

Molecular Genetic Typing of *Legionella pneumophila* Strains Isolated in Jeju, Korea

Byoung Jun Kim², Chan Geun Park², Hee-Youn Kim², Chang-Su Han³, Sung yob Kim¹,
Su-Young Kim¹, Jaechun Lee¹, Seong-Chul Hong¹ and Keun-Hwa Lee^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, and The Environmental Health Center, Jeju National University School of Medicine, Jeju, ²Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, and Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, ³Institute of Environmental Resource Research of Jeju Special Self-Governing Province, Jeju, Korea

Twenty two strains of *Legionella* species isolated from Jeju, Korea were identified by comparing the *rpoB* (300 bp), *dotA* (360 bp), and *mip* (396 bp) gene sequence analysis. Furthermore, their genotypes were determined by sequence analysis of *rpoB/dotA* subgroup typing, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns. Of the 22 isolates, 21 strains were identified as *L. pneumophila* and 1 strain was close to *L. erythra* (>95% similarity of *rpoB* and *mip*). Most of the *L. pneumophila* strains (90%) belonged to P-I of *rpoB/dotA* subgroup typing, one strain of each P-III and P-IV. *L. pneumophila* isolates were further grouped into 4 and 6 different PFGE (P1 to P4) and RAPD (R1 to R6) patterns, respectively. On the basis of these genotypes, which may be useful for future epidemiological studies, existence of diverse *L. pneumophila* population in Jeju, Korea were observed.

Key Words: Jeju, *L. pneumophila*, Genotype

서 론

Legionella 균종은 그람 음성 통성 세포내 병원체이다. 대표적인 균종인 *L. pneumophila*를 포함하여 약 50여종이 알려져 있고 (1) 최근까지 40여종 이상의 *Legionella* 균종이 알려져 있으며 그 가운데 약 21종이 사람에게 병원성이 있다. 이들은 자연 또는 인공 수계에 플랑크톤 형태나 원생동물에 기생하여 널리 분포하면서 서식한다 (2). 이들 가운데 *L. pneumophila*는 1976년 미국 필라델피아에서 있었던 재향군인회 집회 중 발생한 집단 폐렴의 원인균으로 밝혀지면서 재향군인병 (Legionnaires' disease)의 원인균으로 잘 알려져 있다 (3). 이 재향군인병은 아

직도 지역사회 획득 폐렴 (community-acquired pneumonia)의 4~20%를 차지한다 (4). 또한 이러한 *Legionella* 군 감염증은 유럽과 북미 그리고 일본의 예에서 볼 수 있듯이 끊이지 않고 전 세계적으로 집단 발병을 일으키며, 공중 보건상의 문제로 관심을 끌어왔다 (5~11). 특히 우리나라와 가까운 일본에서는 수 차례에 걸친 집단 발병 예가 있었는데 2002년에는 온천에서 300명 이상이 *L. pneumophila*에 감염되고 8명이 사망하는 예까지 있었다 (12). 그러나 다행히도 우리나라에서는 집단 발병 예로는 1984년 서울 소재 종합병원 중환자실에서 발생한 Pontiac fever 이후에는 (13) 산발적으로 발생한 예들이 (14) 보고되고 있을 뿐 큰 집단 감염은 없었다.

기존의 *Legionella* 동정은 생물학적 cysteine 요구성, 자가형광 또는 생화학적 성상 (1, 4) 등에 근거하여 시행하여 왔다. 그러나 최근에는 분자생물학적 방법들이 발달하면서 연쇄중합반응 (PCR)과 연계한 유전학적 균종 동정이 손쉬워 많이 사용하고 있고, 유전자 염기서열 분석 같은 방법은 균종 동정과 특정 균종 typing에도 흔히

Received: May 10, 2010/ Revised: June 8, 2010

Accepted: June 28, 2010

*Corresponding author: Keun-Hwa Lee, Ph.D. Department of Microbiology and Immunology and The Environmental Health Center, Jeju National University School of Medicine, Jeju 690-756, Korea.
Phone: +82-64-754-3852, e-mail: yomust7@cheju.ac.kr

사용되고 있다. 특히 세균 typing은 특정 병원성 세균에 의한 집단 발병 시 역학조사에 사용하는 중요한 방법으로 감염원 추적 또는 동일 원인균 여부 판정 등에 사용할 수 있다. 이러한 세균 typing을 위해서는 형태학적 (morphotype)이나 혈청형 (serotype), 파이지형 (phage type) 등 여러 방법들을 사용하여 왔지만, 근래에 많이 사용하는 유전형 분석은 유전체 또는 유전자를 대상으로 선택할 수 있는 방법들이 다양하고 보다 객관적이라는 장점이 있다. *Legionella* 연구들에서도 대부분의 세균에 적용 가능하고 분석능이 높으며 또한 결과의 안정성, 재현성이 높은 pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (15~17), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (18), arbitrarily primed (AP)-PCR (14, 19), 그리고 ribotyping (15) 등 다양한 방법들을 사용한 예가 있다. 국내에서도 이 방법들을 폐렴 환자에서 분리한 균을 ribotyping하거나 (20) 냉각탑수 등 환경에서 분리한 균주들을 대상으로 손쉽게 AP-PCR이나 (21) infrequent-restriction-site (IRS) PCR로 typing (22)한 예가 있다. 또한 좀 더 손이 많이 가는 PFGE를 시행하거나 (23) 복합적으로 AP-PCR과 PFGE (24) typing 결과를 보고한 연구들이 있었다. 최근에는 *rpoB* 염기서열을 *dotA* 염기서열과 함께 한국과 일본에서 분리한 *L. pneumophila* 균주들을 대상으로 유전형을 분석하여 *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* 균주들을 8개의 subgroup (P-I부터 P-VIII)으로 *L. pneumophila* subsp. *fraseri*는 두 개의 subgroup (F-I과 F-II)으로 나눈 population structure 연구 결과가 보고된 바 있다 (25, 26).

본 연구에서는 제주도라는 격리된 특정 지역의 냉각탑수들에서 *Legionella* 균종을 분리하였으며, 이어서 *rpoB*와 *mip* 염기서열 분석으로 균종을 동정하였다. 또한 이 *Legionella* 균종들 중 *L. pneumophila* 균주들의 유전형을 변별력이 강점인 PFGE와 간편한 PCR 수행이 장점인 RAPD typing, 그리고 염기서열 확인을 통한 객관화가 장점인 *rpoB/dotA* subgroup typing으로 분석하여 이들 genotype을 database화함으로써 혹시라도 국내에서 발생할 수 있는 *L. pneumophila*에 의한 집단 발병 시 역학조사에 molecular marker로 활용할 수 있도록 하고자 한 것이다.

