°C에서 24시간 배양하여 paper 원판 주변의 균발육저지 범위를 Table 1과 비교하여 감수성 여부를 판정하였다[20,33].

### 4) 평판회석법

항생물질을 규정된 용매에 녹인 후 증류수로 회석하여 사용하였으며, 순차적으로 배수로 회석된 농도로 함유하는 평판배지에 37°C에서 24시간 배양한 균액을 Steer's multiple inoculator[24]로 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 접종부위의 균 발육 유무에 따라 항균제의 최소발육 저지농도를 결정하였다(Table 2). 항생제별 내성 범위는 미국 NCCLS의 기준에 의하였으며, 결과의 정도 관리를 위하여 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 함께 사용하였다.

## 결 과

### 분리균주

분리한 녹농균의 분포는 Table 3과 같다. 전체 72균주 중에서 객담에서 분리된 균주가 36주로 전체의 50%를 차지하였고, 다음으로 농에서 15주(20.8%), 뇨에서 13주(18.0%) 순으로 분리되었다.

### 색소생성능

King A 와 King B 배지에서 녹농균의 색소생성 양상을 Table 4와 Fig. 1에 나타내었다. King A 배지에서 녹색으로 나타난 pyocyanine과 적포도주색의 pyoverdine을 관찰할 수 있었고 King B 배지에서 형광색의 pyoverdine을 볼 수 있었다. 녹농균들의 색소 생성능을 살펴보면 전체 72균주 중에서 pyoverdine 만을 생성하는 균주와 pyocyanine과

Table 1. Zone of diameter standard

Antibiotics	Content of antibiotics ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Zone of diameter (mm)		
		R	I	S
Imipeneme	10	13	14-15	16
Ciprofloxacin	5	15	16-20	21
Sulfamethoxazole	25	10	11-15	16
Gentamicin	10	12	13-14	15
Amikacin	30	14	15-16	17
Carumonam	30	17	18-22	23
Ceftazidime	30	14	15-17	18
Cefoperazon	75	12	13-17	18
Ticarcillin	75	14	-	15

R: resistant, I: intermediate, S: susceptible.

Table 2. MIC of agar plate method

Results	Standards
Minimal Inhibitory Concentration (MIC $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Minimal concentration of growth inhibitor
MIC <sub>50</sub>	Concentration of 50% growth inhibitor
MIC <sub>90</sub>	Concentration of 90% growth inhibitor

Table 3. Isolated strain from clinical specimens

Source	No. of strain (%)
Sputum	36(50.0)
Pus	15(20.8)
Urine	13(18.0)
Stool	3( 4.2)
Burn skin	3( 4.2)
Blood	2( 2.8)
Total	72(100)

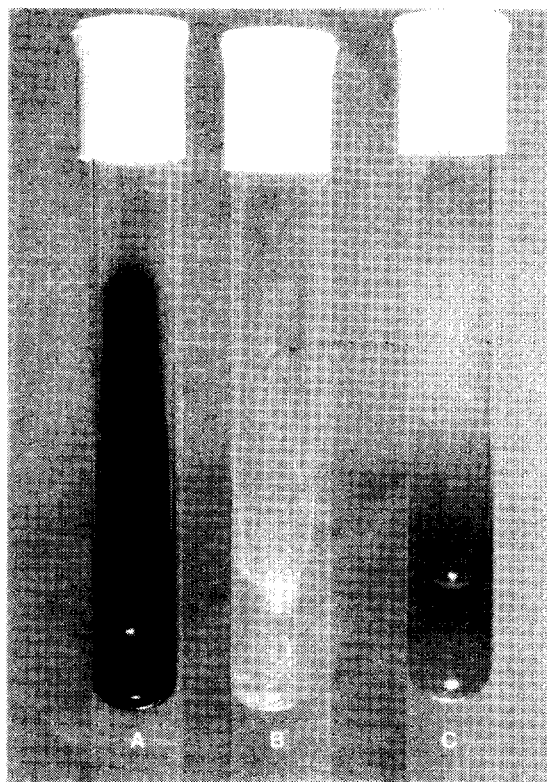


Fig. 1. Pigment production on King A and King B medium by *Pseudomonas aeruginosa*.

