

부산지역에서 분리한 레지오넬라균에 대한 PFGE를 이용한 molecular typing

박은희* · 김미희 · 김정아 · 한난숙 · 이주현 · 민상기 · 박연경 · 진성현 · 정구영 · 빈재훈

부산광역시 보건환경연구원

Received November 1, 2004 / Accepted November 29, 2004

Molecular Typing of *Legionella pneumophila* Isolated in Busan, Using PFGE. Eun-Hee Park*, Mi-Hee Kim, Jung-A Kim, Nan-Sook Han, Ju Hyeoun Lee, Sang Gi Min, Yon Koung Park, Seong Hyun Jin, Gu Young Jeong and Jae Hun Bin. *Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment, 1276-1, Kwangan 4-dong, Suyoung-gu, Busan 613-806, Korea* – In this study, we did the molecular typing of 39 environmental *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates collected from 2001-2003 in Busan using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE of SfiI fragments were divided into 10 pulsotypes (A~J), corresponding to <65% similarity and a subtype within each pulsotype was characterized by >84% similarity. The major cluster was pulsotype E (46.2%), which included 18 isolates and was divided into 4 subtypes (E1~E4). PFGE of NotI fragments were divided into 8 pulsotypes (a~h), corresponding to <60% similarity and a subtype within each pulsotype was characterized by 100% similarity. The major cluster was pulsotype f (38.5%), which included 15 isolates. The ATCC type strain *L. pneumophila* serogroup 1 was identified as a different molecular pulsotype compare to the Busan isolates. It is possible that *L. pneumophila* serogroup 1 isolated in Busan with specific DNA pattern is comparable with those isolation in other cities in Korea.

Key words – *Legionella pneumophila* serogroup 1, PFGE, Busan

Legionella 속은 냉각탑수, 증발형 콘덴서, 온수 탱크 등의 인공환경에서 증식하면서 바람과 샤워시 발생하는 aerosol에 포함되어져 호흡기 흡입으로 사람에게 감염을 일으키며[11], 지금까지 알려진 42종중에서 대부분의 레지오넬라균이 사람에게 병원성이 있는 것으로 보고되고 있다[14]. 레지오넬라증 발병의 90% 이상이 *Legionella pneumophila*에 의하며, 현재까지 밝혀진 15종류의 *L. pneumophila* 중에서도 혈청형 1이 레지오넬라증의 주원인으로 알려져 있다[16].

레지오넬라증의 발병은 전 연령층에서 발생 가능하지만 50세 이상의 성인에게서 주로 발생하며, 특히 면역억제제 치료자, 수술 환자, 알콜 중독자, 깃연가, 노약자 등은 감수성이 높고, 사람으로부터 사람으로의 감염은 일어나지 않으며 사람만이 유일한 자연 숙주로 알려져 있다[6]. 또한 하절기인 7월에서 9월까지 주로 발생하여 계절적 양상을 띠는데 이는 중앙냉방장치의 사용과 관련이 있으며[3,17], 우리나라의 성인 지역 사회 폐렴의 2.3%가 *Legionella* 원인 폐렴인 것으로 보고되고 있다[5]. 1985년 이후부터 최근까지 전국 주요 도시의 냉각탑수에서 *Legionella* 속의 평균 분리율이 60% 이상으로 보고되고 있어 국내에서도 레지오넬라증의 발생 우려가 높은 편이다[5,18]. 특히 냉각탑수 등에서 발생하는 감염성의 aerosol은 레지오넬라증을 유발시킬 수 있기 때문에[11] 집단발병의 근원 지라 할 수 있다.

레지오넬라증의 집단 발생시 환경 분리균과 실제 환자 분리균주 간의 clonal relatedness를 결정할 수 있는 역학적 방법이 요구된다[14]. 현재까지 단클론 항체, arbitrarily primed PCR, plasmid 분석, ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 등을 포함한 다양한 분자학적 기법들이 집단 발생시 레지오넬라 분리균주를 추적하는데 사용되고 있다[2,10,13]. 이 중에서도 제한효소를 사용한 PFGE 분석법이 *L. pneumophila* 균주 사이의 subtyping을 위한 역학적 표식(epidemiological marker)으로 가장 효과적인 방법으로 보고되고 있다[15]. 그러나 국내에서는 환경수계의 분리균주에 대한 연구는 보고되고 있으나, PFGE 방법을 이용한 환자와 환경분리주 사이의 역학적인 연관성을 알아보는 기초연구는 Lee 등[8,9]의 1985년부터 2001년까지 분리한 레지오넬라균에 대한 molecular typing 연구를 제외하고는 아직까지 미미한 실정이다. 따라서 레지오넬라증 환자 발생시 원인균이 어디에서 유래되었는지를 확인하여 질병관리에 이용하려면, 분리되는 레지오넬라균의 유전형에 대한 지속적이고 체계적인 분석이 필요하며, 이를 위해서는 분리균주에 대한 유전형 분석과 양상의 데이터베이스화에 대한 연구가 요구된다.