재료 및 방법

Legionella 균 분리

2006년 6월부터 9월까지 제주도 소재 대형건물의 냉각

탑수에서 얻은 82개의 검체에 대하여 *Legionella* 균 분리를 실시하였다. 멸균된 채수병에 냉각탑수 1 ℓ를 채취, 냉장보관 상태로 실험실로 운반하여 균 분리에 사용하였다. 냉각탑수는 0.45 µm 여과지를 사용하여 균을 농축한 후, 멸균한 증류수 20 ml에 농축 여과지를 부유시켜 50℃ 항온 수조에서 30분간 방치하였다. 다시 부유액을 10배 희석한 후 원액과 희석액을 0.1 ml씩 각각 GVPC 배지와 buffered charcoal yeast extract α -ketoglutarate (BCYE- α) (Oxoid, Basingstoke, UK) 배지에 접종한 다음 5% CO₂ incubator에서 3~10일간 배양하면서 집락 형성을 관찰하였으며, *Legionella*가 의심되는 집락은 BCYE- α 와 BCYE 배지에 계대 배양하여 유전자 분석에 의한 동정에 사용하였다. BCYE- α 배지는 *Legionella* agar base (Difco, Detroit, MI, USA) 37 g을 증류수 980 ml에 녹이고 1 N KOH로 pH 7.1~7.2가 되도록 조정하여 멸균하였다. 멸균하여 항온 수조 (45~50℃)에서 식힌 후 L-cysteine HCl 등이 포함된 *Legionella* supplement (Difco)를 첨가하였다. 한편 선별배지로는 각각 무균적으로 여과한 glycine (3 g/ℓ), vancomycin (5 mg/ℓ), polymyxin (79,200 U/ℓ), cyclohexamide (80 mg/ℓ) (GVPC)을 BCYE- α 배지에 첨가하여 사용하였다.

대상 유전자 및 염기서열 결정

분리 균주들은 BCYE- α 에 배양하여 bead beater-phenol 법으로 DNA를 추출하여 (27) 주형으로 사용하였다. 분석 대상 유전자는 *rpoB*, *dotA*, 그리고 *mip*로써 (25, 26, 28, 29) PCR로 이들 유전자 분절을 증폭 후, 유전자 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열들은 GenBank에 등록된 표준 균주 또는 참조 균주들의 염기서열과 multiple alignment를 통해 그들의 상동성을 비교하였고, 또한 유전적 연관성을 쉽게 살펴볼 수 있는 dendrogram을 작성하여 동정하였다. 각 유전자 DNA를 증폭하기 위해서 이미 보고된 PCR primer를 사용하였다 (Table 1). *rpoB* PCR에는 RL1-RL2를 사용하였으며, 증폭 산물은 369 bp DNA로서 Rif^r region을 포함한다 (27, 30). PCR은 template DNA 50 ng을 각 primer 20 pmol과 함께 PCR mixture tube (AccuPower PCR PreMix; Bioneer, Daejeon, Korea) 넣어 사용하였다 (25, 26). 최종 부피는 증류수를 사용하여 20 µl로 맞추고 30 cycle의 증폭 과정을 거쳤다. 각 cycle은 denaturation-95℃ 30초, annealing-55℃ 30초, 그리고 extension-72℃ 1분으로 시행하였으며, 최종 extension은 72℃ 5분으로 구성하여 시행하였다 (model 9700 Thermocycler; Perkin-Elmer

Table 1. Primers to amplify partial fragments of target genes of *Legionella* isolates

Target gene	Primers	Size of amplicon (bp)	Reference
<i>rpoB</i>	RL1 (5'-GAT GAT ATC GAT CAY CTD GG-3')	369	28
	RL2 (5'-TTC VGG CGT TTC AAT NGG AC-3')		
<i>mip</i>	ML1 (5'-GATAAG TTG TCT TAT AGC ATT GG-3')	402	29
	ML2 (5'-TCTGTC CAT CCT GGG ATA ACT TG-3')		
<i>dotA</i>	DL1 (5'-TTG ATT TGG TGAAAC TCA ATG G-3')	434	28
	DL2 (5'-CAA TCA AAA TCC TGG TGC TTC-3')		

Cetus, Norwalk, CT, USA).

증폭 산물은 QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 정제하여 염기서열 결정에 사용하였고, Applied Biosystems automated sequencer (model 377) and a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, UK)을 사용하여 염기서열은 정확성을 기하기 위하여 정방향과 역방향으로 확인하였다. Sequencing reaction은 이미 보고된 방법에 (26) 따라 정제한 PCR 증폭 산물 30 ng, 각 primer 2.5 pmol 그리고 BigDye Terminator RR mix (part no. 4303153; Perkin-Elmer Applied Biosystems) 4 µl를 넣고 증류수로 최종 부피가 10 µl되게 하였다. 반응은 95°C 15초, 50°C 5초, 그리고 60°C 4분에서 30 cycle을 시행하였다.

균종 동정

확인된 *Legionella* 균주들의 *rpoB*와 *dotA*, 그리고 *mip* 염기서열들은 이미 GenBank에 등록되어 있는 *L. pneumophila*를 비롯한 39종에 속한 41주의 각 염기서열을 꺼내 상동성을 비교하여 >99% 이상인 경우 해당 균으로 동정하였다. 각 유전자 계통수는 neighbor-joining (NJ) method로 작성하였으며, pairwise distance를 maximum likelihood option을 택하여 계산하였다. Bootstrap value는 1,000회 반복 시행한 값을 취하였다.

rpoB/*dotA* subgroup 분석

rpoB/*dotA* subgroup 및 serogroup 결정은 기존에 발표된 *L. pneumophila* subgroup의 *rpoB*와 *dotA* 염기서열들을 사용하여 상동성이 각각 97%와 95% 이상인 경우로서, 발표된 기존 group에 속한 균주들의 염기서열과 함께 위에 기술한 Neighbor-joining 방법으로 작성한 gene tree 상에서의 clustering 여부로 결정하였다 (26).

Pulse-field gel electrophoresis

이미 발표된 방법에 따라서 실시하였다 (15, 31, 32). *Legionella* 균을 BCYE- α 배지에서 3일간 배양한 후, plate 당 멸균 증류수 5 ml로 부유하여 O.D.₆₀₀=2로 조정하고, TES buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)로 800 × g에서 10분간 2회 세척하였다. 균 침전물을 TES buffer 0.5 ml로 재부유한 후, 10 mM Tris, pH 8.0, 0.1 mM EDTA로 만든 1.2% LMT (low melting point) agarose를 0.5 ml 첨가하여 plug mold에 넣고 얼음에 방치하여 굳혔다. Plug가 굳은 후, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% sarcosyl, proteinase K 1 mg, lysozyme 1 mg, RNase A 20 µg)를 plug당 1 ml씩 첨가하여 50°C에서 48시간 처리하였다. Plug의 세척은 상온에서 멸균 증류수 (plug당 5 ml)로 5분간 1회, TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA; plug당 3 ml)로 5분간 2회 실시하였고 TE buffer (plug당 3 ml)를 첨가한 후, 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. Lysis시킨 plug를 제한 효소 buffer 120 µl로 equilibration (*Sfi* I; 상온에서 1시간)시킨 후, plug당 30 U로 50°C에서 24시간 동안 제한 효소를 처리하였다. Plug의 전기영동은 Bio-Rad US/CHEF DR II system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 사용하였다. 0.5% TBE buffer로 1% PFGE agarose gel을 만들어 mold에 굳힌 후, 각 well에 제한 효소로 처리한 plug를 넣고 *Sfi* I일 경우에는 initial sec.를 2.2 s, second sec.를 35.1 s, 6 volt/cm (200 V)로 실시하였고, *Not* I일 경우에는 initial sec.를 5.0 s, second sec.를 100 s, 6 volt/cm (200 V)로 하여 14°C에서 24시간 실시하였다. 전기영동이 끝난 후, ethidium bromide (0.5 µg/ml)에서 30분간 염색하고 증류수로 1시간 탈색시켜 DNA Image Visualizer (UVP Inc., Upland, CA, USA)에서 band 양상을 관찰하였다.