A: pyorubin, B: pyoverdin, C: pyocyanine.

pyoverdin을 동시에 생성하는 균주가 17주 (23.6%)로 가

장 많았고, 그 다음으로는 무색소균주가 13주 (18%)로 높은 비율을 나타내었다. Pyoverdin과 pyomelanin을 동시에 생성하는 균주는 7주 (9.7%)였으며, pyoverdin과 pyorubin을 동시에 생성하는 균주가 4주 (5.5%)로 나타났다. 각각의 분리부위에 따른 색소 생성여부를 살펴본 결과, 객담과 농에서는 pyoverdin만을 생성하는 균주가 가장 많았고, pyocyanine과 pyoverdin의 동시 생성균주가 다음으로 높은 비율을 보였다. 뇨에서는 무색소균주가 가장 많았고 pyocyanine과 pyoverdin을 동시에 생성하는 균주가 다음으로 많았다.

#### 세포외효소 생성능

각 균주들에 대한 세포외효소로 protease, elastase 및 lecithinase를 검사한 결과를 Table 5에 나타내었다. Protease와 elastase를 동시에 생성하는 균주가 전체의 26.4%인 19주로 가장 많았으며, protease만을 생성하는 균주가 17주 (23.6%)로 대다수의 균주가 protease를 생성하는 것으로 나타났다. 그러나 이 세 가지 효소 모두를 생성하지 않는 균주도 13주(18%)로 나타났다. 객담과 농에서는 protease와 elastase의 동시 생성균주가 가장 많았고, 뇨에서는 protease만을 생성하는 균주가 가장 많았다.

Table 4. Pigment-production of *Pseudomonas aeruginosa*

Pigment Production	Sputum	Pus	Urine	Stool	Burn skin	Blood	Total (%)
PV only	9	5	1	1		1	17 (23.6)
PC+PV	8	4	4		1		17 (23.6)
None	2	2	5	2	2		13 (18 )
PV+PM	5	2					7 ( 9.7)
PV+PR	1	2				1	4 ( 5.5)
PC only	3						3 ( 4.2)
PC+PV+PM	2		1				3 ( 4.2)
PR+PM	2		1				3 ( 4.2)
PR only	2						2 ( 2.8)
PM only	1						1 ( 1.4)
PC+PR+PM	1						1 ( 1.4)
PC+PM			1				1 ( 1.4)
Total	36	15	13	3	3	2	72 (100)

PC: pyocyanine, PV: pyoverdin, PR: pyorubin, PM: pyomelanin.

Table 5. Exoenzyme production by *Pseudomonas aeruginosa*

Exoenzyme			No. of strains from isolated						Total (%)
Protease	Elastase	Lecithinase	Sputum	Pus	Urine	Stool	Burn skin	Blood	
+	+	-	12	5	1			1	19 (26.4)
+	-	-	8	4	4		1		17 (23.6)
-	-	-	7	2	3	1			13 (18.0)
+	-	+	5	1	1				7 ( 9.7)
-	-	+	0	1	3	2	1		7 ( 9.7)
+	+	+	3	1	0				4 ( 5.6)
-	+	-	1	1	0			1	3 ( 4.2)
-	+	+	0	0	1		1		2 ( 2.8)
Total			36	15	13	3	3	2	72 (100)

### 항생제 감수성 및 최소발육저지농도

#### 1) 원판확산법

임상환자에서 분리한 20균주에 대한 원판확산법을 실시한 결과는 Table 6과 같다. 대부분의 균주가 SXT를 제외한 조사한 모든 항생제에 대하여 비교적 높은 감수성을 보였다. IPM에 대한 감수성 균주가 80%로 가장 높았으며, CAR에 대해서는 70%을, AN과 CPZ에 대해서는 65%, 나머지 CIP, GM, CPZ 및 TIC에서는 60%의 감수성을 보였다. SXT에 대해서는 전체 20균주 중 무려 90%인 18주가 내성을 나타내는 것으로 나타났다. 즉, SXT이외의 항생제에 대해서는 모든 균주가 최소 60%이상의 감수성을 보였다.