본 연구에서는 2001년부터 2003년까지 부산지역의 냉각탑수에서 분리된 레지오넬라균 중에서 *L. pneumophila* serogroup 1으로 동정된 39균주 및 표준균주 *L. pneumophila* ATCC 33152 (serogroup 1, Philadelphia)에 대한 PFGE를 실시하여 유전적인 양상을 지역별로 분류하여 지역적인 특성을 파악하고, D/B화 하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-757-7502, Fax : +82-51-757-2879

E-mail : peh731@bs21.net

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 2001년부터 2003년까지 부산지역의 냉각탑수에서 분리한 레지오넬라균 중에서 *L. pneumophila* serogroup 1으로 동정된 것으로 Table 1과 같으며, 표준균주는 *L. pneumophila* ATCC 33152 (serogroup 1)를 사용하였으며, 기타 경남 마산 및 진주 지역의 냉각탑수에서 분리된 *L. pneumophila* serogroup 1을 함께 사용하였다. Pulsed-field gel electrophoresis 실험은 Lee 등[8]의 방법으로 실시하였다.

균의 분리 및 동정

냉각탑수에서 레지오넬라균의 분리 및 동정은 Park[12] 등의 방법에 따랐다. 냉각탑수 1L를 채수하여 0.2 µm 멸균 여과지를 통과시킨 후 여과지를 절단하여 여액 20 ml에 부유하여 50°C에서 30분간 열처리하였다. 열처리한 검체 100 µl를 항생물질[polymyxin B sulfate 79,200 unit/l, vancomycin (5 g/l), cyclohexamide (80 g/l), glycine (3 g/l)]과 영양물질[L-cystein·HCl (0.4 g/l), ferric pyrophosphate (0.25 g/l)]이 첨가된 buffered charcoal yeast extract (BCYE, Difco) 한천배지에 접종하여 90% 습도를 유지한 35°C 배양기에서 10일간 배양하였다. 균의 동정은 4일 후부터 자라나온 회백색의 집락을 BCYE 한천배지와 혈액한천배지에 동시에 접종하여 BCYE 한천배지에서는 자라나 혈액한천배지에서는 자라지 못하는 균(L-cystein 요구주)을 대상으로 무포자의 그람 음성 간균을

Legionella 속으로 추정하여, 혈청학적으로 동정하였다. 혈청형의 확인은 *Legionella antisera* (Denka Seiken, Japan)를 사용하여 슬라이드 응집법으로 실시하여, *Legionella pneumophila* serogroup 1에 응집된 균을 PFGE 분석에 사용하였다.

Gel plug의 준비

레지오넬라균을 BCYE 한천배지에 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 TES buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) 3 ml에 균을 현탁하여 bioMerieux Vitek colorimeter 10%의 투명도로 균 농도를 조절하였다. 균 현탁액을 12,000 rpm에서 10분간 2회 세척한 후, 균 침전물을 TES buffer 300 µl로 재 부유한 후, 1.2% Seakem gold agarose (FMC Bio Products, USA) 300 µl를 첨가하여 plug를 만들어 4°C에서 5분간 굳혔다. Plug의 lysis는 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 1% Sarcosyl, 1 mg proteinase K, 1 mg lysozyme, 20 µg RNase A)를 1 ml씩 첨가하여 50°C에서 48시간 처리하였고, 상온에서 멸균증류수로 5분간 1회, TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 5분간 2회 세척한 후 TE buffer를 첨가하여 사용할 때까지 냉장 보관하였다.

Restriction enzyme 처리

세척이 끝난 plug를 1 mM 두께로 절단한 후 1.5 ml microcentritube에 옮겨 제한효소 *SfiI*과 *NotI* (NEB, England) 각각의 반응혼합액(10× restriction enzyme buffer 10 µl, 100×

