

Real-time PCR을 이용한 환경 중 물 시료의 레지오넬라 분석법 연구

이정희[†] · 박명기 · 김윤성 · 윤희정 · 이창희 · 정아용 · 윤미혜
경기도보건환경연구원 면역진단팀

Study on the Enumeration of *Legionella* in Environmental Water Samples Using Real-time PCR

Jung-Hee Lee[†], Myoung-Ki Park, Yun-Sung Kim, Hee-Jeong Yun,
Chang-Hee Lee, Ah-Yong Jeong, and Mi-Hye Yoon

Team of Immunodiagnosis, Gyeonggi-province Institute of Health and Environment

ABSTRACT

Objectives: The standard method for the enumeration of environmental *Legionella* is culturing, which has several disadvantages, including long incubation and poor sensitivity. The purpose of this study is to demonstrate the usefulness of real-time PCR and to improve the standard method.

Methods: In 200 environmental water samples, a real-time PCR and culture were conducted to detect and quantify *Legionella*. Using with the results of the survey, we compared the real-time PCR with the culture.

Results: Each real-time PCR assay had 100% specificity and excellent sensitivity (5 GU/reaction). In the culture, 36 samples were positive and 164 samples were negative. Based on the results of the culture, real-time PCR showed a high negative predictive value of 99%, 35 samples were true positive, 105 samples were true negative, 59 samples were false positive and one sample was a false negative. Quantitative analysis of the two methods indicated a weak linear correlation ($r^2=0.29$, $r^2=0.61$, respectively).

Conclusions: Although it is difficult to directly apply quantitative analysis results of real-time PCR in the enumeration of environmental *Legionella*, it can be used as a complementary means of culturing to rapidly screen negative samples and to improve the accuracy of diagnosis.

Key words: Culture, environment, *Legionella*, real-time PCR, water sample

I. 서론

레지오넬라증(Legionellosis)은 1976년 미국 재향 군인회에 참가한 회원들과 인근 지역 주민들 사이에서 집단 폐렴이 발생하여 처음으로 보고된 후, 전 세계적으로 산발적, 또는 집단으로 발생하고 있다.¹⁾ 우리나라에서는 1984년 7월 서울소재 종합병원 중환자실에서 중환자와 의료진 26명 중 23명에게 원인불명의 집단폐렴이 발생하여 처음 알려지기 시작

하였으며,²⁾ 2000년에 제3군 법정감염병으로 지정되었다. 질병관리본부의 감염병통계³⁾에 의하면, 2006년 이후 20~30명 수준으로 신고 되다가 2016년 128건, 2017년 198건으로 신고건수가 크게 증가하였다. 발생 양상을 월별로 분석하면 연중 발생하지만 6~8월에 상대적으로 많이 발생하고 있다. 이 질환은 레지오넬라 폐렴(Legionnaires' disease)과 독감형인 폰티악열(Pontiac fever)의 두 가지 유형이 있으며 레지오넬라 폐렴은 심각한 감염증을 나타내고 폰티악

[†]Corresponding author: Team of Immunodiagnosis, Gyeonggi-province Institute of Health and Environment, Suwon, 16205, Korea, Tel: +82-31-250-5005, Fax: +82-31-250-5008, E-mail: tenbora@gg.go.kr
Received: 22 August 2019, Revised: 16 October 2019, Accepted: 17 October 2019

열의 경우 경미한 증상을 나타낸다. 레지오넬라 폐렴의 주요 증상은 두통, 근육통, 허약감, 고열, 오한 등 비특이적 증상이 나타나며 마른기침, 복통, 설사 등이 동반된다. 폰티악열은 짧은 잠복기의 급성 발열성 질환으로 특별한 치료 없이 2~5일 내 회복이 된다.⁴⁾ 대체로 건강한 사람들에게는 경미한 증상 형태로 발병하나 면역체계가 약한 사람이나 노인에게 심각한 증상이 나타난다.⁵⁾

원인균인 레지오넬라균은 그람음성 호기성 단간균으로 지금까지 50여종이 알려져 있으며, 20여 종의 레지오넬라균이 사람에게 감염을 일으키는 것으로 보고되었다.⁶⁾ 그중 레지오넬라증의 80~90%는 *L. pneumophila*가 원인균인 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 주요 감염경로는 냉각탑, 건물의 수계시설,⁸⁾ 온천⁹⁾ 등에 존재하던 균이 에어로졸 형태로 인체에 흡입되면서 전파되며, 일반적으로 사람 간 전파는 없다. 생육환경은 pH 7.2~8.3, 온도는 25~45°C의 다양한 환경 조건에서 생존이 가능하며, biofilm이나 원생동물에 기생하는 경우가 많아 염소와 같은 소독제에 강한 내성이 생긴다.