#### 2) 한천회석법

전체 72균주를 대상으로 KM, GM, CPZ 및 PIPC에 대한 균의 발육유무를 관찰하여 MIC를 결정하였다(Table 7). 먼저 Asp계 항생물질 중에서 KM은 최저 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최고 1024  $\mu\text{g}/\text{ml}$  사이에 MIC가 분포되고 있었으며, GM은 2~512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 사이에 분포되어 있었다. Asp계 항생물질 중에서는 GM보다 KM에 더 강한 내성을 보이는 것으로 나타났다.  $\beta$ -lactam계 항생물질 중에서는 CPZ보다 PIPC가 더 넓은 MIC 범위와 높은 내성을 나타내었다. CPZ의 MIC 범위는 최저 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최고 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, PIPC의 경우는 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1024  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 조사한 항생

감염환자에서 분리한 녹농균의 특성에 관한 연구

Table 6. Several kinds of antibiotics determined by disc diffusion

Antibiotics	Disc content of antibiotics ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of strains (%)		
		R	I	S
Imipeneme	10	3(15)	1( 5)	16(80)
Ciprofloxacin	5	4(20)	4(20)	12(60)
Sulfamethoxazole	25	18(90)	1( 5)	1( 5)
Gentamicin	10	8(40)		12(60)
Amikacin	30	5(25)	2(10)	13(65)
Carumonam	30	5(25)	1( 5)	14(70)
Ceftazidime	30	4(20)	3(15)	13(65)
Cefoperazone	30	2(20)	2(20)	16(60)
Ticarcillin	75	8(40)		12(60)

물질 중 가장 넓은 내성 범위를 보여주었다.

각 항생제에 대한 MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>을 구한 결과 (Table 7) 각각 KM은 128, 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , GM은 8, 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , CPZ는 8, 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PIPC는 8, 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 전체적으로  $\beta$ -lactam계 항생물질보다는 Asp계 항생물질에 더 강한 내성을 보이며, Asp계 중에서 KM에 가장 강한 내성을,  $\beta$ -lactam계 중에서는 PIPC에 가장 감수성을 보였다.

고 찰

자연계에 널리 분포하는 녹농균은 극히 미량의 유기물질을 함유하는 환경과 5-42°C의 폭 넓은 기온하에 증식

Table 7. Antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotics	Source	No. of strains showing MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )											MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	Total		
KM	Sputum			2		3	10	6	7	4	4	36	128	512
	Pus			3	1		1	1	7	2	15			
	Urine						4	3	1	4	1	13		
	Stool					1		2			3			
	Burn skin			1			2				3			
	Blood						1		1		2			
	Subtotal			6	1	4	18	12	16	10	5	72		
GM	Sputum	6	4	12	5	1	1		7			36	8	256
	Pus	4		5	2				3	1		15		
	Urine			4	5	1	1		2			13		
	Stool	1			1	1						3		
	Burn skin	1		2								3		
	Blood			2								2		
	Subtotal	12	4	25	13	3	2		12	1		72		
CPZ	Sputum			25	3	3	1	3	1			36	8	128
	Pus			9		2	1	1	2			15		
	Urine		1	3	4		1	2	2			13		
	Stool			1				1	1			3		
	Burn skin			3								3		
	Blood			1	1							2		
	Subtotal		1	42	8	5	3	7	6			72		
PIPC	Sputum	4	2	15	5	4	2	1	2	1		36	8	64
	Pus	2		8	3		3	1	4		1	15		
	Urine	1	2	3	1	2	1	1		2		13		
	Stool			1			1		1			3		
	Burn skin	1		1	1							3		
	Blood			1			1					2		
	Subtotal	8	4	29	10	6	8	3	7	3	1	72		

KM: kanamycin, GM: gentamicin, CPZ: cefoperazone, PIPC: piperacillin.