Table 1. *L. pneumophila* ATCC 33152 and 39 isolates used in this study

Year	Isolates	Area of origin	Year	Isolates	Area of origin	
2001	BJ 0101	Busanjin-gu	2002	BJ 0221	Busanjin-gu	
	BJ 0102	Busanjin-gu		KJ 0223	Kumjung-gu	
	BJ 0103	Busanjin-gu		KJ 0224	Kumjung-gu	
	JG 0106	Jung-gu		SS 0227	Sasang-gu	
	BJ 0107	Busanjin-gu		YJ 0228	Yeonje-gu	
	KS 0109	Gangseo-gu		SS 0234	Sasang-gu	
	DL 0118	Dongnae-gu		JG 0237	Jung-gu	
	HW 0145	Haeundae-gu		YJ 0239	Yeonje-gu	
	DG 0152	Dong-gu		JJ 0240	Jinju	
	SG 0154	Seo-gu		MS 0241	Masan	
	YD 0156	Yeongdo-gu		HW 0260	Haeundae-gu	
	HW 0157	Haeundae-gu		HW 0261	Haeundae-gu	
	HW 0158	Haeundae-gu		2003	DL 0303	Dongnae-gu
	HW 0159	Haeundae-gu			DL 0304	Dongnae-gu
	DG 0160	Dong-gu			DL 0306	Dongnae-gu
	2002	JG 0203			Jung-gu	DL 0310
JG 0209		Jung-gu	JG 0322		Jung-gu	
BJ 0210		Busanjin-gu	HW 0325		Haeundae-gu	
JG 0211		Jung-gu	DG 0326	Dong-gu		
SH 0214		Saha-gu	Reference strain	<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152		

BSA 1 μ l, *Sfi*I 3 unit, *Not*I 3 unit, 멸균증류수로 최종 부피를 맞추어 100 μ l를 첨가하여 *Sfi*I은 50°C에서 25시간, *Not*I은 37°C 15시간 반응을 시켰다. 반응이 끝나면 바로 반응혼합액을 제거하고 TE buffer로 교체한 다음 PFGE를 실시하거나, 4°C에서 보관하였다.

Gel Running

제한효소 처리가 끝난 plug를 gel comb에 올려놓고 물기를 제거한 다음 틀에 넣어 고정한 후 1% Seakem gold agarose를 부어 굳혔다. agarose solution을 조금 남겨서 50°C 항온수조에 보관하였다가, gel이 굳으면 comb를 제거하고 이 때 생긴 빈 well에 남겨 두었던 agarose solution으로 채웠다. 이렇게 만들어진 gel은 CHEF Mapper PFGE (Bio-Rad, USA)를 사용하여 0.5×TBE buffer로 *Sfi*I일 경우 initial sec. 2.2 s, second sec. 35.1 s, 6 Volt/cm (200 V), 14°C, 25시간 실시하였으며, *Not*I일 경우 initial sec. 5.0 s, second sec. 100 s, 6 Volt/cm (200 V), 14°C, 25시간 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)에서 30분간 염색하고 증류수로 30분씩 2회 탈색하여 Image Visualizer (Vilber Lourmat, France)로 관찰하였다.

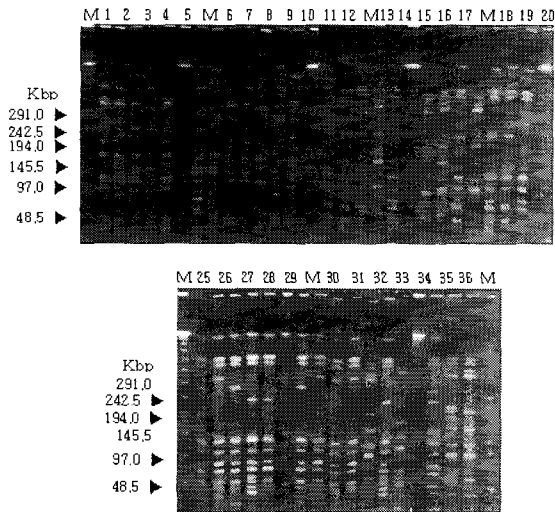


Fig. 1. PFGE analysis of *Sfi*I-digested DNAs for Busan isolates. M, λ DNA ladders size markers; lane 1, BJ 0101; lane 2, BJ 0102; lane 3, BJ 0103; lane 4, JG 0106; lane 5, BJ 0107; lane 6, KS 0109; lane 7, DL 0118; lane 8, JG 0203; lane 9, JG 0209; lane 10, BJ 0210; lane 11, SH 0214; lane 12, *L. pneumophila* ATCC 33152; lane 13, JJ 0240; lane 14, MS 0241; lane 15, JG 0211; lane 16, BJ 0221; lane 17, KJ 0223; lane 18, KJ 0224; lane 19, SS 0227; lane 20, YJ 0228; lane 21, SS 0234; lane 22, JG 0237; lane 23, YJ 0239; lane 24, HW 0260; lane 25, HW 0261; lane 26, HW 0145; lane 27, DG 0152; lane 28, SG 0154; lane 29, YD 0156; lane 30, HW 0157; lane 31, HW 0158; lane 32, HW 0159; lane 33, DG 0160; lane 34, DL 0303; lane 35, DL 0304; lane 36, DL 0306; lane 37, DL 0310; lane 38, JG 0322; lane 39, HW 0325; lane 40, DG 0326.