질병관리본부와 국립환경과학원의 지침에 따른 환경 중 레지오넬라 표준분석법은 배양법³⁾인데 GVPC (Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide)와 BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract Ketoglutarate) 배지에 접종하여 3~14일간 배양하여 집락을 관찰하는 분석법이다. 이 분석법은 대부분의 레지오넬라증을 진단할 수 있으며, 감염을 일으키는 살아있는 세균만 구별하여 진단할 수 있다. 그러나 배양에 긴 시간이 소요되어 검사결과 보고 및 향후 대처가 늦어져 면역체계가 약한 사람들에게는 치명적일 수 있다.¹⁰⁾ 또한 감도가 낮고, VBNC (Viable But Non Culturable) 세균 및 원생생물에 기생하고 있는 세균 등을 검출할 수 없기 때문에 위음성이 존재하여 레지오넬라균이 자라는 실제 환경에서의 임상발병률과는 차이가 있을 수 있다.¹¹⁾ 이는 레지오넬라증이 유행할 때 정확한 역학조사를 어렵게 한다.

이러한 배양법의 대안으로 real-time PCR이 널리 받아들여지고 있다. Real-time PCR은 민감성, 특이성, 재현성이 높고 진단 시간을 4시간 이내로 크게 단축 할 수 있어 거의 실시간으로 치료 및 예방 조치를 취할 수 있다.¹²⁾ 이러한 장점에도 불구하고 real-time PCR (Genome Unit, GU)에 의해 얻어진 결과

와 배양법(Colony Forming Unit, CFU)에 의해 얻어진 결과에 큰 차이가 있어서 실제로 일상적인 검사에 적용했을 때 혼선을 일으킬 수 있다. 따라서 환경 중 물 시료의 레지오넬라균에 대한 배양법과 real-time PCR을 비교 및 분석하여 real-time PCR의 유용성을 평가하고 적용방안을 모색하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구는 국제표준규격인 ISO/TS 12869:2012¹³⁾와 ISO/TS 12869:2019¹⁴⁾를 참조하여 국내 실정에 적합한 검사 방법을 수립하고 시행하였다.

1. 물 시료 수집 및 전처리

레지오넬라균 검사를 목적으로 2018년 2~9월 사이에 의뢰된 냉각탑수, 온수, 냉수, 수도물, 저수조 등 물 시료 200개를 수집하였다. 이 시료 1 L를 0.45 µm 여과지로 농축 후, 20 mL의 멸균수에 재부유하였다. 농축액은 양분하여 10 mL은 real-time PCR에 사용하고 나머지 10 mL은 50°C, 30분 동안 열처리하여 배양법에 사용하였다.

2. 배양법

열처리한 농축액의 원액과 10배 희석액을 각각 0.1 mL 씩 GVPC와 BCYE 배지에 접종하여 35~37°C의 배양기에서 3~14일간 배양하며 집락을 관찰하였다. 레지오넬라균으로 의심되는 집락을 1차 선별하여 *16S rRNA*, *mip* 유전자를 PCR을 시행하여 확인하였다. PCR 결과 양성으로 판정되면 의심되는 모든 집락을 선별하여 개수를 확인하였다. 배양법으로 검출 할 수 있는 최저 균수는 200 CFU/L이다.

3. DNA 추출

PowerPrep™ Quick DNA Extract kit (Kogene biotech, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 농축액 10 mL을 3,000 rpm으로 15분 동안 4°C 조건에서 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물 50 µL만 남긴 후 Quick DNA Extract Solution 650 µL을 첨가하였다. 15초 동안 교반하여 완전히 혼합시킨 뒤, 95~100°C에서 10분간 가열한 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 주형 DNA로 사용하였다.

4. Multiplex real-time PCR 반응

Legionella spp.와 *L. pneumophila* 동시 검출용 Multiplex real-time PCR kit (Kogene biotech, Korea) 를 사용하였다. 이 kit는 *Legionella* spp.와 *L. pneumophila* 의 각각 16S rRNA와 mip 유전자를 표적유전자로 하여 primer와 probe가 제작되었다.

위에서 추출한 DNA 5 µL을 이 kit에 넣은 후 반응액이 완전히 섞이도록 하였다. 유전자 증폭을 위해 실시간 유전자 증폭기(7500 Fast Real Time PCR System; Applied Biosystems, USA)를 사용하여 반응조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 처리 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle 수행하였다.