할 수 있는 특성을 지니고 있어 흙, 물 및 식물 등에서 자주 분리되며 병실에서도 고빈도로 검출되고 있다[23]. 녹농균은 사람의 장관내 정상균총에 포함되지만 건강한 개체의 약 10%에서만 분리되며 피부 특히 습한 부위인 액와부, 서혜부, 회음부 또는 타액 등에서 간헐적으로 발견되기도 한다[14].

녹농균은 본래 약독균으로 정상인에게 감염되는 경우는 매우 희박하지만 저항력이 약화된 환자에게는 감염이 용이하여 병원감염원으로 된다. 녹농균에 의한 감염의 부위별 빈도는 보고자에 따라 차이는 있으나, 화상, 수술부위를 포함한 모든 창상에서 빈도가 가장 높다고 한다[12].

녹농균은 각종 소독제와 항생제에 대한 저항성이 높아 이 균에 감염되었을 경우 치료에 많은 어려움이 따르며, 일반 항생물질 투여에 의하여 타세균의 발육이 억제되는 경우, 병변부위에서 녹농균의 상대적 증식으로 인해 항생물질 투여에 의한 균교대 현상들이 나타나 녹농균은 중요한 병원내 감염균주로 대두되었다[14]. 실제로 악성 종양이나 중증 화상환자, 그 외 선행질환이 있거나 스테로이드 또는 면역억제제, 항암제 방사선치료 등 숙주의 저항력을 약화시키는 여러 인자가 작용하면 발병이 촉진되며 이 경우 녹농균의 감염은 치명적인 결과를 초래하게 된다. 이같은 병원감염 원인군 가운데 녹농균은 약 10-20%를 점유하고 있고, 더욱이 낭성 섬유증 환자의 주요 원인균으로도 알려져서 점차 이 균의 병원성, 역학 및 치료 등에 관심이 높아지게 되었다[14].

기회감염원 중에서 가장 중요한 녹농균 감염증의 발병 인자에 대하여서는 숙주측의 원인이 중요시되고 있다. 그 외에 균자체의 인자, 항생제의 영향 등도 그 하나의 요인으로 생각된다. 현재까지 알려진 녹농균의 병원성 인자로는 lipopolysaccharide를 비롯하여 exotoxin, protease, elastase, lecithinase, collagenase, glycolipid, surface slime, leucocidin(cytotoxin), enterotoxin, pigment 및 exoenzyme S 등이 있다[29]. Morihara 등[21], Pollack 등[27], Bjorn[3] 및 Sania[28] 등의 보고에 의하면 대부분의 녹농균의 가검물분리균주 중에서 외독소 생성율은 80%의 높은 빈도를 보이며, Liu 등[18], Shoda 등[30], 및 심 등[31]의 보고에는 녹농균 균주의 77-89%가 *in vitro*에서 외독소를 생성하고 병원 분리균주는 27%정도였다고 보고하여 균체의독소 생성이 병원성에 어떤 영향을 끼칠 것이라는 가능성을 시

