

Infrequent-Restriction-Site Polymerase Chain Reaction을 이용한 *Legionella pneumophila*의 분자역학적 분석

김정만¹, 김경희¹, 송은주², 이선민², 이은엽², 박은희³, 장철훈²

동아대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 부산대학교 의과대학 진단검사의학교실²
부산광역시 보건환경연구원 미생물과³

배 경 : 레지오넬라는 집단 감염을 흔히 유발하므로 레지오넬라의 감염원 확인은 이 질환의 예방과 전파 차단에 매우 중요하다.

방 법 : 부산과 경상남도 소재한 호텔 등 대형 건물의 냉각탑에서 분리된 *Legionella pneumophila* 31균주, 일본의 레지오넬라증 환자의 객담 또는 폐 조직에서 분리된 12균주 및 표준균주(*L. pneumophila* ATCC 33152)를 대상으로 하여 infrequent-restriction-site (IRS) 중합효소연쇄반응 (PCR) 방법으로 형별 분류를 시도하였다.

결 과 : IRS-PCR에 의한 증폭 산물 중 200-1000 bp 크기의 분절로 유형을 분석한 결과, 각 균주는 7-16개의 분절이 증폭되었으며, 표준균주를 포함하여 총 44개의 균주 중 증폭 산물의 양상이 90% 일치도를 보이는 두 검체를 제외한 43개의 분리균에서 각기 다른 유형을 보였다.

결 론 : IRS-PCR을 이용한 레지오넬라의 형별 분류는 분별력이 우수한 검사로 집단감염이 의심될 때 감염원의 동일성을 증명하는데 빠르고 유용한 검사임을 확인할 수 있었다.

서 론

Legionella 속은 냉각탑수, 증발형 콘덴서, 온수 탱크 등의 인공 환경에서 증식하면서 바람과 샤워시 발생하는 에어로졸에 포함되어서 호흡기를 통하여 사람에게 감염을 일으킨다[1]. *Legionella pneumophila*는 15개의 혈청형으로 나누어지는데, 이중 혈청형 1이 가장 흔하여 레지오넬라 폐렴 환자의 90%에서 분리되었다고 보고되고 있으며[2], 아시아 지역의 경우 원인이 밝혀진 폐렴 중 6%가 레지오넬라에 의한 폐렴으로 밝혀졌다[3]. 그러나 1985년부터 최근까지 전국 주요 도시의 냉각탑수에서 *Legionella* 속의 평균 분리율이 60% 이상으로 보고되고 있고 특히 냉각탑수 등에서 발생하는 감염성의 에어로졸

은 레지오넬라 감염증의 집단발병의 원인이 될 수 있다는 점에서 앞으로 레지오넬라에 의한 폐렴이 증가할 것으로 예측된다[4, 5]. 그 예로 국내에서 1984년에 이미 비 폐렴성 레지오넬라증의 집단감염 사례가 기록된 바 있으며[6], 면역저하 환자들에서 중증의 원내 폐렴을 유발함이 보고되고 있다[7]. 특히, 대도시의 대형 건물의 냉각탑의 대다수가 레지오넬라에 오염되어 있어[8], 여름철에 레지오넬라 집단 감염의 발생 우려가 잠재해 있다.

특히 레지오넬라는 집단 감염을 흔히 유발하므로 레지오넬라의 감염원 확인은 이 질환의 예방과 전파 차단에 매우 중요하며, 감염원의 규명을 위하여 환경 분리균과 실제 환자 분리균주 간의 역학적 연관성을 결정할 수 있는 방법이 요구된다.

본 연구에서는 환경이나 환자의 검체에서 이미 분리된 레지오넬라 균을 대상으로 하여 Riffard 등[9]이 고안한 infrequent-restriction-site (IRS) 중합효소연쇄반응 (PCR) 방법으로 형별 분류를 시도함으로써, 여러 지역에서 검출된 균들의 형별 구분을 확인해 보고, 향후 집단 감염의 발생 등으로 역학적 조사가 요구될 때 본 방법의 사용가능 여부를 확인해 보았다.

이 논문은 2004학년도 동아대학교 학술연구비 (공모과제) 지원에 의하여 이루어졌음.