PFGE 결과 분석

PFGE 결과는 Molecular Analyst Fingerprinting Software (Bio-Rad, USA)의 dice coefficient를 기초로 dendrogram을 작성하여 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

PFGE 결과

2001년부터 2003년까지 부산지역의 냉각탑수에서 분리하여 레지오넬라균으로 동정된 95균 중에서 혈청학적으로 *L. pneumophila* serogroup 1로 확인된 39주와 표준균주 *L. pneumophila* ATCC 33152에 대하여 PFGE를 실시하였다. 제한효소 *Sfi*I 처리한 경우 DNA 가 9~12개의 절편으로 절단되었으며 (Fig. 1), 제한효소 *Not*I 처리한 경우 DNA 가 3~8개의 절편으로 절단되어(Fig. 2), Lee 등[9]이 국내에서 분리한 레지오넬라균 99개 균주에 대한 PFGE 패턴 분류와 유사한 결과를 보였으며, 레지오넬라균의 PFGE 패턴 분석에는 *Not*I 을 사용하는 것보다 *Sfi*I 을 사용하는 것이 세분화된 분류를 하기에는 더 변별력이 있을 것으로 사료되었다.

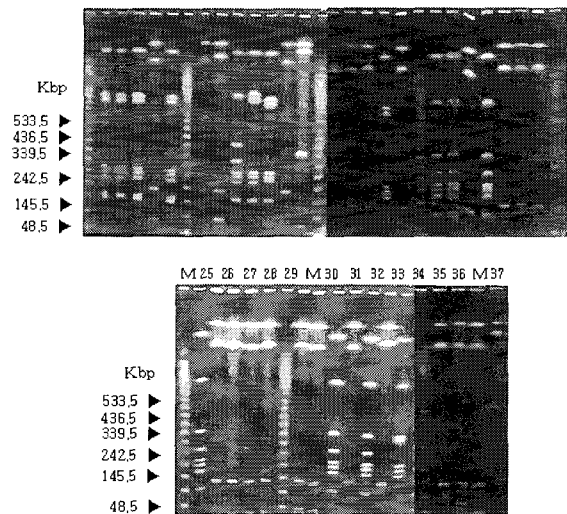


Fig. 2. PFGE analysis of *Not*I-digested DNAs for Busan isolates. M, λ DNA ladders size markers; lane 1, BJ 0101; lane 2, BJ 0102; lane 3, BJ 0103; lane 4, JG 0106; lane 5, BJ 0107; lane 6, KS 0109; lane 7, DL 0118; lane 8, JG 0203; lane 9, JG 0209; lane 10, BJ 0210; lane 11, SH 0214; lane 12, *L. pneumophila* ATCC 33152; lane 13, JJ 0240; lane 14, MS 0241; lane 15, JG 0211; lane 16, BJ 0221; lane 17, KJ 0223; lane 18, KJ 0224; lane 19, SS 0227; lane 20, YJ 0228; lane 21, SS 0234; lane 22, JG 0237; lane 23, YJ 0239; lane 24, HW 0260; lane 25, HW 0325; lane 26, HW 0145; lane 27, DG 0152; lane 28, SG 0154; lane 29, HW 0157; lane 30, HW 0158; lane 31, HW 0159; lane 32, DL 0303; lane 33, DL 0304; lane 34, DL 0306; lane 35, DL 0310; lane 36, JG 0322; lane 37, HW 0261; lane 38, YD 0156; lane 39, DG 0160; lane 40, DG 0326.

PFGE 패턴 분석

Fig. 3과 Fig. 4는 pulg를 *Sfi*I과 *Not*I으로 각각 처리한 후 실시한 PFGE 결과를 clustering 한 것이다. 제한효소 *Sfi*I 처리에 의한 PFGE 양상은 dice coefficient <65%의 유사성을 가진 band를 A~J로 10개의 pulsotype으로 나누었고, 다시 dice coefficient >84%의 유사성을 가진 band를 기준으로 A는 A1~A3, C는 C1~C3, E는 E1~E4, F는 F1~F3의 subtype으로 각각 분류하였다. 제한효소 *Not*I 처리에 의한 PFGE 양상은

dice coefficient <60%의 유사성을 가진 band를 a~h로 8개의 pulsotype으로 나누었고, 다시 dice coefficient 100%의 유사성을 가진 band를 기준으로 a는 a1~a4, d는 d1~d3, e는 e1~e4의 subtype으로 각각 분류하였다.