5. Real-time PCR 특이도 시험

특이도를 분석하기 위하여 Table 1과 같이 레지오넬라 표준균주 5종, 경기도내 환경 시료에서 분리된 레지오넬라균 15종 및 non-*Legionella* 표준균주 47종을 이용하였다. 모든 균주는 GVPC 배지에서 배양 후 DNA를 PowerPrep™ Quick DNA Extract kit로 추출하여 시험하였다.

6. Real-time PCR용 표준곡선 작성

L. pneumophila sg1 (serogroup1)의 genomic DNA로 구성된 PCR Quantification Standards (Minerva Biolabs GmbH, Germany)를 사용하여 표준곡선을 작성하였다. Standard DNA (genomic DNA)를 5~5×10⁵ GU (Genome Unit)으로 6단계 희석하여 각 단계의 희석물질을 real-time PCR을 시행할 때 마다 3 well 씩 반응시키고 분석하여 16S rRNA와 mip 유전자 각각의 linearity를 측정하였다.

7. LOD (Limit of Detection)와 LOQ (Limit Of Quantification)

Real-time PCR의 검출 한계(LOD)는 90% 신뢰도로 real-time PCR에 양성 결과를 보이는 가장 낮은 GU (Genome Unit)로 정의하였다. 즉, 10개의 *Legionella* standard DNA dilutions (1, 5, 10, 20, 100, 5×10¹~10⁵ GU/PCR well)을 10번 반복하여 측정 후, 90%의 양성율을 나타내는 최소의 GU를 LOD로 정의하였다.

정량한계(LOQ)는 0.15 log₁₀ 이하의 정확도(E_{LOQ})로 정량화할 수 있는 최소 GU로 정의하였다. 즉, 10개의 *Legionella* standard DNA dilutions (1, 5, 10, 20, 100, 5×10¹~10⁵ GU/PCR well)을 real-time PCR로 정량한 후, 아래와 같은 공식으로 정확도를 계산하였다.

$$E_{LOQ} = \sqrt{s^2 + [\bar{x}'_i - \log_{10}(x)]^2}$$

E_{LOQ} : LOQ의 정확도

x : 이론적으로 예상되는 GU값

x'_i : 실제 real-time PCR 결과 측정된 GU값을 log₁₀로 환산한 값

\bar{x}'_i : x'_i 의 평균

s : x'_i 의 표준편차

이론적인 LOD 및 LOQ의 리터당 GU 즉, LOD_{meth}, LOQ_{meth}로 환산하기 위한 계산식은 아래와 같다.

$$\text{LOD}_{\text{meth}} \text{ 또는 } \text{LOQ}_{\text{meth}} = \frac{L \times F}{V}$$

F : GU/PCR well을 GU/L로 환산 계수

L : LOD 또는 LOQ

V : 시료 중 real-time PCR에 사용된 부피의 비율

8. Recovery

DNA 추출 과정에서의 DNA 손실을 모니터링하기 위해 DNA 추출키트의 recovery를 측정하였다. Standard DNA 1×10⁴ GU와 1×10⁵ GU를 각각 농도별로 3개씩 DNA 추출키트에 넣고 3의 DNA 추출방법과 동일하게 추출하였다. 추출한 DNA는 real-time PCR을 수행하여 DNA 양을 측정하였다. 이 과정을 총 3번 반복하였다.¹⁵⁾

9. 데이터 분석

Real-time PCR의 데이터는 AppliedBiosystems Real-Time PCR System Sequence Detection Software version.1.4를 사용하여 분석하였다. 배양법과 real-time PCR의 결과비교 및 상관관계(Correlation) 계산은 Microsoft Excel을 사용하였다.

III. 결 과

1. Real-time PCR의 특이도

Real-time PCR 결과 레지오넬라 표준균주 5종과 환경 분리균주 레지오넬라균 15종은 *Legionella* spp. 와 *L. pneumophila* 균주 분리동정 결과와 일치하였다. 그리고 non-*Legionella* 균주는 real-time PCR 결과 검출되지 않아 100%의 특이도를 보였다(Table 1).

2. Real-time PCR의 linearity

16S rRNA 및 *mip* 유전자의 linearity를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. r^2 values는 모두 0.99 보다 크며, reaction efficiency는 각각 99.5%, 82%로 ISO/TS 12869의 기준치인 reaction efficiency 75%~125%를 모두 충족했다.

