

임상 검체에서 검출된 *Pneumocystis jiroveci*의 Internal Transcribed Spacer 1 유전자 염기서열 분석

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실, ¹내과학교실

김재석* · 김용균 · 박지영 · 모은경¹ · 김한성 · 송원근 · 조현찬 · 이규만

Analysis of Internal Transcribed Spacer 1 Sequences of *Pneumocystis jiroveci* from Clinical Specimens

Jae-Seok Kim*, Yong-Kyun Kim, Ji Young Park, Eun Kyung Mo¹, Han Sung Kim,
Wonkeun Song, Hyoun Chan Cho and Kyu Man Lee

Departments of Laboratory Medicine, ¹Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Pneumocystis jiroveci (formerly *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*) is one of the causative agents of the most serious fungal respiratory infections in immuno-compromised patients. Although *P. jiroveci* infections have been increasing, there are few data on the *P. jiroveci* genotypes in Korea. This study was performed to investigate the genetic diversity of *P. jiroveci* detected from clinical specimens. Twenty-one *P. jiroveci*-positive respiratory samples detected by polymerase chain reaction were collected from a tertiary-care hospital in Seoul between Jan 2003 and Aug 2006. Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis was performed by direct sequencing. Only 9 specimens were appropriate for sequence analysis. Twelve specimens, however, showed mixed sequences by direct sequencing. Three ITS genotypes of *P. jiroveci* were found. There is limited genetic diversity of ITS genes of *P. jiroveci* from clinical isolates analyzed in this study. The present ITS gene analysis suggests that most of *P. jiroveci* isolates may have genetic similarity among patients in Korea.

Keywords: *Pneumocystis jiroveci*; Internal transcribed spacer; Clinical isolate

서 론

*Pneumocystis jiroveci*는 면역력이 저하된 환자에서 *Pneumocystis* 폐렴(*Pneumocystis pneumonia*, PCP)를 일으키는 진균의 일종으로서, 건강한 사람에서는 검출되지 않거나

매우 낮은 농도로 검출되며 사람 이외의 숙주나 환경에서는 거의 분리되지 않는다.¹ *P. jiroveci*는 사람에서 분리되는 *Pneumocystis* 균종으로 이전에 *Pneumocystis carinii*라고 하였으나, 쥐에서 분리되는 *P. carinii*와 유전형의 차이가 큰 것으로 알려져 있다.¹

*P. jiroveci*에 의한 감염증의 경우 배양과 현미경 관찰로 균의 검출이 어렵기 때문에 PCP의 진단에 polymerase chain reaction (PCR) 등의 진단유전학적 검사방법이 많이 사용되고 있다.^{2,3} *P. jiroveci*는 면역력 저하자, 특히 HIV 감

게재결정: 2008년 7월 1일

*교신저자: 김재석, 134-701, 강동성심병원 진단검사의학과, Phone: 02-2224-2327, FAX: 02-2224-2214, E-mail: jaeseok@hallym.or.kr

염자에서 심각한 폐렴을 유발하는 중요 원인균으로 알려져 있으며, 최근에는 면역저하자, 소아, 만성 폐질환, 의료진에서 *P. jiroveci*의 군집락에 대한 임상역학적인 관심도 높아지고 있다.⁴

*P. jiroveci*의 분자유전학적 역학분석을 위하여 다양한 기법들이 이용되고 있는데, pulsed-field gel electrophoresis를 이용한 핵형분석법, PCR restriction fragment length polymorphism 분석법⁵ 및 internal transcribed spacer (ITS),^{6,7} alpha-tubulin,⁵ thymidylate synthase,⁸ mitochondrial large subunit rRNA (mt LSU rRNA)의 유전자 부위에 대한 염기서열분석 등을 이용하고 있다. 이 중 ITS 유전자 염기서열 분석법이 *P. jiroveci*의 역학분석에 많이 사용되었고, ITS1과 ITS2의 유전형에 따라 다양한 분류가 가능한 것으로 알려져 있다.^{7,9-11} 국내에서 보고된 *Pneumocystis* 균주에 대한 분자유전학적 분석은 쥐나 포유류에서 분리된 균주나 외국인을 대상으로 한 것으로서,^{5,8,12} 국내 환자에서 검출된 *P. jiroveci*의 유전자 분석에 관한 보고는 거의 없었다.