가장 많았던 유형은 *Sfi*I으로 처리한 경우는 E pulsotype으로 39주중 18주로 46.2%를 차지하였으며, 그 외 A pulsotype 17.9%, C pulsotype 15.4%, F pulsotype 7.7% 및 B, D, G, H, I, J pulsotype이 각각 2.6%로 유전적 양상이 다양하였다. *Not*I

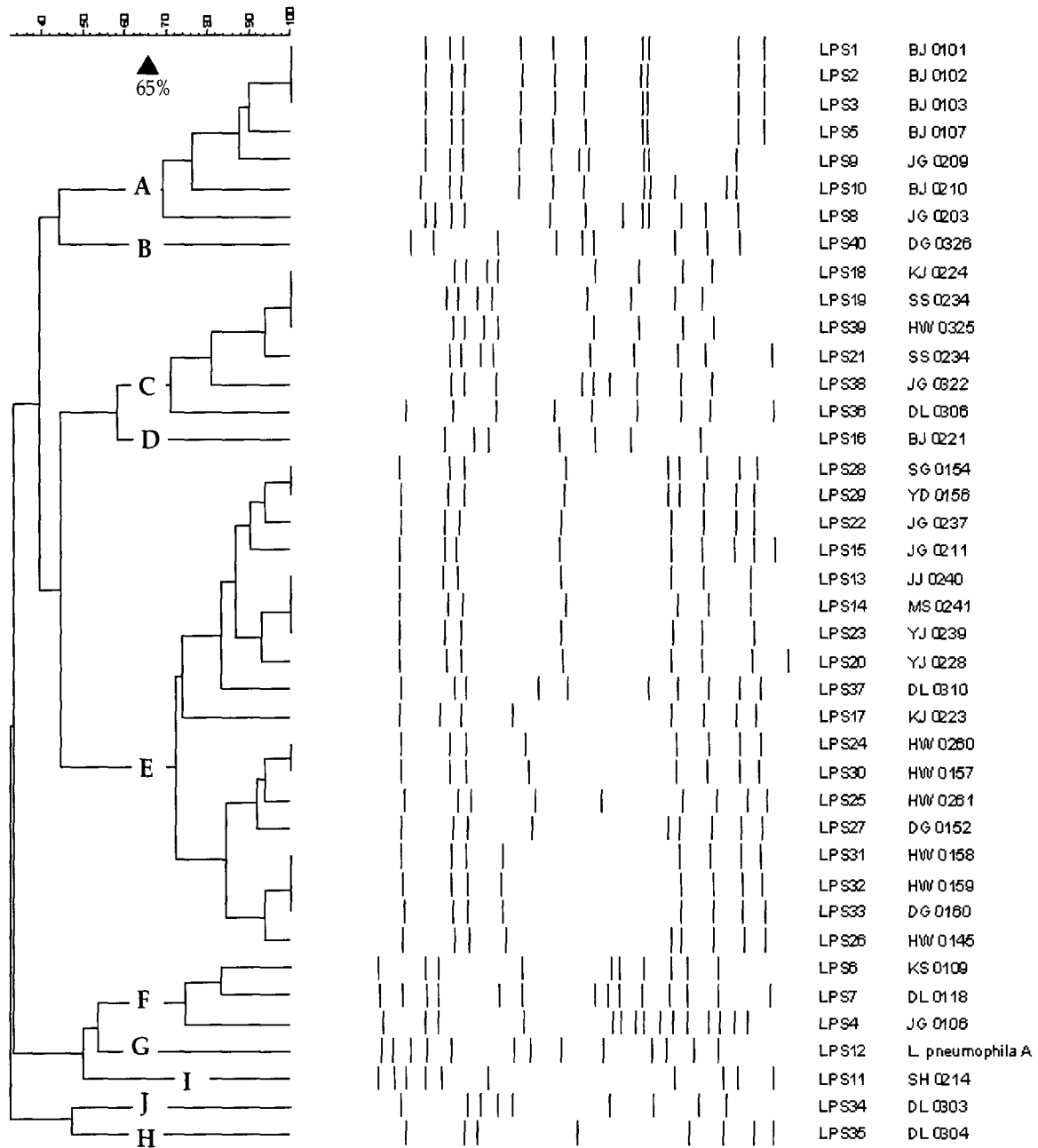


Fig. 3. Analysis of PFGE of 39 *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Busan. DNAs were cleaved with *Sfi*I. Dendrograms were constructed with Bio-Rad software analysis, Molecular Analyst.