Table 1. List of *Legionella* and non-*Legionella* strains used for specificity tests

Organism	Strain/source	Inclusivity	
		<i>16S</i>	<i>mip</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC [†] 33152	+	+
<i>Legionella pneumophila</i>	KCTC [‡] 12009	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg1	Environment [§]	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg2	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg3	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg4	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg5	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg6	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg8	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg9	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg10	Environment	+	+
<i>L. pneumophila</i> sg12	Environment	+	+
<i>L. anisa</i>	Environment	+	-
<i>L. birminghamensis</i>	KCTC 12007	+	-
<i>L. brunensis</i>	KCTC 12084	+	-
<i>L. dumofii</i>	Environment	+	-
<i>L. israelensis</i>	KCTC 12008	+	-
<i>L. piritensis</i>	Environment	+	-
<i>L. rubrilucens</i>	Environment	+	-
<i>Legionella</i> spp. Non-type	Environment	+	-

[†]American Type Culture Collection

[‡]Korean Collection for Type Cultures

[§]Environmental isolates

3. LOD (Limit of Detection)와 LOQ (Limit of Quantification)

*16S rRNA*와 *mip* 유전자의 LOD와 LOQ는 각각 5 GU/PCR well과 10 GU/PCR well로 측정되었다. 시료 1 L 당 LOD_{meth}와 LOQ_{meth}는 각각 1,400 GU/L와 2,800 GU/L이며, log₁₀ 단위로 환산하면 각각 3.1 log₁₀GU/L와 3.4 log₁₀GU/L이다.

4. Recovery

PowerPrepTM Quick DNA Extract kit의 recovery는 0.06~0.16 log₁₀unit (평균 0.11 log₁₀unit)으로 ISO/TS 12869의 기준치인 -0.6~+0.3 log₁₀unit을 충족했다.

5. 배양법과 real-time PCR의 검출결과 비교

물 시료(냉각탑수 22개, 온수 88개, 냉수 70개, 저수조 14개, 분수 6개) 200개를 배양법과 real-time PCR로 검사한 결과의 비교는 Table 2와 같다. 이 분석은 LOD 보다 큰 모든 물 시료를 양성으로 간주하였다.

배양법 검사 결과 레지오넬라가 36개 시료에서 검출되었는데 *Legionella* spp.는 200~26,400 CFU/L (2.30~5.18 log₁₀CFU/L), *L. pneumophila*는 200~150,400 CFU/L (2.30~4.42 log₁₀CFU/L)의 범위에서 검출되었다. Real-time PCR은 94개의 시료에서 레지오넬라균이 검출되었는데 *Legionella* spp.는 3.14~6.91 log₁₀GU/L, *L. pneumophila*는 3.27~6.43 log₁₀GU/L 범위에서 검출되었다.

Real-time PCR의 배양법에 대한 결과 예측능력을 분석하기 위해 양성예측도(Positive Predictive Value)와 음성예측도(Negative Predictive Value)를 분석한 결과는 Table 3과 같다. *16S rRNA*와 *mip* 유전자의 양성예측도는 각각 37, 44%로 낮은 편이었고, 특히 배양법에 대한 위양성이 *L. pneumophila* 보다 *Legionella* spp.에서 더 많이 나타났다.

$$\text{양성예측도} = \frac{\text{진양성}}{\text{진양성} + \text{위양성}} \times 100$$

음성예측도는 *16S rRNA*와 *mip* 유전자 모두 99%로 높은 민감도를 보였다.

$$\text{음성예측도} = \frac{\text{진음성}}{\text{진음성} + \text{위음성}} \times 100$$

Table 1. Continued

Exclusivity			
Organism	Strain/source	Organism	Strain/source
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1013	<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 12397
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	KCTC 12398
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCTC 1108	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	ATCC 14028
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 10380	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	KTCC 9120
<i>Campylobacter coli</i>	KCTC 15212	<i>Salmonella enterica subsp. houtenae</i>	ATCC 43974
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Clostridium difficile</i>	ATCC 9689	<i>Salmonella typhi</i>	NCCP ¹ 10337
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ATCC 27010	<i>Salmonella typhimurium</i>	NCCP 10812
<i>E. coli</i>	KCCM 11234	<i>Shigella flexneri</i>	KCTC 2517
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43888	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43890	<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 22530
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43889	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565
<i>E. coli</i> O91:H21	ATCC 51434	<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 11470
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43894	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 23235
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895	<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 11470
<i>E. coli</i> O25:K98:NM	ATCC 43886	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>E. coli</i> O78:H11	ATCC 35401	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	<i>Vibrio vulnificus</i>	KCTC 2980
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM ² 41657
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Mycobacterium pneumoniae</i>	ATCC 15531		

¹National Culture Collection for Pathogens²Korean Culture Center of Microorganisms

배양법과 real-time PCR의 정량분석 결과 비교는 모두 LOQ 보다 큰 시료만 적용하였다. 양의 상관관계를 계산하기 위해서는 두 방법에서 모두 정량이 가능해야하기 때문이다. 따라서 음성시료와 LOQ 보다 적은 시료는 통계에서 제외하였다. 배양법과의 real-time PCR 정량분석 결과를 비교해 보면 Fig. 2와 Fig. 3과 같이 배양법과 real-time PCR 결과 사이에 약한 선형 상관관계(각각 $r^2=0.29$, $r^2=0.61$)가 관찰되었다.