접 수 일: 06/2/23 게재승인일: 06/3/17

교신저자: 장철훈

(602-739) 부산광역시 서구 아미동 1-10번지
부산대학교병원 진단검사의학과

TEL: (051)240-7417 FAX: (051)247-6560

E-mail: CCHL@pusan.ac.kr

Table 1. *Legionella pneumophila* strains used in this study

Strain No.	Source	Species	Strain No.	Sources	Species
B1	Jung A	<i>L. pneumophila</i> 7-14	B22	Tongyoung	<i>L. pneumophila</i> 5
B2	Jung B	<i>L. pneumophila</i> 7-14	B23	Busanjin A	<i>L. pneumophila</i> 1
B3	Jung C	<i>L. pneumophila</i> 1	B24	Busanjin B	<i>L. pneumophila</i> 5
B4	SKT, 350RT	<i>L. pneumophila</i> 1	B25	Buk A	<i>L. pneumophila</i> 7-14
B5	Gangseo A	<i>L. pneumophila</i> 7-14	B26	Haemin	<i>L. pneumophila</i> 5
B6	Gangseo b	<i>L. pneumophila</i> 1	B27	Gimhae A	<i>L. pneumophila</i> 5
B7	Saha A	<i>L. pneumophila</i> 6	B28	Gimhae B	<i>L. pneumophila</i> 1
B8	Nam	<i>L. pneumophila</i> 5	B29	Busanjin C	<i>L. pneumophila</i> 7-14
B9	Saha B	<i>L. pneumophila</i> 5	B30	Buk B	<i>L. pneumophila</i> 7-14
B10	Haeundae A	<i>L. pneumophila</i> 1	B31	Busanjin D	<i>L. pneumophila</i> 7-14
B11	Haeundae B	<i>L. pneumophila</i> 1	J1	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B12	Gijang	<i>L. pneumophila</i> 1	J2	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B13	Suyeong	<i>L. pneumophila</i> 1	J3	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B14	Jung D	<i>L. pneumophila</i> 7-14	J4	sputum	<i>L. pneumophila</i> 5
B15	Dongnae A	<i>L. pneumophila</i> 1	J6	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B16	Seo	<i>L. pneumophila</i> 7-14	J7	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B17	Dongnae B	<i>L. pneumophila</i> 1	J8	BAL	<i>L. pneumophila</i> 1
B18	Masan	<i>L. pneumophila</i> 5	J9	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B19	Hansu A	<i>L. pneumophila</i> 5	J10	sputum	<i>L. pneumophila</i> 1
B20	Hansu B	<i>L. pneumophila</i> 5	J12	sputum	<i>L. pneumophila</i> 3
B21	Hansu C	<i>L. pneumophila</i> 7-14	ATCC33152		<i>L. pneumophila</i> 1

Abbreviation. BAL, bronchoalveolar lavage.

방 법

1. 균주

2001년 7월에 부산과 경상남도에 소재한 호텔 등 대형 건물의 냉각탑에서 분리된 *L. pneumophila* 31균주(B1-31), 1994년부터 2002년에 일본의 레지오넬라증 환자의 객담 또는 폐 조직에서 분리된 12균주(J1-12, *L. pneumophila* 10균주, 기타 레지오넬라 균 2균주) 및 표준 균주(*L. pneumophila* ATCC 33152)를 대상으로 하였다 (Table 1). 또한 동일 감염원에 의한 집단 발생 균주를 확보할 수 없었기 때문에, 같은 균주의 IRS-PCR 분절 양상이 동일하게 나타나는지를 확인하기 위해 국내 검출 균주 중 임의의 1균주를 수차례 계대배양하면서 각 세대의 균주에서 DNA를 추출하여 IRS-PCR을 실시하였다.

2. 균의 분리 및 동정

대형 빌딩 환경수로부터 균을 분리한 방법은 냉각탑수를 채수하여 여과지에 통과시킨 후 여과지를 절단하여 여액에 부유하고 50℃에서 열처리한 후 항생제와 영양물

질이 첨가된 buffered charcoal yeast extract (BCYE, Difco, Detroit, MI, USA) 한천배지에 접종하여 90% 습도를 유지한 35℃ 배양기에서 10일간 배양하였다. 균의 동정은 4일 후부터 자라나온 회백색의 집락을 BCYE 한천배지와 혈액한천배지에 동시에 접종하여 BCYE 한천배지에서는 자라나 혈액한천배지에서는 자라지 못하는 균을 대상으로, 그람 음성, catalase 양성인 균을 *Legionella* 속으로 추정하여 혈청형으로 동정하였다. 동정 및 혈청형 확인은 *Legionella* latex test kit (Oxoid Inc., Hampshire, UK)와 *Legionella* antisera (Denka Seiken, Tokyo, Japan)를 통해 확인하였다.