이 연구에서는 국내의 입원 환자에서 검출된 *P. jiroveci*의 ITS 유전자 염기서열 분석을 통하여 국내 *P. jiroveci* 임상 분리 균주의 분자유전학적 유형을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검체

대상 검체는 2003년 1월부터 2006년 8월까지 한림의대 강동성심병원 진단검사의학과에 *P. jiroveci* PCR 검사가 의뢰된 객담 또는 기관지 세척액 검체 중 PCR 양성인 21개 검체를 대상으로 하였다. DNA는 Instagene matrix (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 추출하였고, 유전자 염기서열 분석 전까지 -70°C 에 보관하였다.

2. ITS 유전자 염기서열 분석

ITS 유전자 염기서열 분석은 기존에 보고된 nested PCR 방법⁷을 사용하였고, 일부 primer를 수정하여 direct sequencing 방법으로 염기서열 분석을 시행하였다. 간략히 제시하면, 1차 PCR은 NITSF, NITSR primer를 이용하였고, PCR 조건은 95°C 에서 1분간 반응 후, 95°C 1분, 55°C 1분, 75°C 45초의 조건으로 35회 반응 후, 72°C 에서 4분간 반응시켰다. 2차 PCR은 ITSF3/RI, ITS2R3/RI primer중 제한효소 인식부위인 5'쪽 8개 염기서열을 제거한 ITSF3, ITS2R3 primer로 시행하였으며, 반응조건은 위와 같았다. PCR 반응액을 2% agarose gel에서 전기영동한 후 530 bp 크기의 PCR 산물을 확인하였다. PCR 산물은 AccuPrep

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| HL3-1-ITS | ATTCAGCTTA | AACACTTC-- | CCTAGTGTTT | TAGCATTTTT | CAAACATCTG | TG-AATTTT | TTTTGTGTTG |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | .C..... | | | | | | |
| HL5-30-ITS | .C..... | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | .C..... | | | | | | |
| | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| HL3-1-ITS | GCGAGGAGCT | GGCTTTTTTG | CTTGCCCTCGC | CAAAGGTGTT | TATTTTAA | ATTTTAAATT | GAATTCAGT |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | | | | | | | |
| HL5-30-ITS | | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | | | | | | | |
| | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| HL3-1-ITS | TTTGAATTT | TTTAAAACT | TTCACAAATG | GATCTCTTGG | CTCTCGCGTC | GATGAAGAAC | GTGGCAAAT |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | | | | | | | |
| HL5-30-ITS | | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | | | | | | | |

Fig. 1. Partial nucleotide sequences of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 of nine *P. jiroveci* strains from clinical specimens at a tertiary-care hospital in Seoul, Korea. A total of three ITS types in nine *P. jiroveci* strains have been found. Mixed ITS types (n=12) could not be analyzed in this study. Hyphens are introduced for sequence comparison, indicating missing nucleotides.

| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| HL3-1-ITS | GC GATAAGTA | GTG TGAATTG | CAGAATTTAG | TGAATCATCG | AATTTTTTGAA | CGCATCTTGC | GCTCCTTAGT |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | | | | | | | |
| HL5-30-ITS | | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | | | | | | | |

| | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| HL3-1-ITS | ATTCTAGGGA | GCATGCCCTGT | TTGAGCGTTA | TTTTTAAGTT | CCTTTTTTCA | AGCAGAAAAA | AGGGGATTGG |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | | | | | | | |
| HL5-30-ITS | | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | | | | | | | |

| | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| HL3-1-ITS | GCTTTGCAAA | TATAATTAGA | A-TAAAAATAT | TTATATGCAT | GCTAGTCTGA | AATTCAAAAG | TAGCTTTTTT |
| HL3-2-ITS | | | | | | | |
| HL5-1-ITS | | | | | | | |
| HL5-17-ITS | | | | | | | |
| HL5-20-ITS | | | | | | | |
| HL5-26-ITS | | | | | | | |
| HL5-30-ITS | | | | | | | |
| HL6-25-ITS | | | | | | | |
| HL6-37-ITS | | | | | | | |

| | 430 | |
|------------|------------|--------|
| HL3-1-ITS | TCTTTGCCTA | GTGTCG |
| HL3-2-ITS | | |
| HL5-1-ITS | | |
| HL5-17-ITS | | |
| HL5-20-ITS | | |
| HL5-26-ITS | | |
| HL5-30-ITS | | |
| HL6-25-ITS | | |
| HL6-37-ITS | | |

Fig. 1. Continued.

PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 정제
한 후 MacroGen (MacroGen, Seoul, Korea)에 의뢰하여
염기서열 분석을 시행하였다. 분석 가능한 염기서열은 Bio-
edit software¹³를 이용하여 정렬하고 육안으로 확인한 후
염기서열을 비교 분석하였다.

ITS 유전자 염기서열은 이전의 보고⁷에 따라 유전형을 결정하였으며, ITS1 유전자는 유전자 염기서열 2, 16, 74~75, 111~113에 따라서 유전형을 분류하였으며, ITS2 유전자는 일부 염기서열인 54~56, 63, 67~71에 대한 분석을 시행하였다.

결 과

총 21개 검체에서 *P. jiroveci* ITS 부위에 대한 PCR 증폭

산물이 관찰되었다. 이들에 대한 염기서열 분석을 의뢰한 결과 총 9개 검체에서 ITS1, 5.8S rRNA, 일부 ITS2 부위에 대한 436개 염기서열 결과를 얻었다(Fig. 1). 그러나, 12개 검체에서는 특정부위에 여러 염기서열이 혼합된 양상을 보여 염기서열분석을 시행하지 못했다.

9개 검체는 ITS 염기서열 분석상 3가지 양상을 보였다 (Table 1). ITS1 부위 유형분석에서 6균주(HL3-1, HL3-2, HL5-1, HL5-17, HL5-20, HL6-25)가 ITS1 B1형이었으며, 3균주(HL5-26, HL5-30, HL-6-37)는 ITS1 A2형으로 분석되었다. 5.8S rRNA 유전자는 서로 동일한 양상을 보였다. ITS1 유전형 B1형과 A2형은 ITS2 부위에서도 각기 다른 양상을 보였다. 이 중 HL5-1 균주는 ITS1 B1형이었지만, ITS2의 염기서열 위치 67~71에서 1개 염기서열이 다른 B1형과 달랐다.

Table 1. Characteristics of patients and their ITS genotypes obtained by direct sequencing of nine *P. jiroveci* isolates

| Sample | Age/Sex | Specimen | Date of sampling | Underlying diseases | Chest radiography | Nucleotides at indicated positions in ITS1 | | | | ITS1 type | Nucleotides at indicated positions in ITS2* | | |
|--------|---------|-----------|------------------|--|--|--|----|-------|---------|-----------|---|----|-------|
| | | | | | | 2 | 16 | 74~75 | 111~113 | | 54~56 | 63 | 67~71 |
| HL3-1 | 47/M | BAL fluid | 2003/01/06 | Acute myelogenous leukemia (M4) | Lung consolidation, R/O CMV pneumonia, R/O aspergillosis | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAT |
| HL3-2 | 34/M | sputum | 2003/01/10 | HIV infection | No active lung lesion, coarse breath sound | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAT |
| HL5-1 | 62/M | BAL fluid | 2005/01/12 | Non small cell lung cancer, toxic hepatitis | Lung consolidation, ground glass opacity | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAA |
| HL5-17 | 78/M | BAL fluid | 2005/09/03 | Cerebral infarction, tracheostomy | Pneumonia, pulmonary edema | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAT |
| HL5-20 | 68/M | sputum | 2005/09/05 | IgA nephropathy | Lung consolidation | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAT |
| HL5-26 | 46/F | sputum | 2005/09/05 | Sjögren's disease, diffuse interstitial lung disease | Reticular infiltration of both lungs | C | T | -- | TTA | A2 | --- | A | ---- |
| HL5-30 | 70/F | sputum | 2005/12/08 | Multiple myeloma | R/O active tuberculosis, R/O lung cancer | C | T | -- | TTA | A2 | --- | A | ---- |
| HL6-25 | 66/M | BAL fluid | 2006/07/13 | Non small cell lung cancer, diabetes mellitus | Multiple nodular or patchy opacities in lung | T | T | AG | TTA | B1 | TAA | - | AATAT |
| HL6-37 | 60/M | BAL fluid | 2006/08/29 | Non small cell lung cancer | Lung infiltration | C | T | -- | TTA | A2 | --- | A | ---- |