IV. 고 찰

현재 환경 중 레지오넬라 분석법은 질병관리본부와 국립환경과학원에서 발간한 지침을 따르고 있는

데 이 지침들은 모두 배양법을 표준분석법으로 지정하고 있다. 배양법은 3~14일 정도 배양을 해야 하기 때문에 최종결과 통보까지 긴 시간이 소요되며, 감도가 낮고, 검사자에 따라 다른 결과가 나올 확률이 높다는 단점이 있다.

이러한 단점을 보완하기 위해 유럽에서는 물 시료를 농축한 후 바로 real-time PCR로 증폭하여 레지오넬라균을 검출하고 정량분석하는 방법에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 2012년에는 국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)에서 이에 대한 표준규격을 마련하여 발간하였다. 그리고 이 규격을 충족하는 몇 가지 DNA extract kit와 농축용 여과지를 포함하는 real-time PCR 진단키트가 개발되어 시판되고 있다.

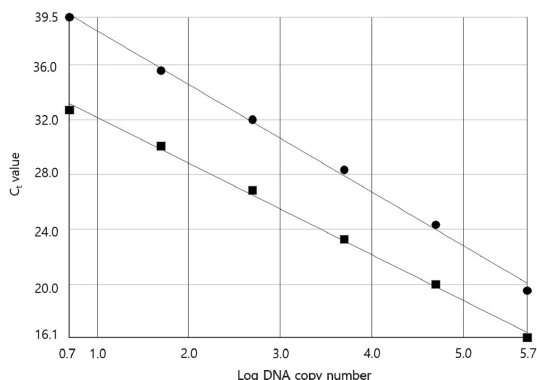


Fig. 1. Standard curves for quantification of real-time PCR assays. Standard curves were obtained using standard materials (*Legionella pneumophila* sg1 genomic DNA) corresponding to between 5 and $5 \times 10^1 \sim 10^5$ GU (genome unit) /reaction. Standard materials were prepared by 6 step 10X dilutions. *16S rRNA* (■) and *mip* (●) standard curves were derived from the multiplex assay. C_t =threshold cycle.

Table 2. Comparison of the detection *Legionella* spp. and the detection *Legionella pneumophila* using real-time PCR relative to culture; culture and real-time PCR positive value > LOD (limit of detection)

	Real-time PCR		Culture + Culture -	Total
	+	-		
<i>Legionella</i> spp. (16S rRNA)	35	1	59	200
<i>L. pneumophila</i> (mip)	24	2	30	200

Table 3. Ability of real-time PCR to positive predict value and negative predict value relative to culture

	<i>Legionella</i> spp. <i>L. pneumophila</i>	
	(%)	(%)
Positive predict value	37	44
Negative predict value	99	99

그러나 아직 국내에서는 이러한 방법에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았다. 국내 물 시료는 외국의 물 시료와는 특성이 다를 수 있으며, 표준분석법인 배양법도 국가마다 약간씩 지침이 상이하다. 예를 들어 영국 지침에 따른 배양법의 LOD (Limit of

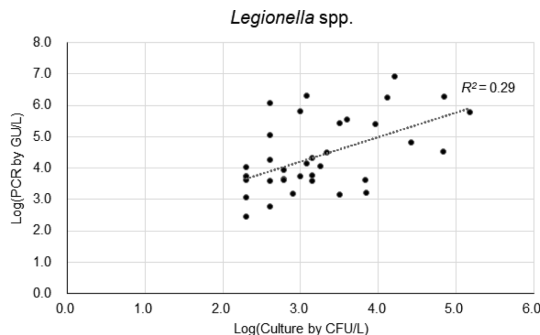


Fig. 2. Correlation of *Legionella* culture and real-time PCR results (*16S rRNA*) for 30 of 200 water samples. For the comparison of culture and real-time PCR, sample pairs below the quantification limit were omitted. Correlation indicate weak linearity ($r^2=0.29$) between culture and real-time PCR. GU/L=genome unit per liter, CFU/L=colony forming unit per liter.