사하고 있다. 지금까지 보고된 바에 의하면 녹농균의 protease와 elastase는 collagen, elastin, proteoglycan, complement, 섬유소원, immunoglobuline,  $\alpha$ -proteinase inhibitor, 및 human bronchial mucosal proteinase inhibitor 등을 분해하며, 토끼와 쥐에서 장기출혈, carrageenin성 부종 억제와 혈관투과성 항진 등의 작용을 나타낸다고 한다. 본 실험에서 조사한 결과로는 protease와 elastase를 동시에 생성하는 균주가 전체의 26.4%로 가장 많았으며, protease만을 생성하는 균주가 23.6%, 모두 생성하지 않는 균주는 18%로 대다수의 균주가 protease를 생성하는 것으로 나타났다. 분리 장소에 따라서는 객담에서 protease와 elastase 동시의 생성균주가 가장 많았고, 뇨에서는 protease만을 생성하는 균주가 가장 많았다. Elastase와 protease를 동시에 생성하는 균주는 76.3%, 다음이 비생성균주로 12.0%, elastase 단독 생성균주 7.5%, protease 단독 생성균주가 4.1%의 순으로 보고되어 있는데[6] 본 연구의 결과에서와 마찬가지로 protease와 elastase 동시 생성균주가 가장 높은 비율을 보인다는 것은 이들 세포의효소가 병원성에 있어 중요함을 나타내고 있다.

녹농균의 색소생성과 관련된 보고에서는 대다수의 균주가 pyocyanine, pyoverdin을 생성하고 일부가 pyorubin을 생성한다고 알려져 있다. 본 연구의 결과에서는 전체 72균주 중에서 pyoverdin 만을 생성하는 균주와 pyocyanine과 pyoverdin을 동시에 생성하는 균주가 23.6%로 가장 많았고, 다음으로는 무색소균주가 18%로 높은 비율을 나타내었다. 각각의 분리부위에 따른 색소 생성여부는 객담과 뇨에서는 pyoverdin만을 생성하는 균주가 가장 많았고, pyocyanine과 pyoverdin 동시 생성균주가 다음으로 높은 비율을 보였다. 뇨에서는 무색소균주가 가장 많았고 pyocyanine과 pyoverdin을 동시에 생성하는 균주가 다음으로 많았다. 병원가검물 중 객담 유래균주에서 pyocyanine, pyoverdin의 동시 생성균주가 가장 높았고, 기타 가검물 유래균주에서 특징적인 분포를 관찰할 수가 없었다는 보고[24]와 동일한 결론을 얻었다.

녹농균 진단에는 이 균의 생물학적 성상 가운데 특히 pyocyanine 색소생성에 의한 검사법이 가장 간단하지만, 병원 가검물의 분리균에서 pyocyanine 비생성균이 증가하고 있으며, 최근에는 pyocyanine보다 pyoverdin 생성균이나 무색소균이 증가하는 추세이다[12]. 녹농균이 생성하는

색소 중 pyocyanine은 산소기 생성을 증가시킴으로서 항균활성을 타나내며, 세포기능을 변경시켜 호기적인 해당과정이 요구되는 조직의 호흡은 증가시키고 mouse monocyte, Hela cell, 및 mouse liver mitochondria에 의한 분자상의 산소의 흡수를 저해한다고 알려져 있다[16]. Pyocyanine의 항균작용은 산소와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재에 따라 발휘되고 특히 그람 양성균에 대해서 항균활성을 나타내지만 동시에 점막의 섬모운동의 억제, lymphocyte 증식의 억제 등의 독성도 나타낸다. 한편 pyocyanine은 보통의 호흡기 병원균의 증식을 억제하는 반면 *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* 그리고 *Pneumonia*에는 내성을 나타내었다. *Escherichia coli*의 산소동화를 촉진하는 것으로 보아 산소기의 증강으로 항생제 효과를 나타낸다고 하였으며 [16], 이 활성은 또한 감염부위의 조직손상도 증가시킬 우려가 있다고 하였다. 또한 pyocyanine은 기관지 상피세포에서 calcium signaling을 변화시키는데, 저농도에서는 1,4,5-triphosphate 형성과 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가를 억제하고 G protein-coupled receptor agonists를 증가시키며, 고농도에서는 pyocyanine이 직접적으로 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시킨다고 한다[10].