*ITS2 sequence types were not analyzed; sequences of nucleotide position at 122, 169~172, 176 were not obtained by direct sequencing used in this study. Hyphens are introduced for sequence comparison, indicating missing nucleotides.

고 찰

*P. jiroveci*는 사람에서 분리되는 *Pneumocystis* 균종으로 진균의 일종으로 분류하고 있다. 임상미생물 검사실에서 배양은 어려우므로, *P. jiroveci*의 검출과 역학분석을 위해서는 분자유전학적 검사방법을 사용하는 것이 일반적이다. 본 연구는 국내의 한 종합병원에 입원한 환자들에서 검출된 *P. jiroveci*의 ITS 유전자 부위에 대해 염기서열을 분석한 것으로서, 국내의 환자에서 검출된 *P. jiroveci* 분자유전학적 분석에 대한 첫 보고이다.

*P. jiroveci*의 역학 연구에서 염기서열분석에는 여러 유전자 부위가 대상이 될 수 있다.¹ *P. jiroveci*의 ITS 유전자는 18S rRNA와 26S rRNA 유전자 사이의 부위로서 ITS1과

ITS2 사이에 5.8S rRNA가 있으며,¹⁴ ITS 유전자 염기서열이 *Pneumocystis* 균종의 역학분석에 많이 사용되고 있다.^{10,11,15,16}

임상환자에서 검출된 *P. jiroveci* 균주에 대한 ITS 염기서열분석을 시행한 결과 *P. jiroveci* 9개 균주는 3가지 유형을 보였다. *P. jiroveci*의 ITS 유전자에서는 염기서열 변화가 주로 일어나는 부위가 알려져 있다. Tsolaki 등⁷이 제시한 유형분류에 따르면 *P. jiroveci*의 ITS1 유형은 유전자 염기서열 2, 16, 74~75, 111~113의 차이에 의해 6가지로 분류한다. 이번 연구에서 제일 많이 검출된 유형은 ITS1 B1형으로 6균주였으며 나머지 3균주는 ITS1 A2형으로 분석되었다. ITS2 유전자 염기서열은 ITS1 B1 유형 6균주와 ITS1 A2 유형 3균주에서 뚜렷한 차이를 보였으므로 *P.*

*jiroveci*의 ITS1 유형에 따라 ITS2 유형의 차이가 연관되어 있는 것으로 생각된다.

이 균주들은 입원 환자에서 약 4년의 기간 동안 검출된 균주임에도 ITS 유전형의 다양성이 크지 않았고, 1968년에서 1981년에 네덜란드에서 분리된 *P. jiroveci*의 유전형분석에 사용된 균주⁷와도 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, 장기간에 걸쳐 다른 환자에서 분리된 *P. jiroveci* 균주에서도 ITS 유형의 다양성은 크지 않은 것으로 추정되며, *P. jiroveci* 감염의 역학적 분석에 ITS 유형분석을 사용하는 것은 제한점이 있을 것으로 생각한다. 다만, 본 연구는 일개 대학병원에서 검출된 9개 *P. jiroveci* 균주에 제한되어 있고, 연구방법상 여러 *P. jiroveci* 균주가 혼합 감염된 경우는 분석하지 못하였으므로 *P. jiroveci*의 유전적 다양성에 대한 추가적인 분석이 필요하다고 생각한다.