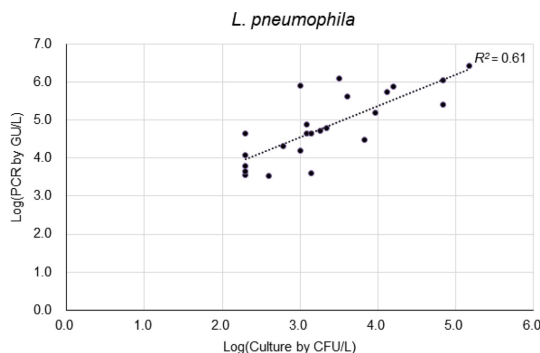


Fig. 3. Correlation of *Legionella* culture and real-time PCR results (*mip*) for 24 of 200 water samples. For the comparison of culture and real-time PCR, sample pairs below the quantification limit were omitted. Correlation indicate linearity ($r^2=0.61$) between culture and real-time PCR. GU/L=genome unit per liter, CFU/L=colony forming unit per liter.

Detection)는 20 CFU/L이지만,¹⁶⁾ 우리나라 질병관리 본부의 지침을 따를 경우 일반적으로 200 CFU/L가 LOD이다.³⁾ 즉 영국의 배양법이 우리나라의 배양법보다 민감도가 10배 높기 때문에 real-time PCR과 배양법의 비교연구를 할 때 영국의 real-time PCR 진단법을 그대로 적용할 경우 위양성이 매우 많아진다. 또한 해외에서 개발된 real-time PCR 진단 키트는 가격이 너무 비싸며 적용 가능한 real-time PCR

장비도 한계가 있어 장비를 교체해야 하므로 국내 현실과는 맞지 않는다. 따라서 본 연구는 국내 제조 사양 중 민감도가 낮고 저렴하며 사용법이 매우 간단한 boiling법을 적용한 DNA extract kit와 일반적으로 배양한 집락에서 레지오넬라균을 검출할 때 많이 사용하는 국내 K사의 레지오넬라 검출용 multiplex real-time PCR kit를 선정하여 환경 중 물 시료 200개를 농축 후 검사에 적용하였다. 그리고 같은 농축액으로 질병관리본부 지침에 따라 배양법을 시행한 후 그 결과를 서로 비교하였다.

양성예측도와 음성예측도를 분석한 결과 배양법에 대한 위양성이 *L. pneumophila* 보다 *Legionella* spp.에서 더 많이 나타났는데 이는 기존의 연구와 일치한다.¹⁷⁾ 배양법은 원래 *L. pneumophila* sg1을 분리하기 위해 설계되었기 때문에 pH, 온도 등 성장조건이 다른 *Legionella* spp.는 검출할 수 없어 균주 분리에 대한 편향성을 내포하고 있기 때문이다.¹⁸⁾ *16S rRNA*와 *mip* 유전자의 양성예측도는 각각 37%, 44%로 낮은 편이지만 음성예측도는 모두 99%로 높은 민감도를 보였다. 따라서 200개 시료 중 real-time PCR 결과 음성 물 시료는 105개(52.5%)인데, 이 물 시료들에 대해서는 음성예측도가 높으므로 배양법을 생략할 수 있다.

배양법과 real-time PCR의 결과 사이에 약한 선형 상관관계(각각 $r^2=0.29$, $r^2=0.61$)가 관찰되었는데 이는 두 방법 사이에 직접적인 비교가 어렵다는 것을 보여준다. CFU와 GU의 결과 사이의 불일치는 환경 중 물 시료의 레지오넬라 진단에 real-time PCR의 도입을 어렵게 하는 가장 큰 원인이다.¹⁹⁾

1개의 물 시료는 배양법으로는 400 CFU/L이 검출되었는데, real-time PCR에서는 LOD_{meth} (1,400 GU/L) 보다 적은 960 GU/L이 검출되어 위음성으로 진단되었다. 이는 레지오넬라균이 미량인 경우 매우 드물지만 위음성으로 진단될 가능성이 있음을 시사한다. 또한 2개의 시료는 배양법으로는 *L. pneumophila*로 진단되었으나 real-time PCR로는 *16S rRNA* 유전자만 증폭되고 *mip* 유전자는 증폭되지 않아 *Legionella* spp.로 진단되었다. 이는 multiplex real-time PCR 중 *16S rRNA* 유전자가 *mip* 유전자보다 더 민감도가 높기 때문으로 보인다(Fig. 1). 따라서 음성 선별을 위해서는 *16S rRNA* 유전자의 분석 결과를 활용해야 한다. 하지만 정량분석결과 배양법과

의 선형 상관관계가 *16S rRNA* 유전자보다 *mip* 유전자가 더 크므로 살아있는 균수를 더 잘 반영한다고 보이며, 레지오넬라증 중 80~90%는 *L. pneumophila*가 원인균이므로 역학적인 측면에서는 *mip* 유전자의 분석 결과를 참고해야 한다.

