

## *Legionella Pneumophila* 검출을 위한 효소면역측정 스트립 센서

김영기<sup>†</sup> · 박소정

한경대학교 화학공학과, 화학기술연구소  
(2014년 7월 28일 접수, 2014년 8월 18일 심사, 2014년 8월 29일 채택)

### An Enzyme-linked Immunosorbent Assay Strip Sensor for the Detection of *Legionella Pneumophila*

Young-Kee Kim<sup>†</sup> and Sojung Park

Department of Chemical Engineering and Research Center for Chemical Technology, Hankyong National University, Gyeonggi 456-749, Korea

(Received July 28, 2014; Revised August 18, 2014; Accepted August 29, 2014)

#### 초 록

본 연구에서는 효소면역 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)과 면역크로마토그래픽 기법을 결합하여 *Legionella pneumophila* 검출을 위한 면역스트립을 제작하였다. 면역스트립은 4종의 멤브레인을 이용하여 제작하였다. 니트로셀룰로오스 멤브레인은 포획항체를 고정화하여 신호 발생을 일으키기 위해 사용되었고, 두 종류의 유리섬유 멤브레인은 각각 중합체 패드와 시료주입 패드로 사용되었다. 셀룰로오스 멤브레인은 모세관 현상으로 시료흐름을 유도하는 흡수 패드로 이용하였다. 샌드위치 면역반응과 효소반응에 의해 30 min 이내에 생성된 발색신호는 정성 및 정량 분석이 가능하였다. 분석조건 하에서 육안에 의한 정성 검출뿐 아니라,  $1.3 \times 10^3$  -  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL 범위의 *L. pneumophila* 농도를 디지털카메라와 자체 제작된 소프트웨어를 이용하여 정량적으로 분석할 수 있었다.

#### Abstract

In this study, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immuno-chromatographic technique were combined to fabricate immuno-strip sensors for the detection of *Legionella pneumophila*. The immuno-strip sensor was manufactured with four different membranes. A nitrocellulose membrane was used to immobilize capture antibody and generate signals due to the high affinity to antibodies, and glass fiber membranes were used as a conjugate release pad and a sample application pad. A cellulose membrane was used as an absorption pad to induce sample flow by the capillarity. Colorimetric signals produced by sandwich immuno-reaction and enzyme reaction could be analyzed qualitatively and quantitatively within 30 min. Under the given experimental conditions, sensor signals with *L. pneumophila* samples were observed qualitatively by naked eyes and measured quantitatively in a range of  $1.3 \times 10^3$  -  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL with a digital camera and home-made image analysis software.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, Immuno-strip sensor, Enzyme-linked immunosorbent assay, Immuno-chromatographic assay

## 1. 서 론

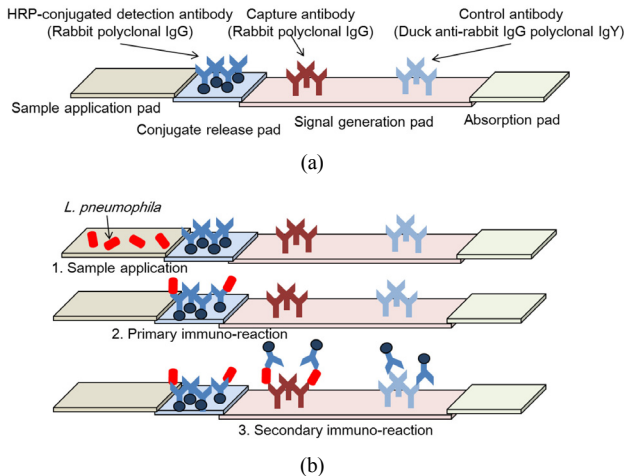
레지오넬라증은 레지오넬라균이 호흡기 세포를 감염시켜 폐렴이나 폰티악증 등의 증상을 일으키는 질병으로, 1976년 미국 필라델피아에서 집단 발생한 폐렴의 원인으로 확인된 후 세계적으로 발생 사례가 보고되고 있다. 일본에서도 여러 번 집단 발생사례가 보고되었으며, 특히 2002년에는 300명 이상이 온천에서 *L. pneumophila*에 감염되어 8명이 사망한 사례가 보고되어 있다[1]. 우리나라에서도 1984년 종합병원에서 집단 발생한 사례가 있었으며, 이후 집단 발생 사례는 보고된 바 없으나 50세 이상의 고령자 중심으로 연간 20-30건의 산발적

발병 사례가 있는 것으로 알려져 있다[2].

레지오넬라속균은 수계에 주로 서식하는 그람 음성 막대균으로 아메바 세포에 기생하거나 생물막 내에서 번식하며, 자연환경의 수계 또는 인공시설에 사용되는 용수가 에어로졸을 형성할 때 에어로졸 내에 포함되어 사람의 호흡기를 통해 감염되는 것으로 알려져 있다[3]. 레지오넬라균은 상온 이상의 온도를 가지며 재순환되는 시설 용수에서 활발히 증식할 수 있는데, 특히 대형건물 및 병원의 냉각탑 용수, 목욕탕수, 분수 등에서 발견 빈도가 높다[1,3].