Random amplified polymorphic DNA typing

분리 균주들의 RAPD typing은 이미 보고된 방법에 따라 다음과 같이 증폭 과정을 시행하였다 (18). PCR premix (AccuPower Pre-mix Top, Bioneer)에 주형 DNA 50 ng과 0.6 μ M의 OPA3 primer (5'-AGTCAGCCAC-3')를 첨

가한 후, 멸균된 3차 증류수로 최종 용적이 20 μ l가 되게 하였다. PCR은 Thermocycler model 9700를 사용하여 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 1분, 34°C 1분, 72°C 2분씩 45회 반복 시행하였고, 최종적으로 72°C에서 7분간 DNA를 신장하였다. 증폭 산물은 2% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 비교하였다. 한편 위와 같이 시행한 각

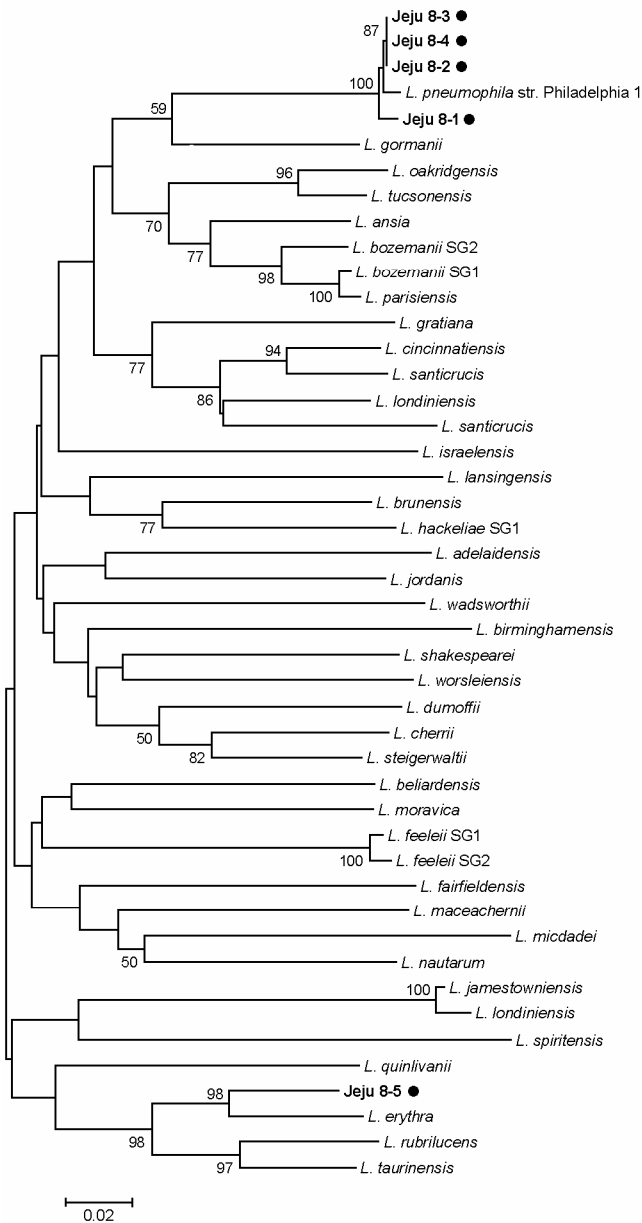
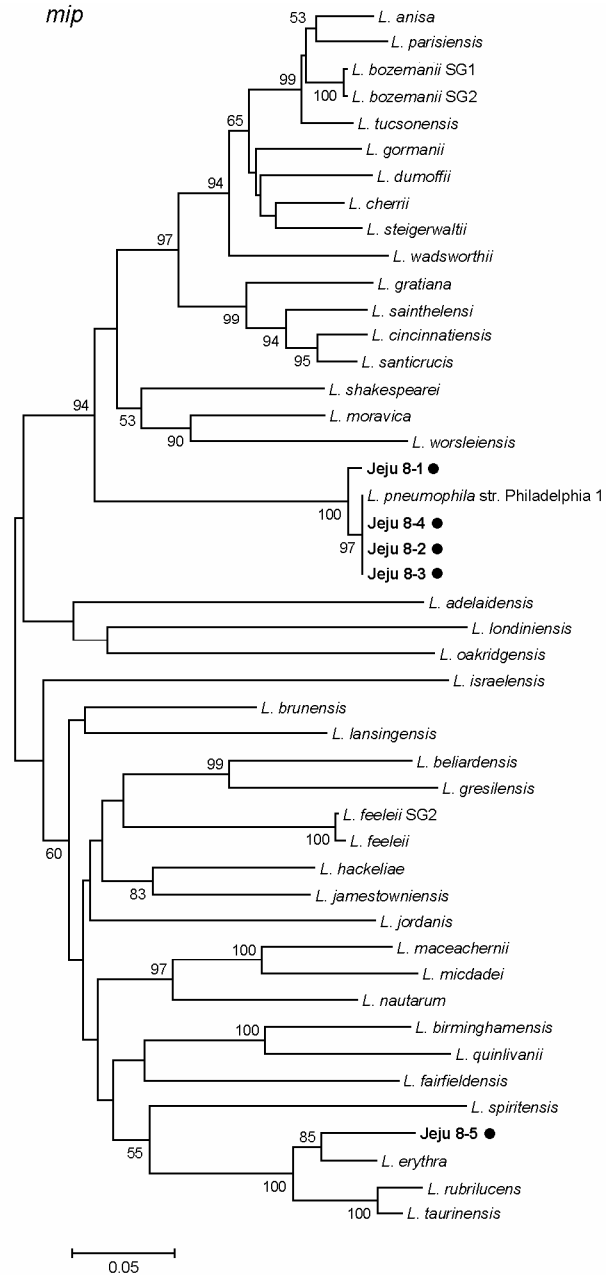
rpoB*mip*

Figure 1. Genetic relationships of *Legionella* Jeju isolates (●) among 41 legionella species based on the *rpoB* and *mip* sequences. In addition to the sequence similarity, most of the Jeju isolates were clearly identified as *L. pneumophila*, except one strain (Jeju 8-5). Strains possessing sequences identical to those in the figures are not presented. Bootstrap values higher than 50% are shown.

분리 균주의 PFGE 결과와 RAPD 결과를 복합하여 PR typing으로 명명하고 분류를 시도하였다.