3. IRS-PCR

1) Adaptor 제조

AX1 (5'-PO4-CTA GTA CTG GCA GAC TCT), AX2 (5'-GCC AGT A) 혹은 PS1 (5'-GAC TCG ACT CGC ATG CA), PS2 (5'-TGC GAG T)를 각각 20 pmol씩 섞고 1×PCR 완충액을 넣어 thermal cycler에서 80℃에서 4℃로 천천히 내려주어 adaptor를 제조하였다[8].

2) 제한효소 처리 및 adaptor의 연결

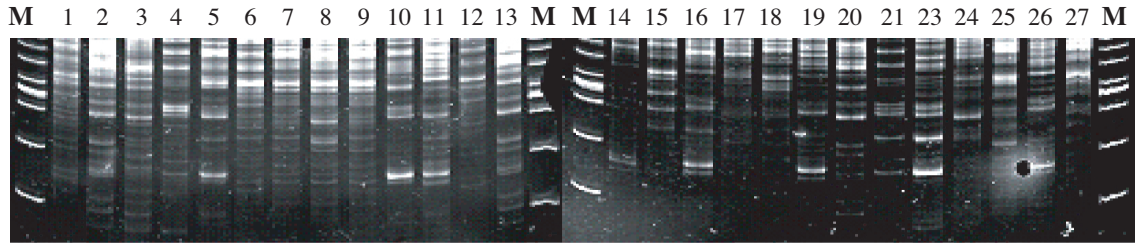


Fig. 1. IRS-PCR electrophoretic patterns of *Legionella pneumophila* strains isolated from environments in different geographic locations and patients in Japan.

각 균주로부터 분리한 genomic DNA 0.2 μ g에 *Xba*I 와 *Pst*I 을 각각 40 unit 씩 넣고 1× 완충액을 넣어 총 용량 12.5 μ L를 만든 뒤 37℃에서 90분간 반응시켜 제한효소로 처리한 후, 65℃에서 20분간 반응시켜 제한효소를 불활성화시켰다. 반응시킨 DNA(12.5 μ L)에 10 unit의 T4 ligase와 이미 제조한 adaptor (AX, PS)를 넣고 최종 용량이 20 μ L가 되도록 맞추는 후 16℃에서 60분간 반응시킨 후, 65℃에서 20분간 반응시켜 ligase를 불활성화시켰다. 반응이 완료된 시험관에 다시 10 unit의 *Xba*I 와 *Pst*I를 넣고 37℃에서 15분간 제한효소로 처리하였다.

3) PCR 반응

반응시킨 주형 DNA 0.5 μ L에 각각 최종농도 0.5mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 1 μ M PS1 시발체 (5'-GAC TCG ACT CGC ATG CA), PXG 시발체 (5'-AGA GTC TGC CAG AC TAG AG), 1×PCR buffer, 5 Unit *Taq* polymerase 를 넣고 총 용량이 25 μ L가 되도록 증류수를 넣어 PCR 반응액을 만들었다. 증폭 반응은 94℃에서 5분간 처리한 후 변성 94℃ 30초, 재결합 60℃ 30초, 연장 72℃ 90초의 반

응주기로 총 30주기를 반응시켰다.

4. 전기영동과 결과분석

PCR 산물은 6.5% polyacrylamide 겔에서 200V로 4시간 동안 실시하였고 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide (0.5 μ g/mL)로 염색하여 UVIPhotoMW (UVIPRO, Cambridge, UK)를 사용하여 사진을 촬영하고 UVIband (UVIPRO, Cambridge, UK) 프로그램을 사용하여 분석하였다. Molecular marker를 기준으로 각각의 분절을 정렬하여 각 균주의 분절 양상을 비교하여 연관성 백분율을 계산하였다. Clustering은 Dice 연관성 계수로 계산된 유사성 결과에 대해 UPGMA법을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