CFU와 GU의 결과가 불일치하는 이유는 real-time PCR이 아메바 내부에 기생하는 세균 뿐 아니라 죽어가는 세균,²⁰⁾ VBNC 및 손상된 세균²¹⁾ 등 배양이 안 되는 다양한 *Legionella* spp.를 검출할 수 있기 때문이다.²²⁾ Real-time PCR은 살아있는 세균과 죽은 세균을 구별하지 못하기 때문에 실제 감염성을 가진 레지오넬라의 농도를 측정할 수 없어 위양성률이 높다.

이러한 위양성을 줄이고 양성예측도를 높이기 위해서 real-time PCR을 수행하기 전에 시료에 EMA (Ethidium Monoazide)이나 PMA (Propidium Monoazide) 처리를 하는 방법도 있다. EMA와 PMA는 세포벽이 손상된 세균에 침투해서 DNA와 결합하여 real-time PCR 과정에서 증폭을 방해하여 살아있는 세균만 선별적으로 증폭시키는 역할을 한다. 그러나 이러한 방법도 완전히 생균수만을 반영하지는 못하며 모든 시료에 적합하지도 않다.²³⁾

하지만 죽은 세균의 검출이 유용한 정보를 제공하는 경우도 있다. 예를 들어 수계시설에 죽은 레지오넬라균이 존재한다는 것은 시설관리자가 적절한 관리 및 통제를 하고 있다고 볼 수도 있지만, 때로는 검사 직전 소독약을 급하게 투여했을 가능성도 내포하고 있다. 이런 경우 배양이 어려워 균의 존재 및 출처를 증명하기가 어렵게 된다. 그러므로 이러한 가능성이 의심되는 시설에 대해 real-time PCR을 시행하여 레지오넬라균이 검출된다면 배양법에서 불검출되더라도 추가검사를 할 필요가 있다.²⁰⁾

그리고 배양법은 배양에 3~14일이 소요되지만 real-time PCR검사는 4시간 이내에 완료되며, 양성예측도가 99%로 민감도가 매우 높으므로 *Legionella* spp.에 대해 real-time PCR 결과 음성인 물 시료에 대해 배양을 생략할 수 있어 대량의 시료를 신속하게 처리할 때 유용하다. 200개 물 시료를 건물별로 구분하면 약 50% 건물의 수계시설에서 레지오넬라균이 전혀 검출되지 않았다. 이러한 건물은 빠른 시일 내에 수계시설의 가동을 시작할 수 있어 검사 결과가 나올 때까지 장기간 수계시설을 가동하지 못했을 때의 경제적인 손실을 줄일 수 있다.²⁴⁾ 비록 검사 자

체에 소요되는 비용은 배양법과 real-time PCR법을 동시에 시행하면 1건의 물 시료 당 대략 1만원 정도 더 많아지지만(현행 4만원), 수계시설을 조기에 가동함으로써 생기는 영업이익과 레지오넬라증의 집단발병을 효과적으로 예방하여 생기는 경제적인 가치는 이보다 더 크다고 생각된다.

Real-time PCR은 GU 단위를 CFU 단위로 직접 환산할 수 없으나 농축한 물 시료를 이용하여 배양법과 real-time PCR을 동시에 시행한다면 이 두 방법이 상호 보완을 할 수 있어 시간을 절약하고 정확도를 높일 수 있으며 잠재적인 경제효과를 볼 수 있다.

V. 결 론

해외에서는 환경 중 물 시료를 농축한 후 바로 real-time PCR을 적용하여 레지오넬라균을 검사하는 방법에 대한 연구가 활발하다. 유럽에서는 ISO/TS 12869의 규격을 충족하는 상업적으로 이용 가능한 몇 가지 real-time PCR 진단 키트가 존재하며 민간에서 널리 활용되고 있다.²⁰⁾ 그러나 이러한 검사법에 대해 국내에서는 아직 우리 실정에 맞는 real-time PCR을 이용한 진단 시스템에 대한 연구가 부족하며 공식적인 인증도 이루어지지 않은 상태이다.