결 과

균종 동정

제주도내 6개 지역의 냉각탑수들로부터 *Legionella* 균종으로 의심되는 22균주를 분리하였다. 이들은 모두 분리배지 상에서 동일한 형태와 염색상 등을 보여, 잠정적으로 *Legionella* 균종으로 의심하고 유전자 분석에 의해 정확한 동정을 시도하였다. *rpoB*, *dotA*, *mipA* DNA는 모든 분리 균주에서 PCR로 증폭되었으며, 확인된 이들의 염기서열을 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교한 결과 21주는 표준 균주인 *L. pneumophila* Philadelphia strain과

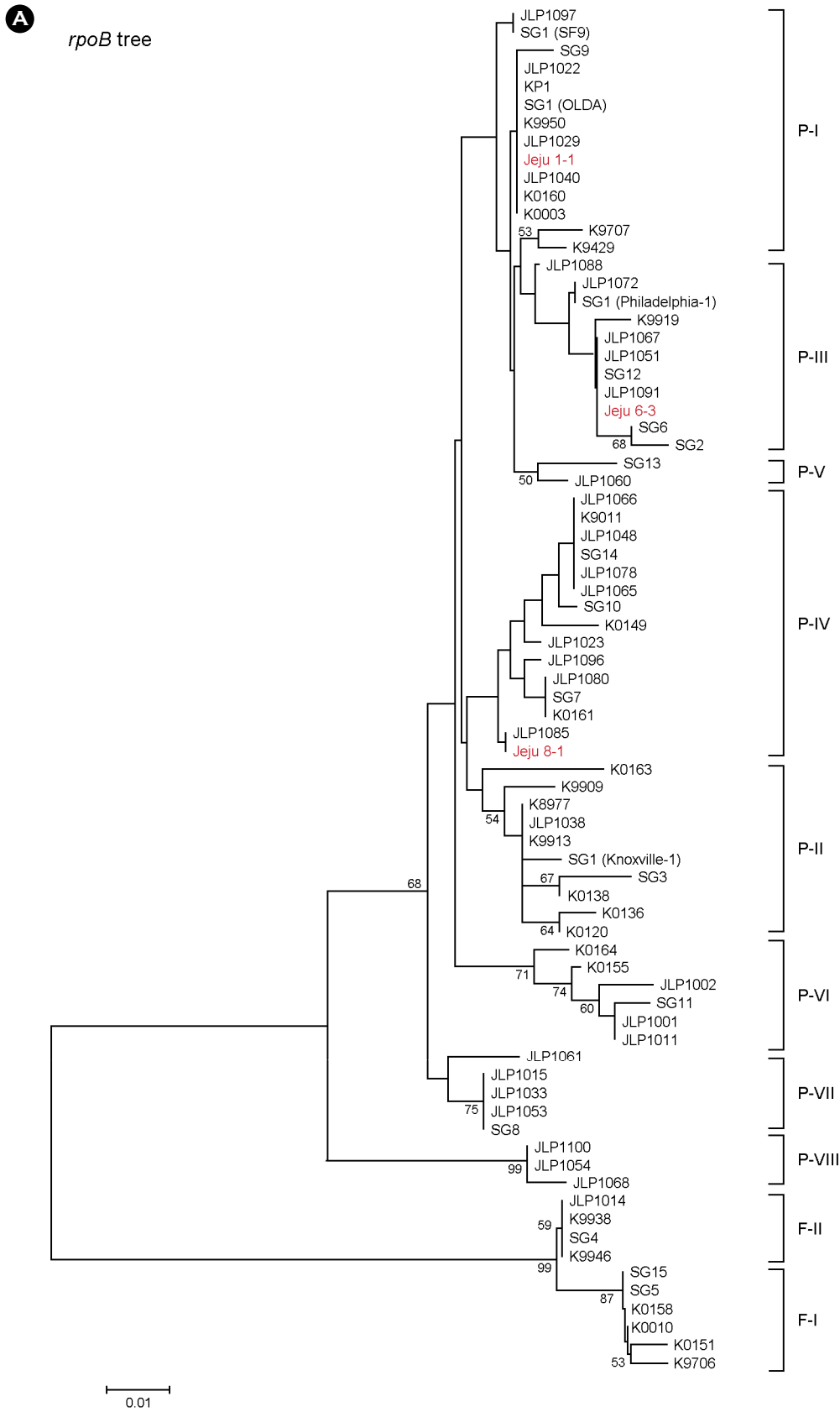
*rpoB*는 99.3~100%, *dotA*는 99.3~100% 그리고 *mip*은 98.7~100%의 상동성을 보였다. 이로써 기존에 보고된 (25, 26, 28, 29) 이들 유전자의 염기서열 변화 내에 포함되어 *L. pneumophila*로 동정하였다. 그러나 1주 (Jeju 8-5)는 *L. erythra*와 가까운 균종으로 동정하였다. 이같이 분리 균주들의 균종 동정은 *Legionella* 41 species 표준 균주들의 *rpoB*와 *mip* 염기서열을 사용한 dendrogram을 통해서도 쉽게 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이후 유전형 분석에는 *L. pneumophila* 균주들만을 사용하였다.

한편 제주 분리 균주들의 serogroup 동정을 직접 수행할 수 없는 관계로, 이전 보고에서와 같이 *L. pneumophila* 각 serogroup 표준 균주들의 *rpoB*와 *dotA* 염기서열과 비교하여 serogroup을 추정-구분하여 본 결과 대부분의 분리 균주들은 serogroup 1인 것과 Jeju 6-3은 serogroup 2, 6,

Table 2. Distribution of *L. pneumophila* Jeju isolates based on the *rpoB* and *dotA* sequences, and RAPD and PFGE patterns

Isolates	Subgroup		PR type	Serogroup	
	<i>rpoB</i>	<i>dotA</i>		<i>rpoB</i> ^a	<i>dotA</i> ^a
Jeju 1-1	P-I	P-I	P3 R1	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 1-2	P-I	P-I	P3 R5	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 1-3	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 2	P-I	P-I	P2 R1	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 3-1	P-I	P-I	P3 R3	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 3-2	P-I	P-I	P3 R3	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 4-1	P-I	P-I	P2 R1	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 4-2	P-I	P-I	P2 R1	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 4-3	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 5-3	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 6-1	P-I	P-I	P2 R1	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 6-2	P-I	P-I	P2 R4	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 6-3	P-III	P-III	P4 R6	SG 2, SG 6, SG 12	SG 12
Jeju 6-5	P-I	P-I	P2 R2	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 6-6	P-I	P-I	P2 R2	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 6-7	P-I	P-I	P1 R4	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 7-1	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 8-1	P-IV	P-IV	ND	SG 7, SG 14 (99.3)	SG 14 (97.5)
Jeju 8-2	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 8-3	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9
Jeju 8-4	P-I	P-I	ND	SG 1-4	SG 1-1, SG 1-4, SG 9