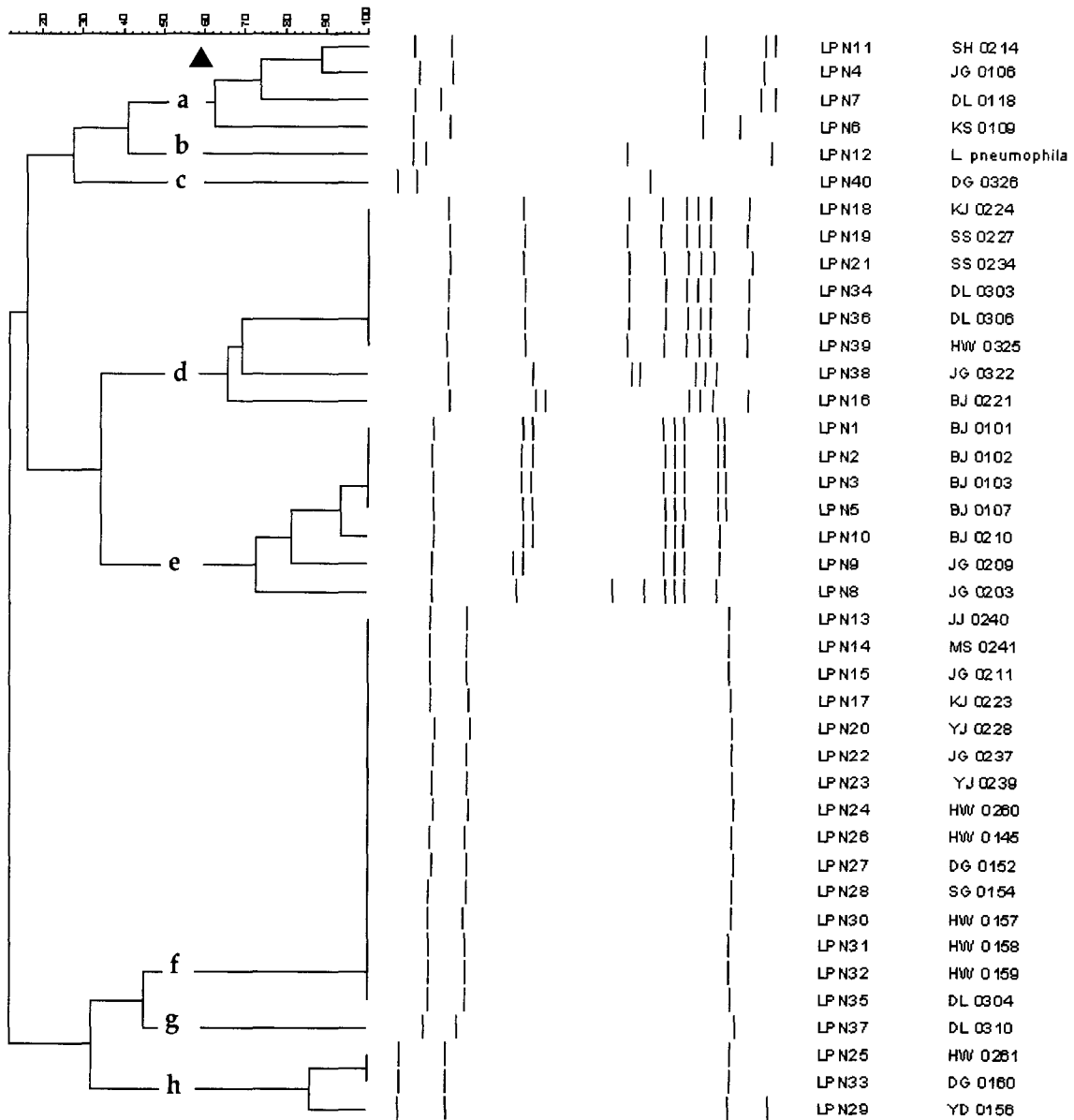


Fig. 4. Analysis of PFGE of 39 *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Busan. DNAs were cleaved with *NofI*. Dendrograms were constructed with Bio-Rad software analysis, Molecular Analyst.

으로 처리한 경우는 f pulsotype이 38.5%로 가장 많은 유형을 차지하였으며, 그 외 d pulsotype 20.5%, e pulsotype 17.9%, a pulsotype 10.3%, h pulsotype 7.7% 및 b, c, g pulsotype이 각각 2.6%를 차지하였다.

Lee 등[8]이 국내에서 분리한 레지오넬라균에 대하여 *NofI* 처리에 의한 PFGE 패턴 보고에서와는 다른 DNA 절편 양상을 보인 d와 e pulsotype이 분포하고 있어 부산지역에서만 분리되는 유전형이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, Lee 등[9]은 *SfiI*으로 처리하였을 경우 PFGE 패턴이 서울지역은 41개의 분리균주를 분석하여 6개, 전북지역은 19개의 분리균주를 분석하여 1개, 강원지역은 14개의 분리균주를 분석하여 6개, 부산

지역은 20개의 분리균주를 분석하여 9개의 PFGE 패턴을 보고하여 유전형 양상의 다양함을 보고하였다. 특히 이 보고에서 부산지역에 분포하고 있는 9개의 유형 중 8개의 유형이 다른 지역에서는 분포하고 있지 않은 유형으로 알려져, PFGE 패턴이 지역적으로 분포하는 유형이 다름을 보고하였다[9].

레지오넬라균이 분리된 지역별로 PFGE 패턴을 보면 E pulsotype은 부산의 12개 구청 및 경남 진주와 마산에서도 분포하고 있어 지역적으로 널리 분포하고 있는 유형임을 알 수 있었다(Table 2).