Pyocyanine-dependent Ca<sup>2+</sup> 증가는 oxidant-dependent로 inositol triphosphate와 세포내에 축적되어 있던 Ca<sup>2+</sup>의 방출에 의하며 Ca<sup>2+</sup>는 이온 수송의 조절과 mucus secretion, ciliary beat frequency에 관여하는 epithelial cell function에 중요한 인자로 pyocyanine은 Ca<sup>2+</sup>의 항상성을 파괴하여 이러한 기능을 방해한다[10]. Pyoverdin은 녹농균에 주요한 siderophore로 iron gathering capacity를 가지므로 human iron-binding protein인 transferrin과 경쟁적으로 작용한다. 이것은 세포내에서의 iron gathering과 녹농균의 균력에 매우 중요하다[11].

Kwon 등[16]의 보고에서 병원에서 분리한 녹농균 중 pyocyanine과 pyomelanin을 동시에 생성하는 균주가 *Staphylococcus aureus*의 발육을 크게 억제하였고 pyocyanine을 추출하여 저해능을 검토해 본 결과 methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대해서는 16배, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)에 대해서는 2배의 희석 농도까지 항균활성이 95%이상이었다고 한다. 이와 같은 실험결과에 따르면 임상적으로 녹농균이 검출될 경우 균이 생성하는 억제물질이 MRSA의 증식을

억제할 가능성이 있으므로 녹농균에 의한 화학요법의 시행은 반대로 MRSA에 의한 균교대증의 위험성도 내포하고 있다.

녹농균에 의한 감염증은 많은 약제에 내성이 많아서 치료에 문제가 되고 있는데, 이러한 균종의 대부분은 화학요법제 뿐만 아니라, 일반적인 소독약에도 저항성을 나타내는 multiple-antibiotic resistant (MAR)이며 화학치료법 중에 저항성을 얻는 것으로 알려져 있다[2,13,26]. 이러한 균주들은 resistant plasmid나 integron 같은 transposable element를 획득하여  $\beta$ -lactamase나 aminoglycoside modifying enzyme을 생성하게 된다. 따라서 계속적으로  $\beta$ -lactamase를 과생성하거나 세포막의 penicillin-binding proteins의 구조를 변화시킬 수도 있다[32]. 더욱이 녹농균은 세포외막의 투과성을 감소시킴으로써 항생제 저항성을 얻게 되며 외막의 LPS나 외막단백질의 생성으로 여러 가지 다양한 efflux mechanism을 통해 MAR을 일으킨다[19].

Chen 등[4]에서는 carbenicillin과 CAZ, IPM, meropenem에 대해 조사한 372균주가 저항성으로 이 중에 13주가  $\beta$ -lactamase를 생성하며, 대부분의 균주는  $\beta$ -lactamase independent intrinsic resistance이며 이러한 균주들이 점차 늘어나고 있는 추세라고 한다[4].

본 실험에서 분리한 20균주에 대한 원관확산법을 실시한 결과는 대부분의 균주가 SXT에는 20%만이 감수성을, 이를 제외한 조사한 모든 항생제에 대해서는 최소 60%이상의 높은 감수성을 보였다. 전체 72주를 대상으로한 한천희석법에 의한 MIC를 측정된 결과, Asp계 항생물질 중에서는 GM보다 KM에 더 강한 내성을 보이는 것으로 나타났고  $\beta$ -lactam 계 항생물질 중에서는 CPZ보다 PIPC가 더 넓은 MIC 범위와 높은 내성을 나타내었다.

각 항생제에 대한 MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>을 구한 결과 전체적으로  $\beta$ -lactam계 항생물질보다는 Asp계 항생물질에 더 강한 내성을 보이며, Asp계 중에서 KM에 가장 강한 내성을  $\beta$ -lactam계 중에서는 PIPC에 가장 감수성을 보였다. 녹농균에 의한 감염증은 다제내성이 많아 치료가 어렵고, 한가지 약제보다도 서로 작용기전이 다른 약제를 동시에 사용하여 그 상승작용에 의한 효과를 현재 이용하고 있다[10]. 그러나 이러한 약제에 대해서도 빠르게 내성균주가 나타나고 있으므로 녹농균 감염에 대한 안전하고 적절한 화학요법에 대한 연구가 계속적으로 이루어져야 하겠다.