a: 100% Similarity, ND: Not determined



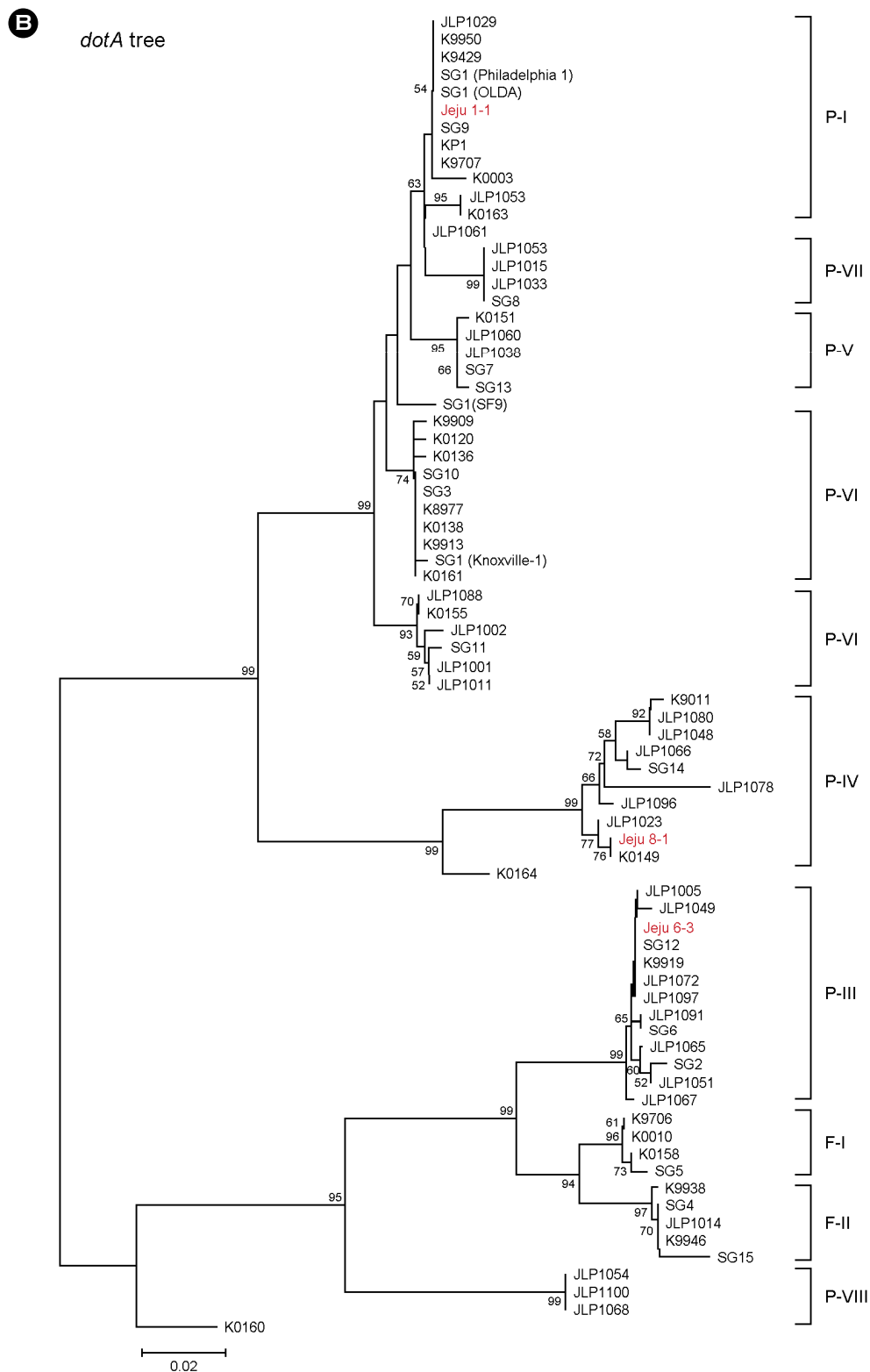


Figure 2. Neighbour-joining trees inferred from (A) the *rpoB* and (B) the *dotA* sequences of *L. pneumophila* Jeju isolates and reference strains (K and JLP) (26). Subgroups (P-I to P-VIII and F-I and F-II) are indicated on the right; branch lengths are proportional to the number of nucleotide changes. Bootstrap values higher than 50% are indicated at the corresponding branches. SG, serogroup numbers (SG 1 to 15).

12와 가깝고 Jeju 8-1은 serogroup 14에 가까운 것을 알 수 있었다 (Table 2).

제주 분리 균주의 *rpoB*와 *dotA* subgroup 분포

확인한 제주 분리 균주들의 염기서열을 이미 *rpoB*와 *dotA* subgrouping에 사용된 10 subgroup (P-I ~ P-VIII, F-I 및 F-II) 염기서열들 (26)과 함께 사용하여 각 gene tree를 그려 확인한 결과, 3종류 (P-I, P-III, P-VI)의 subgroup을 확인하였다. 대부분의 균주들 (90%)이 subgroup P-I에 속하였고, 오직 두 균주, 즉 Jeju 6-3과 Jeju 8-1만이 각각 subgroup P-III와 P-IV에 속하였다 (Fig. 2). *rpoB*와 *dotA* 유전자 subgroup typing 결과가 서로 어긋나는 균주는 없었으며, *L. pneumophila* subspecies *fraseri*에 해당하는 F-I이나 F-II에 속하는 균주도 없었다.

제주 분리 균주의 PFGE 및 RAPD typing

PFGE 분석이 가능하였던 13주의 제주 분리 균주들은 예상대로 다양한 양상을 보였으며 band 양상에 따라 크게 4가지 type, 즉 P1부터 P4로 구분할 수 있었다 (Fig. 3). 앞서 *rpoB*와 *dotA* 염기서열로 구분하여 subgroup P-I에 속한 13균주들은 크고 작은 10~12개의 DNA band 양상에 변화를 보이며 3가지 PFGE type으로 (PG1, PG2, PG3) 구분되었으며, 가장 흔한 것은 PG2 type이었고 PG1 type이 그 다음으로 많았다. *rpoB*와 *dotA* subgroup이 P-III로서 다른 균주들과 구분되었던 Jeju 6-3 균주의 경우 PFGE 양상도 확연히 다른 것 (PG4)을 알 수 있었다.

한편 RAPD 양상도 다양하였으며, band pattern에 따라 크게 6가지 종류 (R1부터 R6)로 구분이 가능하였다 (Fig.

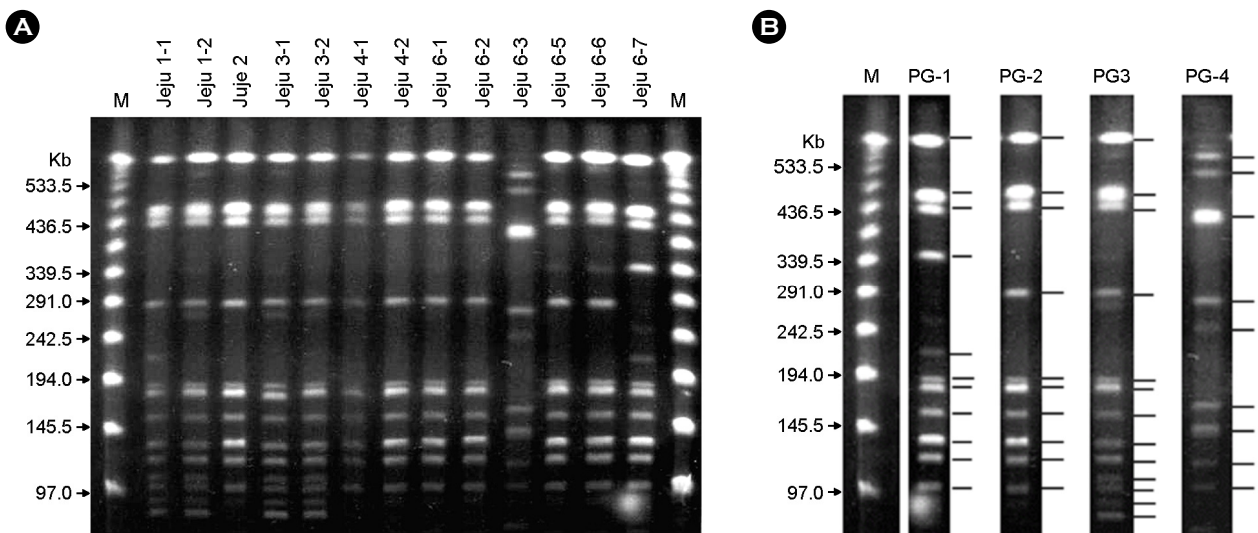


Figure 3. PFGE patterns of *SfiI*-cleaved genomic DNAs from *L. pneumophila* Jeju isolates (A) and their schematic four band patterns (PG1 to PG4) (B). Lambda ladder PFGE marker (M) were used as molecular size standards.