이에 본 연구에서는 ISO/TS 12869:2012와 ISO/TS 12869:2019를 참조하여 국내 환경에 적합한 real-time PCR을 수립하고 시행하였다. 그 결과 99%의 높은 음성예측도를 보여 4시간 안에 52.5%의 음성을 선별하고 신속하게 양성을 확인할 수 있었다. 이것은 시간과 노동력을 절약하는 효과가 있고 검사 대상 수계시설의 빠른 재가동이 가능해 잠재적으로 경제적인 효과가 있다.

Real-time PCR과 배양법의 정량분석은 상관관계가 낮아 직접적인 비교는 어려웠다. 이것은 real-time PCR이 감염력이 있는 세균과 죽은 세균을 구분 못하기 때문인데 이로 인해 위양성이 많아진다. 그러나 지속적으로 관리를 하지 않고 검사 직전에 소독약을 급하게 투여 했을 경우나 레지오넬라균이 존재하나 배양이 불가능한 경우에 real-time PCR을 이용하면 오히려 레지오넬라균의 검출이 가능해 이를 활용하면 검사의 정확도를 높일 수 있다.

따라서 환경 시료의 레지오넬라균 검사에 기존의

배양법을 표준분석법으로 하고 이에 대한 보완방법으로써 real-time PCR의 병행사용을 제안한다.

References

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin W, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 1977; 297: 1189-1197.
2. Kim JS, Lee SW, Shim HS, Oh DK, Cho MK, Oh HB, et al. An outbreak of Legionellosis in ICU of K hospital, Korea. *Korean J. Epidemiol.* 1985; 7: 44-58.
3. KCDC (Korea Centers for Disease Control & Prevention), Management guidelines of Legionellosis for 2019; 2019. p. 21-40.
4. KCDC Infectious Disease Portal, Legionellosis, Available: <http://www.cdc.go.kr/npt/biz/npp/portal/nppSumry Main.do>
5. Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Ponk K, Suraman-Lee S. *Legionella* and the prevention of Legionellosis, World Health Organisation: Geneva; 2007. p. 5-6.
6. Jeon SJ, Lee SD, Jung JH, Jin YH, Jeong HW, Kim YE, et al. Molecular epidemiology of *Legionella pneumonia* isolated from water supply system in Seoul, Korea, from 2012 to 2014. *Rep. Seoul Inst. Health & Environ.* 2014; 50: 287-300.
7. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28: 95-133.
8. Bang SJ, Lee CM, Kim YS, Sunwoo Y. Indoor and outdoor distribution of *Legionella* spp. and microbes on cooling tower water of central air conditioning facilities. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 2002; 28(3): 39-48.
9. Moon KW, Kim YW. Prevalence of *Legionella* and relation ship with heterotrophic (HPC) bacteria in public spas. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 2004; 6(5): 197-201.
10. Boulanger CA, Edelstein PH. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 1805-1809.
11. Shih HY, Lin YE. Caution on interpretation of *Legionella* results obtained using real-time PCR for environmental water samples. *appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 6859.
12. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of

- legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 3985-3993.
13. Anonymous. Water quality-detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). ISO TS 12869:2012, 1st ed. Geneva: International Organisation for Standardisation; 2012.
 14. Anonymous. Water quality-detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). ISO TS 12869:2019, 2nd ed. Geneva: International Organisation for Standardisation; 2019.
 15. Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 119: 1158-1169.
 16. Collins S, Stevenson D, Walker J, Bennett A. Evaluation of *Legionella* real-time PCR against traditional culture for routine and public health testing of water samples. *J. appl. Microbiol.* 2017; 122: 1692-1703.
 17. Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 2801-2808.
 18. Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, et al. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 1452-1456.
 19. Jonas B, Priscilla D, Yasmine D, Bart C, Frans O. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *J. microbiol. meth.* 2007; 68: 137-144.
 20. Al-Matawah QA, Al-Zenki SF, Qasem JA, Al-Waalan TE, Ben-Heji AH. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* from water systems in Kuwait residential facilities. *J. Pathog.* 2012; 13: 83-89.
 21. Guillemet TA, Levesque B, Gauvin D, Brousseau N, Giroux JP, Cantin P. Assessment of real-time PCR for quantification of *Legionella* spp. in spa water. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 51: 639-644.
 22. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74: 4817-4824.
 23. Chen N-T, Chang C-W. Rapid quantification of viable *legionellae* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J. appl. Microbiol.* 2009; 1229: 1364-5072.
 24. Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 110: 1032-1044.

<저자정보>

이정희(보건연구원), 박명기(보건연구원),
 김윤성(보건연구원), 윤희정(보건연구원),
 이창희(보건연구원), 정아용(보건연구원),
 윤미혜(보건연구원)