이번 연구에서는 ITS2 유전형에 대해서는 일부 염기서열을 분석하지 못하여 Tsolaki 등⁷의 분류에 따른 ITS2 유형을 알 수는 없었으나, ITS1 B1인 1균주(HL5-20)는 ITS2 분석이 가능했는데, ITS2 유전자 염기서열 54~56(TAA), 63(-), 67~71(AATAT), 122(C) 부위는 b2형과 유사하였으나, 169~172(----), 176(A) 부위는 a3, a4, c1형과 유사하였으므로, Tsolaki 등이 제시한 ITS2 9개 유형과는 달랐다(자료 미제시). 5.8S rRNA 염기서열분석에서는 기존에 보고된 *P. jiroveci* 균주와 동일한 유전형을 보였으며, Robberts 등¹⁵이 제안한 5.8S rRNA의 A-M 유형으로는 A 유형이었다.

*P. jiroveci*는 흔히 중복 감염을 일으키는 것으로 생각되며, 태국의 한 보고에 따르면 *P. jiroveci*가 검출된 HIV 감염자 군에서는 이중 53.6%가 2종 이상의 *P. jiroveci*가 동시에 검출되었다.¹¹ 이번 연구에서는 ITS 유전자 염기서열의 여러 구간에서 걸쳐 중복된 염기서열이 관찰된 경우가 21검체 중 12검체(57.1%)에서 있었는데, 이 환자들은 *P. jiroveci* 균주의 혼합 감염으로 추정된다.

이 연구에서는 일개 대학병원의 환자에서 검출된 *P. jiroveci*의 ITS 유전자 염기서열을 비교 분석하였다. 그 결과 ITS1 유형은 2가지로 분류할 수 있었으며, 일부 ITS2 유전자 부위를 고려하면 3가지 유형으로 분류할 수 있었다. 비교적 장기간에 걸쳐 각각 다른 환자에서 검출되었음에도 ITS 유전자 염기서열이 유사하였으므로 국내에서 분리되는 *P. jiroveci* 임상 분리 균주의 ITS 유전자 다양성은 작을 것으로 생각된다.

References

1. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002;8:891-6.
2. Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2785-8.
3. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3877-82.
4. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization. *J Infect Dis* 2008;197:10-7.
5. Chung BS, Pars YK, Huh S, Yu JR, Kim J, Shi X, et al. Genetic heterogeneity of *Pneumocystis carinii* from rats of several regions and strains. *Korean J Parasitol* 2000;38:151-8.
6. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998;36:734-41.
7. Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:90-3.
8. Pai HJ. Comparison of nucleotide sequence of thymidylate synthase from human-derived *Pneumocystis carinii* with that from rat-derived *Pneumocystis carinii*. *Korean J Infect Dis* 1995;27:349-54.
9. Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, et al. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol* 1997;35:383-7.
10. Hsueh JY, Bohm RP Jr, Didier PJ, Tang X, Lasbury ME, Li B, et al. Internal transcribed spacer regions of rRNA genes of *Pneumocystis carinii* from monkeys. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:503-8.
11. Siripattanapipong S, Worapong J, Mungthin M, Leelayoova S, Tan-ariya P. Genotypic study of *Pneumocystis jiroveci* in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. *J Clin Microbiol* 2005;43:2104-10.
12. Cho SR, Park YG, Moon HN, Lee SH, Hong ST. Karyotypes of *Pneumocystis carinii* derived from several mammals. *Korean J Parasitol* 1999;37:271-5.
13. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999;41:95-8.
14. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis* 1996;174:141-56.
15. Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J Clin Microbiol* 2004;42:1505-10.
16. de Boer MG, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LB, van Houwelingen HC, et al. An outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? *Clin Infect Dis* 2007;44:1143-9.