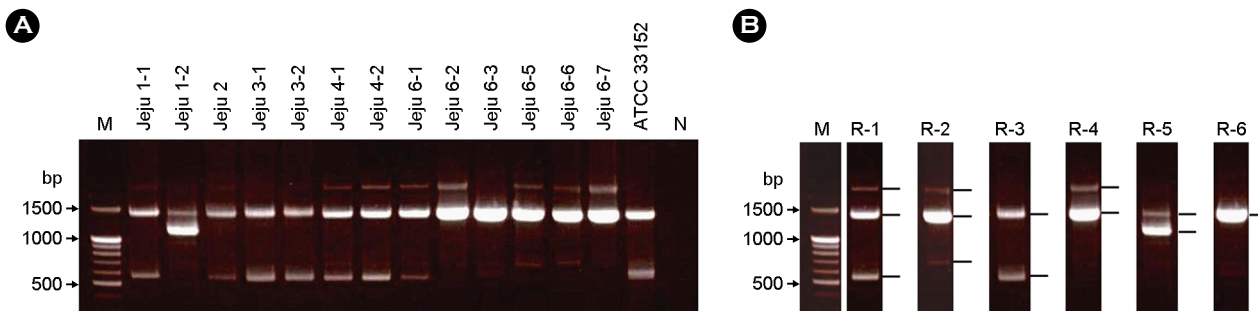


Figure 4. RAPD typing of *L. pneumophila* Jeju isolates. Six different band patterns (Type R1 to R6) were observed (B). ATCC 33152, *L. pneumophila* serogroup 1; M, 100-bp ladder marker; N, negative control.

4). *rpoB/dotA* subgroup P-I에 속한 13균주들은 R1부터 R5 type에 분산되어 속하였으며, 이 가운데 가장 많은 것은 3개의 강한 DNA band를 보인 R1 type으로 5주가 해당되었다. 한편 대조로 사용한 ATCC 균주는 R3 type에 해당하였다. 이로써 위의 PFGE와 RAPD 양상을 조합으로 묶어 구분해 본 결과 (PR typing), *rpoB/dotA* subgroup P-I에 속한 13주들은 모두 7가지 PR type으로 구분할 수 있었으며, P2R1 type의 균주가 가장 흔한 것 (4주)이었다 (Table 2). 또한 이를 통해, 단일 유전자의 염기서열 (*rpoB*와 *dotA*)로 grouping한 것보다 PFGE와 RAPD pattern을 조합하여 구분하는 것이 상대적으로 여러 그룹으로 나뉜 것을 확인할 수 있었으며 역학적인 의미를 부여할 수 있다.

고 찰

*L. pneumophila*는 이미 감염원과 감염경로, 진단 및 치료에 관해 많은 부분이 잘 알려져 있지만, 끊이지 않고 전 세계적으로 집단 발병을 일으키며 공중보건상의 큰 관심거리로 등장한지 오래되었다. 재향군인병은 이미 지역사회 획득 폐렴 (community-acquired pneumonia)의 적지 않은 비율을 차지하고 있으며, 우리와 생활환경이 비슷한 인근 일본에서는 *L. pneumophila* 집단 발병 예가 수차례 보고된 바 있었으나, 다행히 우리나라에서는 1984년의 Pontiac fever 이후로 집단 감염은 없었다 (12, 13). 그러나 그간 산발적이지만 *L. pneumophila* 감염 환자들이 있었다는 것과 주거 양태가 도시화-밀집화 되면서 늘어나게 되는 냉-난방 시설 같은 감염원 증가와 노출 기회 증가 등의 생활환경 변화로 인해서 비록 감시체계가 있지만, *L. pneumophila*를 포함한 약 20여 종의 인체 병원성 균종에 대하여 지속적으로 감시하며 경계해야 할 것으로 생각된다 (14, 33~38).

본 연구는 제주도라는 특징적으로 격리된 지역에서 분리한 *Legionella* 균종을 일차적으로 *rpoB*, *mip*와 *dotA* 염기서열 분석을 통해 동정하였다. 수집한 *L. pneumophila* 균들은 주로 도시지역의 건물에 위치한 냉각탑수 등을 비롯한 수조에서 분리된 균주들이었다. 세균 균종 동정은 전통적으로 생물학적 및 물리-생화학적 성상에 근거하여 수행해 왔으나, 본 연구에서는 배양을 통해 잠정적으로 *L. pneumophila*라고 동정된 균주들을 유전자 분석으로 동정하였다. 근래 들어서 특정 유전자 염기서열을

쉽게 결정하고 분석하는 것이 손쉬워짐에 따라 보다 정확한 동정을 위해 시행한 것이다. 이런 경우 표적으로 사용하는 유전자에 따라 동정 결과에 차이가 날 수 있어서 잘못 동정하는 위험을 줄이기 위해 몇 종류의 유전자를 같이 사용할 것을 권고하고 있다 (25, 28). 최근 국내에서 발굴된 *rpoB* 염기서열에 근거한 세균 동정이 기존에 많이 시행하던 16S rRNA 유전자 염기서열 분석의 한계점을 극복할 수 있음을 보여줬고, 또한 다른 균속의 균종 동정에도 많이 사용하고 있어 본 연구에서도 *rpoB*와 *mip* 유전자를 사용하였다. *L. pneumophila*라고 잠정적으로 예상했던 1균주는 두 유전자 분석 결과 동일하게 *L. erythra*에 가까운 균종으로 동정되어 *L. pneumophila* 유전형 분석에서 제외하였다. 다행히 *L. pneumophila* 21균주는 두 유전자 모두 같은 동정 결과를 보여 또 다른 유전자를 사용할 필요는 없을 것으로 판단하였다.