연도별 PFGE 패턴을 보면 2001년도에는 A, E, F의 3 pulsotype이, 2002년도에는 A, C, D, E, H의 5 pulsotype, 2003

Table 2. Geographical distribution of molecular type of 39 isolates and reference strain

Area of origin	Isolates and reference strain	PFGE	
		<i>Sfi</i> I	<i>Not</i> I
Jung-gu	JG 0106	F3	a2
	JG 0203	A3	e4
	JG 0209	A1	e3
	JG 0211, JG 0237	E1	f
	JG 0322	C2	d2
Seo-gu	SG 0154	E1	f
Dong-gu	DG 0152	E4	f
	DG 0160	E4	h
	DG 0326	B	c
Yeongdo-gu	YD 0156	E1	h
Busanjin-gu	BJ 0101, BJ 0102, BJ 0103, BJ 0107	A1	e1
	BJ 0210	A2	e2
	BJ 0221	D	d3
	DL 0118	F2	a3
Dongnae-gu	DL 0303	I	d1
	DL 0304	J	f
	DL 0306	C3	d1
	DL 0310	E2	g
	Haeundae-gu	HW 0145, HW 0157, HW 0158, HW 0159, HW 0260	E4
HW 0261		E4	h
HW 0325		C1	d1
Saha-gu		SH 0214	H
Kumjung-gu	KJ 0223	E3	f
	KJ 0224	C1	d1
Gangseo-gu	KS 0109	F1	a4
Yeonje-gu	YJ 0228, YJ 0239	E1	f
Sasang-gu	SS 0227, SS 0234	C1	d1
the others	JJ* 0240, MS** 0241	E1	f
Reference strain	<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	G	b

, Jinju city; **, Masan city

년 B, C, E, I, J의 5 pulstotype이 분포하였다(Table 3). E pulstotype은 매년 분리되었으며, 그 외 새로운 유전형이 매년 분리되고 있어 분리군주에 대한 지속적인 PFGE 패턴 분석이 요구되었다.

본 연구를 통하여 부산지역에서 분리되는 레지오넬라균에 대한 유전자 유형분석 결과를 데이터베이스화하여, 레지오넬라증의 집단 발생 또는 산발적인 질병 발생이 있을 경우 분자생물학적 측면에서 사람과 환경에서 분리된 균으로부터 감염원과 감염경로를 규명하는 역학적인 도구로써 이용 가능할 것으로 사료되었다. 또한 전국의 각 시·도에서 분리되는 레지오넬라균에 대한 PFGE 패턴 분석이 실시된다면 우리나라에 분포하고 있는 레지오넬라균의 지역별 유형분석도 가능할 것으로 사료되었다.

요 약

2001년부터 2003년까지 부산지역의 냉각탑수에서 분리한

L. pneumophila (serogroup 1) 39군주에 대해 제한효소 *Sfi*I 처리한 경우 PFGE 양상은 dice coefficient <65%의 유사성을 가진 band를 A~J로 10개의 pulstotype으로 나누었고, 가장 많았던 유형은 E pulstotype으로 39주중 18주로 46.2%를 나타내었으며, 그 외 A pulstotype 17.9%, C pulstotype 15.4%, F pulstotype 7.7% 및 B, D, G, H, I, J pulstotype이 각각 2.6%로 유전적 양상이 다양하였다. 제한효소 *Not*I 처리한 경우 PFGE 양상은 dice coefficient <60%의 유사성을 가진 band를 a~h로 8개의 pulstotype으로 나누었고, 가장 많았던 유형은 f pulstotype이 38.5%였으며 그 외 d pulstotype 20.5%, e pulstotype 17.9%, a pulstotype 10.3%, h pulstotype 7.7% 및 b, c, g pulstotype이 각각 2.6%를 차지하였다.

본 연구를 통하여 부산지역에서 분리되는 레지오넬라균에 대한 유전자 유형분석 결과를 데이터베이스화하여, 레지오넬라증의 집단 발생 또는 산발적인 질병 발생이 있을 경우 분자학적 측면에서 사람과 환경에서 분리된 균으로부터 감염원과 감염경로를 규명하는 역학적인 도구로써 이용 가능할 것으로 사료되었다.

Table 3. Distribution of PFGE types of *L. pneumophila* isolates in 2001-2003.