결 과

IRS-PCR에 의해 여러 개의 증폭 산물이 나타났으나 1000 bp 크기 이상의 증폭 산물은 전기영동상 분절 간의

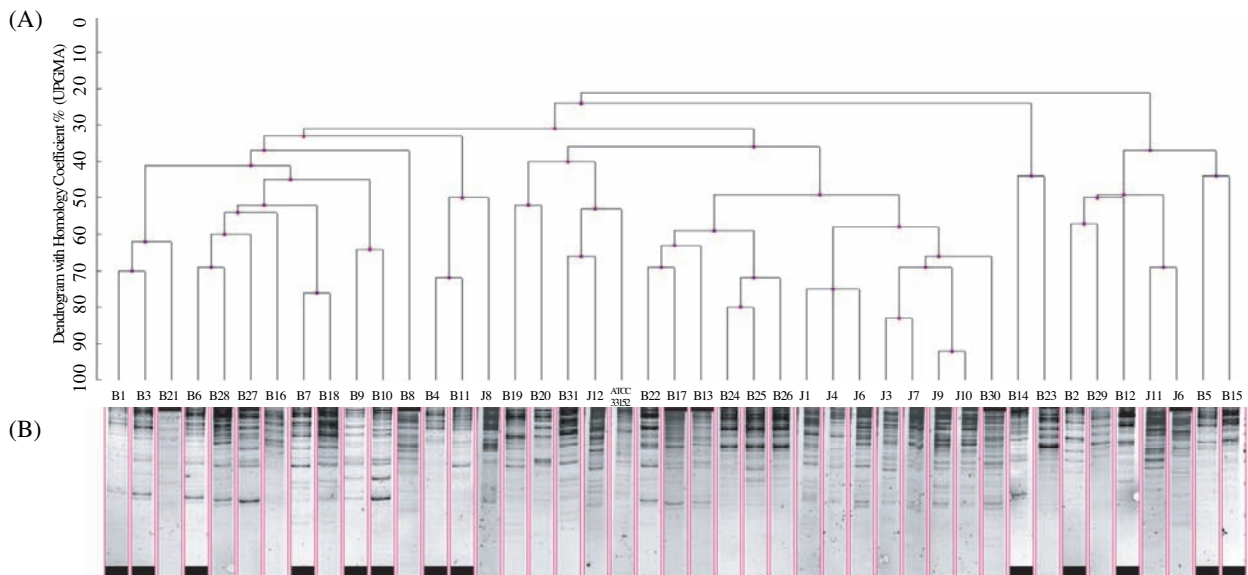


Fig. 2. Clustering of *Legionella pneumophila* isolates by IRS-PCR patterns.

(A) Dendrogram corresponding to panel B in accordance with UPGMA clustering on a matrix based on the Dice coefficient.
(B) IRS-PCR electrophoretic patterns.

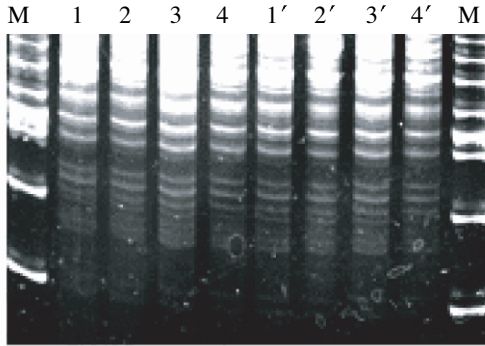


Fig. 3. IRS-PCR patterns of four colonies generated by serial subculture of a single strain.

Lanes M, 100 bp ladder; lane 1-4, one batch reaction of IRS-PCR; 1' - 4', the other batch reaction of IRS-PCR.

분리가 나타나지 않으므로 본 실험에서는 1000 bp 미만의 분절만으로 유형을 분석하였다. 분석 결과 IRS-PCR 반응에 의해서 200-1000 bp에 7-16개의 분절로 나타났으며(Fig. 1), 표준균주를 포함하여 총 44개의 환경 및 환자 분리균에서 분절 양상이 90% 일치도를 보이는 두 검체를 제외한 43개의 분리균에서 각각 다른 유형을 보였다(Fig. 2). 임의의 균주를 계대배양하여 각 세대별 균주의 IRS-PCR 양상을 확인한 결과는 반복 실험에서도 동일한 양상을 보였으며(Fig. 3), 이 양상은 원 균주의 처음 IRS-PCR 양상과도 동일하게 나타났다. 같은 건물의 다른 장소에서 분리된 균주인 B27과 B28은 서로 다른 IRS-PCR 결과 약 50%의 상동성을 나타내어 서로 다른 감염원에서 유래된 것으로 판단되었으며, 일본의 폐렴 환자에서 분리된 균주들은 서로간에 혹은 한국의 환경분리 균주들과 현저하게 다른 절단 양상을 보였다(Fig. 2).