Legionella 균종들은 우리 주변환경에서 흔히 존재할 수 있는 것들로서 이들은 lateral gene transfer가 흔히 일어나는 것으로 알려져 있으며, 그로 인해 특정 지역에 특정 클론이 존재할 수 있어 해당 지역에서 인체 질환을 유발할 수도 있다 (19). 따라서 bacterial population structures를 파악하고 있다면 집단 발병 시에 감염원과 전파 과정을 파악하고 추적하기도 용이할 것이므로 이러한 database는 공중보건 정책상 중요한 도구가 될 것이다. *L. pneumophila*뿐 아니라 일반적으로 미생물에 의한 집단 감염 발생 시 중요한 것은 빠르고 정확한 원인균 동정-진단 및 치료와 함께 감염원과 전파 과정을 확인하고, 그 과정에 분리한 전파 과정으로부터 분리한 균주들이 환자 분리 균주와 동일한가를 확인하는 것이다. 이런 역학조사 시행의 경우 역시 신속하고 정확하며 보다 더 객관적인 결과를 제시할 수 있는 방법들을 개발하여 사용하고 있는데 바로 유전자를 대상으로 하는 유전형 분석이다. 본 연구에서는 *rpoB*와 *dotA* 염기서열을 직접 분석하는 subgroup typing 방법과 PFGE나 RAPD를 사용하였다. 다른 molecular marker를 사용하는 방법들도 있으나, DNA를 표적으로 하는 것이 전반적인 경향에 따른 것으로 타 연구 보고들과 비교할 수 있었다는 것을 고려하면 각기 장-단점을 확인할 수 있었다. PFGE의 경우 *L. pneumophila*를 대상으로 한 연구 결과가 국내에서도 이미 보고된 바 있다. 서울 또는 부산 시내 건물 냉각탑수에서 분리한 균주로 PFGE typing 등을 시행한 예이다 (23, 38). 서울 시내 냉각탑에서 분리한 균주를 대상으로

한 연구는 본 연구에서와 비슷한 22개 균주를 대상으로 시행한 PFGE를 보면 9가지 양상을 보고하였는데, 가장 흔한 것은 9주의 PFGE 양상으로써 A0라고 지칭한 것이었다. 이 type은 본 연구에서 분류한 P2에 유사한 것으로 추정할 수 있었을 뿐이었다. Marker DNA 및 각 균 DNA band의 크기를 알 수 없는 관계로 직접적인 비교가 불가능하였다. 동일한 제한 효소를 사용하여 시행한 경우라도, 사진으로 보고된 결과들과 비교하기는 어려웠다는 것은 실험실간의 결과 비교-교환 시 객관성이 다소 문제가 될 수 있을 것으로 보인다. 또한 PFGE 양상에 따라 균주들을 typing하여 명명한 것을 일일이 비교확인하기 힘들다는 것도 단점으로 볼 수 있다. 단, 한 연구자 또는 실험실에서 반복성을 갖추고 시행하는 경우에는 비교가 용이할 것으로 생각된다. RAPD도 비슷한 경우일 것이다.

한편 PFGE나 RAPD 같이 band pattern, 즉 이미지로 분류하는 것과는 달리 염기서열에 의한 typing은 좀 더 객관적인 분석이 가능할 것으로 보인다. *rpoB*는 DNA-dependent RNA polymerase의 β -subunit를 지령하고 특정 부위 변이가 rifampicin 내성과 관련 있다고 알려진 유전자이며, *dotA*는 *L. pneumophila*의 중요한 병원성 인자로써 integral cytoplasmic membrane protein인 DotA를 지령하는 유전자이다. 본 연구에서 사용한 균주들은 10개 *rpoB/dotA* *L. pneumophila* subgroup (28) 가운데 3개 subgroup (P-I, P-III, P-IV)에 속하는 것으로 확인하였다. 염기서열 분석법은 PFGE나 RAPD 같이 genomic DNA를 대상으로 하지만, 아날로그적인 이미지인 band pattern을 분석하는 것이 아니라 디지털화한 염기서열을 이용하여 객관적인 면이 강하였으며 좀 더 포괄적인 분석이 가능했다. 일반적으로 생각해 볼 때, 이 *rpoB/dotA* subgrouping은 PFGE나 RAPD typing에서의 band에 해당하는 것이 4개 염기로써 분석 범위가 커지면 그만큼 많은 변수를 다루게 되어 비교하는 균주간의 유전적 연관관계를 더 상세히 보여 주게 될 것이다. 특히 이들 subgroup은 염기서열에 따른 상대적 유사관계를 보기 위해 작성한 dendrogram 상에서 임의적으로 구분된 것이기 때문에 더 많은 균주 자료가 추가되면 새로운 grouping이 추가 가능한 유연성이 있다는 것이 특징이다. 역학조사에 사용하게 되는 경우에는 기계적으로 결정되는 염기서열이 자연스럽게 100% 상동성을 보여야 하는 만큼 이미지 분석보다는 훨씬 객관성을 나타낼 것이란 것도 바로 그 이유에서이다. 따라서

시행하는 상황이나 사람에 따라 얻게 되는 결과도 마찬가지로 편차가 거의 없을 것이어서 객관성이 염기서열 분석의 가장 큰 장점이라고 보인다. 또한 자동염기서열 분석기기가 급속히 발달하여 긴 유전자 염기서열도 단시간에 결정이 가능하고, 또한 GenBank와 같은 방대한 염기서열 database에 쉽게 접근하여 그 자료를 이용할 수 있으며, 또한 이로부터 필요한 염기서열 자료를 꺼내어 컴퓨터 분석이 용이한 장점이 있다. Multilocus sequence typing (39) 같은 sequence-based typing 방법이 역학조사에 있어서 serotyping 같은 방법에 비해 더 효과적이라는 연구보고도 있다 (40). 또한 population study에는 5~9개의 유전자를 비교할 표적으로 삼는데 (39), 보다 적은 수의 유전자를 대상으로 시행하여, 저비용으로 균주들을 분간할 수 있는 일관성 있는 결과를 얻을 수 있는 방법이라면 유용하다 할 것으로 본다 (28).

최근 한국과 일본에서 분리된 159균주에 대하여 *rpoB*와 *dotA* 염기서열에 근거한 *L. pneumophila rpoB/dotA* subgrouping 결과, *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*에 해당하는 8개 subgroup (P-I ~ P-VIII)과 *L. pneumophila* subsp. *fraseri* 2개 subgroup (F-I과 F-II) 등 모두 10개의 subgroup으로 나누어진다는 것이 보고된 바 있다 (25, 26). 이 논문이 흥미로운 것은 특정 지역 또는 환경에서 독특한 *L. pneumophila*의 genetic population이 존재할 가능성을 제시한 것인데, 한국에서는 없었던 subgroup들이 일본 균주들에서 나타나는 등 다소 차이가 있는 것이 확인되었기 때문이다. 사용한 국내 균주들은 제주도를 제외한 지역에서 분리된 *L. pneumophila*를 대상으로 하였으며 subgroup P-I이 대다수였던 것이다. P-III와 P-IV subgroup에는 주로 일본 균주들로서 한국 균주들은 소수가 속해 있었다. 본 연구에서는 제주도 분리균을 사용하여 지리적으로 중간에 위치하는 섬인 제주도에서 한국 또는 일본과 비슷하거나 또는 벗어나는 독특한 균주들이 분리될 가능성을 예상하였다. 그러나 역시 제주도 균주 중 대다수가 P-I에 속해 한국 균주들의 범주를 크게 벗어나는 균주는 없었으며, 대상 균주 수가 적기 때문에 추후 균주들을 늘려 나가는 것이 바람직할 것이라 생각한다. 특성이라고 하기는 어렵겠지만, 본 연구 결과에서 주목해 볼만한 것은 냉각탑수가 아닌 온수에서 분리되었다는 일본 균주들이 속한 P-III, P-IV subgroup에 많지 않은 제주도 분리 균주들이 한 균주씩 있었다는 것이다. 이점 역시 제주도 분리 균주 수를 늘려 분석해가면 이미 한국

-일본에서 확인된 clonal population들과 비교하여 제주도 나름대로의 특징을 발견할 수 있을 것으로 사료된다.