최근까지 녹농균에 의한 병원감염을 감소하기 위한 연구로는 항생제 저항성, 혈청형, bacteriocin (pyocin) typing, phage typing, multilocus enzyme electrophoresis 및 electrophoretic cell protein profiles 등이 다양한 분야로 행해지고 있다. 그러나 좀 더 효율적인 녹농균 진단과 치료가 이루어질 수 있도록 정확하고 재현성있는 보다 체계적인 방법으로서의 역학적 연구가 필요하겠다.

## 요 약

감염환자의 임상가검물 중에서 뇨, 객담, 농, 혈액, 대변 및 화상피부에서 분리하여 72균주의 녹농균을 대상으로 색소생성과 세포외효소 생성 및 항생제 감수성 시험과 각 항생제에 따른 최소발육저지 농도등의 특성을 검토한 결과는 아래와 같았다.

1. 색소생성능은 72균주 중에서 pyoverdin 만을 생성하는 균주와 pyocyanine과 pyoverdin을 동시에 생성하는 균주가 23.6%로 가장 많았고, 다음으로는 무색소균주가 18%였다. Pyoverdin과 pyomelanin을 생성하는 균주는 9.7%였고, pyoverdin과 pyocyanine을 함께 생성하는 균주는 5.5%였다. 객담과 농에서는 pyoverdin만을 생성하는 균주가 가장 많았고, 뇨에서는 무색소균주가 가장 많았다.

2. 세포외 효소 생산시험에서는 protease와 elastase 및 lecithinase를 동시에 생성하는 균주가 전체의 5.6%였으며, protease와 elastase만을 생성하는 균주는 전체의 26.4%로 가장 많았다. 객담과 농에서는 대부분의 균주가 protease와 elastase를 동시에 생성하였다.

3. 20균주에 대한 원판확산법을 실시한 결과 대부분의 균주가 SXT에서는 높은 내성(90%)을 보였고 그 외의 항생제에 대해서는 60%이상의 비교적 높은 감수성을 보였다. 전체 72주를 대상으로 한천회석법에 의한 MIC를 측정 한 결과 Asp계 항생물질 중에서 KM은 최저 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최고 1024  $\mu\text{g}/\text{ml}$  사이에, GM은 2~512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 사이에 분포되어 있었다. M<sub>IC50</sub>과 M<sub>IC90</sub>을 구한 결과, 각각 KM은 128과 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , GM은 8과 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , CPZ는 8과 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PIPC는 8과 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 전체적으로 KM에는 가장 강한 내성을 보였으며, PIPC에는 가장 높은 감수성을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Abdul, N. H., John, A. G., Christopher M. D. 1996. Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. *Journal of Surgical Research* **61**, 425-432
2. Archibald, L., L. Phillips, D. Monnet, J. E. Jr McGowan, F. Tenover and R. Gaynes. 1997. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States. Increasing importance of the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 211-125.
3. Bjorn, M. J., M. I. Vail, J. C., Sadoff and B. H. Iglewski. 1977. Incidence of exotoxin production by *Pseudomonas aeruginosa* species. *Immun. Immun.* **16**, 362-366.
4. Chen, H. Y., M. Yuan and D. M. Livemore. 1995. Mechanism of resistance to  $\beta$ -lactamase antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolate collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.* **43**, 300-309.
5. Choi, H. J., G. J. Choi, Y. B. Kim, Y. H. Oh 1991. Studies on the production of exoenzyme, pigment and serotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Journal of Pusan National University Hospital* **31**, 99-107
6. Chung, H. J., I. S. Suh 1981. Studies on correlation of R factor, extracellular enzyme production, serotype or pyocine type of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hanyang Med. College* **1**, 73-91
7. Doring, G. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. 245-260 Plenum Press, New York.
8. Feingold, D. S. 1970. Hospital acquired infections. *New Eng. J. Med.* **283**, 2384-2391.
9. Gerald, P. B. 1985. *Pseudomonas* bacteremia *Arch Intern Med.* **145**, 1621-1629
10. Gerene, M. D., A. R. Michelle, T. R. George, D. C. Charles and E. B. Bradely. 1998. *Pseudomonas pyocyanine* alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **274**, L893-L900.
11. Jean, M. M., Alice, N., Alain, S., Claude, G., Ian, H. 1996. Pyoverdin is essential for virulence *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 518-523.
12. Jung, J. S. Y. B. Kim, Y. H. Oh 1994. Antibiotic susceptibility and change in serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pusan National University Hospital.* **34**, 31-40.