고 찰

레지오넬라는 집단 감염을 흔히 유발하므로 레지오넬라의 감염원 확인은 이 질환의 예방과 전파 차단에 매우 중요하며, 이를 위해 환경 분리균과 실제 환자 분리균주간의 연관성을 결정할 수 있는 역학적 방법이 요구된다.

현재까지 알려진 레지오넬라의 형별 분류 방법으로는 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) [10], amplified fragment length polymorphism (AFLP) [11], infrequent-restriction-site (IRS) PCR [9], randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [12], arbitrarily primed PCR [13] 등이 있다. PFGE는 현재 레지오넬라의 형별 분류 방법중 가장 변별력과 재현성이 높은 방법으로 알려져 있으며, 저자들의 경험으로도 그 사실을 확인할 수 있었다[8]. 그러나 PFGE는 많은 시간, 고가의 시약과 장비 그리고 숙련된 조작을 필요로 하는 방법으로 실제 검사

에 사용하는데 어려움이 있다. 비교적 간단한 방법으로 RAPD법과 arbitrarily primed PCR법이 있으나 DNA 분리 방법, 선택된 시발체, 사용한 *Taq*, 전기영동시 사용되는 시약의 질에 의한 변수 등 여러가지 요인에 의해 재현성에 영향을 받을 수 있다[12-14]. AFLP와 IRS-PCR법은 PCR 과정 이전에 제한효소에 의한 genomic DNA 절단 과정을 포함하고 있어, RAPD법과 arbitrarily primed PCR법에서 야기되는 문제점들을 극복하였다. 그러나 균주간의 동질성의 정도에 따라 어떤 균주들에서는 대부분의 균주가 같은 IRS-PCR 양상을 보임으로써 역학적 조사 도구로 적용하기 어렵다[15]. 하지만 레지오넬라 균에 이 방법을 적용하여 형별 구분을 잘 할 수 있다는 선행 연구가 있었으며[9, 16, 17], 본 연구 결과 실제 레지오넬라에 의한 집단발병이 의심되는 경우 IRS-PCR에 의한 균주의 감별이 PFGE보다 신속하게 균주간의 동질성 여부를 판단하는데 이용될 수 있음을 확인하였다. 특히 본 실험에 사용된 IRS-PCR법은 낮은 온도에서 활성을 가지는 adaptor를 사용함으로써 AFLP법에서 나타나는 잉여 adaptor에 의한 PCR 간섭 현상을 없앨 수 있는 장점이 있다[9]. 본 연구에서는 총 44개의 균주 중 90% 이상의 상동성을 보인 두 개를 제외한 나머지 42개의 균주에서 서로 다른 절단 양상을 보였다. 일본의 폐렴 환자에서 분리된 균주들은 한국의 환경분리 균주들과 현저하게 다른 양상을 보였다. 한국의 환경 균주 중 한 건물의 두 장소에서 분리된 두 균주도 서로 다른 유형을 나타내어(상동성 계수<50%), 병원 내의 여러 환경에서 균주가 분리되었을 경우 그 중 어느 것이 감염원인지를 확인하는데도 유용하게 사용할 수 있음을 알았다. 재현성의 문제는 동일균주를 계대배양하여 각각 처리한 4개의 검체로 실시한 반복적인 실험에서 같은 절단 양상을 보였으며, 해당 균주를 이용한 원 실험 결과와도 동일한 절단 양상을 보임으로써, RAPD 등에서 흔히 보이는 재현성 부족의 단점 역시 나타나지 않았다. 현재 균주들의 유형 분류에 자주 사용되는 PFGE의 경우 서로간에 역학적 관련성이 없는 것으로 생각되는 균주들 사이에도 동일한 양상을 보이는 경우가 존재하는데 반해 IRS-PCR은 각 균주별 다형성이 더 크므로 형별 분류에 있어 PFGE와 비교해서도 변별력이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

결론적으로 IRS-PCR을 이용한 레지오넬라의 형별 분류는 변별력이 우수한 검사로 감염원의 동일성을 증명하는데 매우 유용한 검사임을 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. Negron-Alvira A, Perez-Suarez I, Hazen TC. *Legionella* spp. in Puerto Rico cooling towers. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2331-4.
2. Stout JE and Yu VL. Legionellosis. *N Engl J Med* 1997;337:682-7.