Year	<i>L. pneumophila</i> isolates	PFGE	
		<i>Sfi</i> I	<i>Nof</i> I
2001	BJ 0101, BJ 0102, BJ 0103, BJ 0107	A1	e1
	JG 0106	F3	a2
	KS 0109	F1	a4
	DL 0118	F2	a3
	HW 0145, DG 0152, HW 0157, HW 0158, HW 0159	E4	f
	SG 0154	E1	f
	YD 0156	E1	h
	DG 0160	E4	h
	2002	JG 0203	A3
JG 0209		A1	e3
BJ 0210		A2	e2
JG 0211, JG 0237, YJ 0228, YJ 0239, JJ 0240, MS 0241		E1	f
SH 0214		H	a1
BJ 0221		D	d3
KJ 0223		E3	f
KJ 0224, SS 0227, SS 0234		C1	d1
HW 0260		E4	f
HW 0261		E4	h
2003		DL 0303	I
	DL 0304	J	f
	DL 0306	C3	d1
	DL 0310	E2	g
	JG 0322	C2	d2
	HW 0325	C1	d1
	DG 0326	B	c

참 고 문 헌

- Benson, R. F., W. L. Thacker, M. I. Daneshvar, and D. J. Brenner. 1996. *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 631-634.
- Bingen, E. H., E. Denamur, and J. Elion. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 311-327.
- Communicable Diseases Monthly Report. 1998. vol. 9, no. 7, 77-81. *The Report of National Institute of Health, Korea.*
- Hookey, J. V., N. A. Saunders, N. K. Fry, R. J. Birtles, and T. G. Harrison. 1996. Phyogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolated in a Portuguese hospital. *J. Hosp. Infect.* **30**, 103-110.
- Kim M. J., H. J. Cheong, J. W. Sohn, H. S. Shim, D. W. Park, S. C. Park, J. H. Woo, J. M. Kang, Y. K. Kim, W. S. Shin, Y. R. Kim, H. J. Lee and J. H. Kim. 2001. A prospective Multicenter Study of Etiological Analysis in Adults with Community-Acquired Pneumonia: *Legionella*, *Leptospira*, Hantavirus and *Orientia tsutsugamushi*. *Korean J. of Infectious Disease.* **33**, 24-31.
- Kim J. S. Epidemiologic Characteristics of Legionellosis. 1984. *Korean J. of Infectious Disease.* **16**, 1-11.
- Kim K. B., W. J. Kim, M. J. Kim, S. C. Park, S. H. You, H. S. Shim, H. J. Han and S. G. Park. 1998. Surveillance Study of Cooling Tower of Large Buildings in Seoul City for *Legionella* species with Molecular Analysis. *Korean J. of Infectious Disease.* **30**, 207-217.
- Lee H. K., H. S. Yang, M. S. Park, S. K. Sim, C. K. Yoo and M. Y. Park. 2000. Molecular Typing of Korean Isolates of *Legionella* using Pulse-Filed Gel Electrophoresis (PFGE) and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR). *The Report of National Institute of Health, Korea.* **37**, 15-27.
- Lee H. K., H. S. Yang, S. R. Hong, M. S. Park, S. K. Sim, B. C. Lee and M. Y. Park. 2001. Molecular Typing of *Legionella pneumophila* Korean Isolates from 1985 to 2001. *The Report of National Institute of Health, Korea.* **38**, 18-30.
- Marrie, T. J., W. Johnson, S. Tyler, G. Bezanson, D. Haldane, S. Burbridge, and J. Joly. 1995. Potable water and nosocomial Legionnaires' disease-check water from all rooms in which patient has stayed. *Epidemiol. Infect.* **114**, 267-276.
- Negrón-Alvira, A. I. Pérez-Suárez, and T. C. Hazen. 1988. *Legionella* spp. in Puerto Rico cooling towers. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2331-2334.
- Park, E. H. and I. H. Cha. 1998. Isolation and distribution

- of *Legionella pneumophila* from cooling tower-waters in Pusan in 1998. *J. Life. Sci.* **8**, 79-82.
13. Prucker, J. M., L. A. Mermel, R. F. Benson, C. Giorgio, P. K. Cassidy, R. F. Breiman, C. G. Whitney, and B. S. Fields. 1995. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2872-2875.
 14. Riffard, S., F. Lo Presti, F. Vandensech, F. Forey, M. Reyrolle, and J. Etienne. 1998. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 161-167.
 15. Schoonmaker, D., T. Heimberger, and G. Birkhead. 1992. 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.* **30**, 1491-1498.
 16. Stout, J. E., and V. L. Yu. 1997. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* **337**, 682-687.
 17. Stout, J. E., and V. L. Yu, P. Muraca, J. Joly, N. Troup, and L. S. Tompkins. 1992. Potable water as a cause of sporadic cases of community acquired Legionnaires' disease. *N. Engl. J. Med.* **326**, 151-155.
 18. Sung W. K., Y. W. Lee, H. J. Oh, M. S. Lee, M. E. Park, H. B. Oh and K. S. Park. 1985. Study on the Bacteriological Characteristics of Environmental Isolates of *Legionella* spp. from Cooling Tower. *The Report of National Institute of Health, Korea.* **22**, 105-114.
 19. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239.