13. Kim, Y. B. 1984. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *J. Busan Med. Assoc.* **20**, 13-19.
14. Z. Korean society for microbiology. 1997. Textbook of medical microbiology 2nd ed. Seo-heung press. Seoul, 479-487.
15. Kronberg, G. 1995. Lipopolysacchride (LPS): LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS* **103**, 1-30.
16. Kwon, Y. S, M. G. Kim, M. J. Kim, S. K. Yun, Y. B. Kim and Y. H. Oh. 1993. Antimicrobial activity of pyocyanine from *Pseudomonas aeruginosa* against *Staphylococcus aureus*. *J. Pusan. Med. Coll.* **33**, 31-37.
17. Lim, Y.Z., M. G. Kim, M. J. Kim, S. G. Yoon, Y. B. Kim, Y. H. Oh. 1994. Combined action of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **29**, 449-457.
18. Lui, P. V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **130**, S94-S99.
19. Masuda, N and S. Ohya. 1992. Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1847-1851.
20. Morgan, M. S. 1995. Perceptions of a medical microbiology service: A survey of laboratory users. *J. Clin. Pathol.* **48**, 915-918.
21. Morihara, K. 1967. Production of elastase and protease by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **88**, 745-757.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1983. Standard methods of dilution antimicrobial suseptibility tests of bacteria that grow aerobically. Villanova, NCCLS, USA.
23. Palleroni, N. J., 1984. *Pseudomonasceae*. in Krieg NR. Holt JG (eds) : Bergy's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, **1**, 140-218.
24. Park, J. H., W. S. Han and Y. J. Cho. 1984. Pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J. Hanyang Med. College* **4**, 331-339.
25. Park, K. W., Y. J. Cho 1982. Serotypes and sensitivity distribution of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **17**, 57-66.
26. Philips, I. 1969. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J. M. Microbiol.* **2**, 9.
27. Pollack, M., N. S., Taylor and L. T. Callahan. 1977. Exotoxin: A production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **15**, 776-870.
28. Sanai, Y., K. Takeshi, Y. Homma and H. Kamata. 1978. Production of exotoxin, protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from patients and environmental specimens. *Jpn. J. Exp. Med.* **48**, 553-556.
29. Scharman, W. 1976. Formation and isolation of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa* species. *J. Gen. Microbiol.* **93**, 283-291.
30. Shoda, M. 1981. Exotoxin production by clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Jpn. Assoc. Infec. Dis.* **55**, 898-901.
31. Sim, K. S., Y. J. Cho and I. S. Suh. 1985. Exotoxin production by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens and hospital environments. *J. Hanyang Med. College* **5**, 337-346.
32. Spratt, B. G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alteration. *Science* **264**, 388-393.
33. Tobita, M, N. Kobayashi, H. Hirasawa, K. Konno, O. Urayama, O. Nakagomi, A. Miura and S. Uesugi. 1996. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in the Akita University Hospital : Surveillance and microbiology data Rinsho-Byori **44**, 367-372.