3. Ngeow YF, Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Wang F, Saniel M, Alejandria M, et al. An Asian study on the prevalence of atypical respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Int J Infect Dis* 2005;9:144-53.
4. Kim MJ, Cheong HJ, Sohn JW, Shim HS, Park DW, Park SC, et al. A prospective multicenter study of the etiological analysis in adults with community-acquired pneumonia: *Legionella*, *Leptospira*, Hantaan virus and *Orientia tsutsugamushi*. *Korean J Infect Dis* 2001;33:24-31.
5. Sung WK, Lee YW, Oh HJ, Lee MS, Park ME, Oh HB, et al. The Report of National Institute of Health. Study on the bacteriological characteristics of environmental isolates of *Legionella* spp. from cooling tower. Seoul; National Institute of Health: 1985.
6. Kim JS, Lee SO, Shim HS, Oh TK, Cho MK, Oh HB, et al. An outbreak of legionellosis in ICU of K Hospital, Korea. *Korean J Epidemiol* 1985;7:44-58.
7. Guiguet M, Pierre J, Brun P, Berthelot G, Gottot S, Gibert C, et al. Epidemiological survey of a major outbreak of nosocomial legionellosis. *Int J Epidemiol* 1987;16:466-71.
8. Kim JM, Jeong SH, Seo D, Park EH, Song EJ, Choi J-C, et al. Molecular strain typing of *Legionella* isolates from water in cooling towers of big buildings in Busan, Korea. *Korean J Clin Microbiol* 2004;7:38-42.
9. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 1998;36:161-7.
10. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassidy PK, Breiman RF, et al. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol* 1995;33:2872-5.
11. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1995;33:1716-9.
12. Lo Presti F, Riffard S, Vandenesch F, Etienne J. Identification of *Legionella* species by random amplified polymorphic DNA profiles. *J Clin Microbiol* 1998;36:3193-7.
13. Grattard F, Berthelot P, Reyrolle M, Ros A, Etienne J, Pozzetto B. Molecular typing of nosocomial strains of *Legionella pneumophila* by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:1595-8.
14. Meunier JR and Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 1993;144:373-9.
15. Choi TY and Kang JO. Application of infrequent-restriction-site amplification for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacterium. *J Korean Med Sci* 2002;17:593-8.
16. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol* 1996;34:2386-90.
17. Benson RF, Fields BS, Benin A, Craddock H, Besser RE. Application of amplified fragment length polymorphism analysis to subtyping of *Legionella pneumophila* serogroup 6. In: Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M, et al., eds. *Legionella*. Washington, DC; ASM Press, 2002:243-7.

Molecular Epidemiologic Analysis of *Legionella pneumophila* by Infrequent-Restriction-Site Polymerase Chain Reaction

Jeong Man Kim¹, Kyeong Hee Kim¹, Eun Ju Song², Sun Min Lee², Eun Yup Lee², Eun Hee Park,³
and Chulhun L. Chang²

*Department of Laboratory Medicine¹, Dong-A University College of Medicine;
Department of Laboratory Medicine², Pusan National University College of Medicine; and
Microbiology Division³, Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan, Korea*

Background: The frequent outbreak of legionellosis makes it critical to identify infection sources for the prevention and blockade of transmission of the disease.

Methods: Thirty-one strains of *Legionella pneumophila* isolated from the cooling towers of big buildings in Busan and Gyungsangnamdo Province areas, 12 strains of *L. pneumophila* from patients in Japan, and one type strain (*L. pneumophila* ATCC 33152) were used for molecular strain typing by using an infrequent-restriction-site polymerase chain reaction (IRS-PCR).

Results: Each strain revealed to have 7-16 bands of 200-1000 bp size. All 44 strains showed band patterns different from each other, except two strains sharing 90% homology.

Conclusion: The molecular typing of *Legionella* by IRS-PCR is an excellent and rapid method for discriminating strains; therefore, it should be useful in demonstrating the identity of possible outbreak strains.

(Korean J Clin Microbiol 2006;9(1):24-29)

Keywords: *Legionella pneumophila*, Infrequent-restriction-site polymerase chain reaction, Molecular strain typing

Address reprint requests to : Chulhun L. Chang, M.D., Department of Laboratory Medicine, Pusan National University College of Medicine, Seo-gu, Ami-dong 1-10, Busan 602-739, Korea.
TEL. +82-51-240-7417 FAX. +82-51-247-6560 E-mail: CCHL@pusan.ac.kr