이상과 같이 본 연구에서는 역학조사에 사용할 수 있는 유전학적 정보를 확보하고자 제주도라는 제한된 환경에서 분리된 *Legionella* 22주를 *rpoB*와 *mip* 그리고 *dotA* 유전자 염기서열 분석으로 동정하였으며, 더 나가 *rpoB/dotA* 염기서열에 의한 subgrouping과 PFGE 및 RAPD로 유전자형을 구분하였다. 분석 대상 22주 가운데 22주가 *L. pneumophila*였으며 *L. pneumophila* 이외에 *L. erythra*와 가까운 균종도 1주 분리하였다. *L. pneumophila* 21주는 4개의 PFGE 유형 (PG1~PG4) 및 6개의 RAPD 유형 (R1~R6)으로 구분되었으며, 각기 P2와 R1이 가장 흔히 나타났다. *rpoB/dotA* subgroup은 예상대로 P-I이 가장 많았으며 온수에 서식하는 것이 의심되는 P-III과 P-IV도 한주씩 분포하였다. 이러한 결과는 제주도내 *L. pneumophila* 균종 분포 역시 유전적 다양성이 있음을 보여주는 것이며, 집단 발병 시에는 이러한 유전형을 복합하여 역학적 조사-연구에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Winn WC. *Legionella*. In Murray, P. R. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. (American Society for Microbiology, Washington, D. C.), 2007.
- 2) Harb OS, Gao LY, Abu-Kwaik Y. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* 2000;2:251-65.
- 3) Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, *et al.* Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977;297:1189-97.
- 4) Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* 1999;1: 283-93.
- 5) Benin AL, Benson RF, Arnold KE, Fiore AE, Cook PG, Williams LK, *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *J Infect Dis* 2002;185:237-43.
- 6) Benkel DH, McClure EM, Woolard D, Rullan JV, Miller GB Jr, Jenkins SR, *et al.* Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *Int J Epidemiol* 2000; 29:1092-8.
- 7) Correia AM, Goncalves G, Reis J, Cruz JM, Castro e Freitas JA. An outbreak of legionnaires disease in a municipality in northern Portugal. *Euro Surveill* 2001;6:121-4.
- 8) Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, *et al.* A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002;8:37-43.
- 9) Fernandez JA, Lopez P, Orozco D, Merino J. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:729-35.
- 10) Formica N, Tallis G, Zwolak B, Camie J, Beers M, Hogg G, *et al.* Legionnaires' disease outbreak: Victoria's largest identified outbreak. *Commun Dis Intell* 2000;24:199-202.
- 11) Jansa JM, Cayla JA, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador M, *et al.* An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:831-8.
- 12) Miyamoto H. Prevention measures against *Legionella* infection in a circulating hot water bath. *J UOEH* 2003;25:61-77.
- 13) 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.
- 14) Choe KW, Kim SM, Kim YS, Kim HJ, Woo JH, Chong YS. A case of Legionnaires' disease. *Korean J Inf Dis* 1990;22:93-6.
- 15) Schoonmaker D, Heimberger T, Birkhead G. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 1992;30:1491-8.
- 16) Thouverez M, Godard C, Leprat R, Talon D. Is pulsed-field gel electrophoresis a valuable tool to identify nosocomial cases of *Legionella pneumophila* disease? *J Hosp Infect* 2003;55: 254-9.
- 17) De Zoysa AS, Harrison TG. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with *SfiI* and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *J Med Microbiol* 1999;48:269-78.
- 18) Costa J, Tiago I, da Costa MS, Verissimo A. Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:663-71.
- 19) Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, *et al.* Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients

- and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol* 1999;37:2652-5.
- 20) Sohn JW, Cheong HJ, Woo HJ, Kim WJ, Kim MJ, You SH, *et al.* A molecular epidemiological study on a cluster of *Legionella pneumonia* occurred in a tertiary-care hospital. *Korean J Infect Dis* 1998;30:218-26.
 - 21) Kim KY, Kim YS, Song JC, Lee SJ, Kim SU, Choi TY, *et al.* Comparison of methods for identification and the effects on *Legionella pneumophila* of the cooling towers in Seoul. *J Korean Soc Occup Environ Hyg* 2003;13:234-53.
 - 22) Kim JM, Kim KH, Song EJ, Lee SM, Lee EY, Park EH, *et al.* Molecular epidemiologic analysis of *Legionella pneumophila* by infrequent-restriction-site polymerase chain reaction. *Korean J Clin Microbiol* 2006;9:24-9.
 - 23) Park EH, Kim MH, Kim JA, Han NS, Lee JH, Min SG, *et al.* Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolated in Busan, using PFGE. *J Life Science* 2005;15:161-8.
 - 24) Kim KB, Kim WJ, Kim MJ, Park SC, You SH, Shim HS, *et al.* A surveillance study of cooling tower water of large buildings in Seoul City for *Legionella* species with molecular analysis. *Korean J Infect Dis* 1998;30:207-17.
 - 25) Ko KS, Lee HK, Park MY, Park MS, Lee KH, Woo SY, *et al.* Population genetic structure of *Legionella pneumophila* inferred from RNA polymerase gene (*rpoB*) and DotA gene (*dotA*) sequences. *J Bacteriol* 2002;184:2123-30.
 - 26) Ko KS, Miyamoto H, Lee HK, Park MY, Fukuda K, Park BJ, *et al.* Genetic diversity of *Legionella pneumophila* inferred from *rpoB* and *dotA* sequences. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:254-61.
 - 27) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, *et al.* Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 1999;37:1714-20.
 - 28) Ko KS, Lee HK, Park MY, Lee KH, Yun YJ, Woo SY, *et al.* Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 2002;40:2653-8.
 - 29) Park MY, Ko KS, Lee HK, Park MS, Kook YH. *Legionella busanensis* sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:77-80.
 - 30) Nielsen K, Hindersson P, Hoiby N, Bangsbo JM. Sequencing of the *rpoB* gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the *Legionellaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2679-83.
 - 31) 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.
 - 32) Riffard S, Lo Presti F, Vandensech 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.
 - 33) Woo JH, Kim SA, Park CS, Choi TY, Chang IC, Lee IS. Nosocomial Legionnaire's disease--a case report and review of the literature. *Korean J Intern Med* 1992;7:68-72.
 - 34) Choi TY, Kim WB, Lee DW, Kang DY. Three cases of hospital-and community-acquired legionnaires' disease. *Korean J Clin Pathol* 1993;13:467-72.
 - 35) Choi HK, Lee CK, Lee DH, Kim YK, Lee KN, Kwon YJ, *et al.* Two cases of Legionnaires' disease in SLE patients with steroid therapy. *Korean J Clin Pathol* 1997;17:491-8.
 - 36) Jo SK, Shin JH, Jung KM, Kwon YJ, Kim MJ, Pyo HJ, *et al.* 2 cases of Legionnaires' disease with multiple cavitory mass-like lesions in patients with systemic lupus erythematosus. *Korean J Nephrol* 1998;17:157-61.
 - 37) Kim KB, Kang MS, Chung HJ, Woo HJ, Kim MJ, You SH, *et al.* A case of fatal nosocomial Legionnaires' disease by *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Korean J Infect Dis* 1998;30:106-10.
 - 38) 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.
 - 39) Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003;11:479-87.
 - 40) Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 2003;41:2932-9.