우리나라에서 수중 레지오넬라균의 관리기준은 질병관리본부의 레지오넬라증 관리지침[4]과 환경부의 물놀이형 수경시설의 수질관리지침[5]이 있다. 레지오넬라증 관리지침에서는  $10^3$  CFU/L 미만의 농도를 처리없이 사용 가능한 수질로 평가하며,  $10^6$  CFU/L 이상의 경우에는 즉각적인 청소와 소독을 요구하고 있다. 물놀이형 수경시설 관리지침에서는 질병관리본부의 지침을 준용하되, 200 CFU/100 mL 이상의 대장균이 검출된 물놀이 시설에 대해서만 레지오넬라균 검사를 요구하고 있다. 최근에는 냉각탑, 목욕탕, 분수 등의 인공 수계 시설에

<sup>†</sup> Corresponding Author: Hankyong National University,  
Department of Chemical Engineering and Research Center for Chemical  
Technology, Anseong, Gyeonggi 456-749, Korea  
Tel: +82-31-670-5206 e-mail: kim@hknu.ac.kr



**Figure 1. Detection principle of immuno-strip. (a) Configuration of fabricated immuno-chromatographic strip and (b) Scheme of immuno-reaction procedure on immuno-strip sensor.**

서 *L. pneumophila* 발생뿐 아니라 급증하고 있는 바닥분수시설에서의 발견 사례가 증가하고 있어 *L. pneumophila*에 대한 분석 필요성이 급격히 증가되고 있다.

*L. pneumophila* 검출을 위해 일반적으로 이용되는 방법은 선택배지 배양 및 콜로니 계수, 형태학적 동정법, 생화학적 분리방법 등이 있다[6,7]. 선택배지배양 및 콜로니 계수법은 미생물 검정의 기본적인 방법으로, 높은 선택성과 특이성 때문에 오랜 기간 사용되어 왔으나, 결과를 얻기까지 2-7일 정도의 시간이 소요되고 전문 기술을 지닌 인력이 필요한 단점이 있다. 형태학적 동정법과 생화학적 분리법도 고가의 장비와 전문인력이 요구되는 단점이 있다[7,8]. 근래에 신속하고 정확한 검출을 위하여 핵산 또는 항체를 기반으로 한 분석방법에 대한 연구가 많이 수행되었다[9]. 그중에서 DNA probe 방법은 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 적은 양의 유전자를 증폭한 후 특정 핵산 서열을 인식할 수 있는 probe와 결합반응으로 확인하는 것으로[10], 분석 시간 단축, 높은 특이성, 적은 시료량 사용 등 장점을 가진다. 하지만, 죽은 세포의 DNA 증폭, 다단계 연속적 조작, 전문 인력이 필요한 단점이 있다[11]. 대안으로 표지 분자와 항체 간 특이적 면역반응에 기초한 면역분석법이 개발되어 있으며, 효소면역측정(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 키트가 나와 있으나, 반응 및 세척 등 다단계의 조작과 전문적 지식이 필요한 불편함이 있다.

이러한 단점들을 보완하기 위하여 면역 크로마토그래픽 분석법(Immuno-chromatographic assay)이 최근 개발되었으며, 이 중 효소표지에 의한 신호증폭방법은 신속하고 정확한 분석을 가능하게 하였다. 이 방법은 소량의 시료 요구, 저비용, 육안으로 검출결과를 확인할 수 있는 등 많은 장점을 가지고 있다[12,13].

본 연구에서는 효소면역측정법과 면역크로마토그래픽 분석법을 결합하여 간편하고 신속하게 *L. pneumophila*를 분석할 수 효소면역측정 스트립 센서를 제작하고 이를 이용하여 시료 중 *L. pneumophila* 분석을 수행하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

실험에 사용된 *L. pneumophila* (KCCM 41777)는 한국미생물보존센

터(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 배양을 위한 증균배지는 CYE agar base (CM0655, Oxoid, Hampshire, UK)를 사용하였으며, 콜로니 계수를 위한 선택배지는 증균배지에 agar powder (A0084, Daejung Co., Korea)를 1.5%로 혼합하여 사용하였다. 포획(capture) 항체로 *L. pneumophila*에 반응성을 가지는 다클론항체(ab20943), 탐지(detection) 항체로 *L. pneumophila*에 반응 특이성을 가지는 horseradish peroxidase (HRP)와 결합된 다클론항체(ab20561), control 신호 발생을 위해 rabbit IgG에 반응성을 가지는 다클론항체(ab31193)는 Abcam plc. Ltd. (Cambridge, UK)에서 구입하여 사용하였다.

스트립 제작을 위한 멤브레인은 니트로셀룰로오스 멤브레인(10 μm pore size, CNPE-SN12), 셀룰로오스 멤브레인(AP045), 두 종류의 유리섬유 멤브레인(PT-R5와 GFB-R4)을 Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (Ambala, India)에서 구입하여 사용하였다. 5% casein 용액(C4765), ascorbic acid (A2343), trehalose 용액(T5251), 혈청알부민(BSA, B4782)과 Tween 20 (P1379) 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HRP 반응을 위한 발색기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 용액은 BioFX laboratories (Owings Mills, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 효소면역반응 크로마토그래픽 스트립 제작

신호발생패드는 1차 면역복합체와 포획항체와의 면역반응과 효소 반응으로 발색신호를 생성하는 영역으로 니트로셀룰로오스 멤브레인(0.4 cm × 2.5 cm)을 사용하였다. 1 mg/mL의 포획항체용액은 신호발생패드 아래에서부터 1 cm에 위치한 곳에 1 μL를 분주하였다. 면역센서 스트립의 작동여부를 확인하기 위한 control 신호 발생을 위하여 탐지항체에 특이적 반응성을 가지는 0.1 mg/mL 농도의 다클론항체를 멤브레인 아래에서 1.7 cm에 위치한 곳에 1 μL 분주한 후, 37 °C 배양기에서 1 h 동안 배양하여 고정화시켰다.

유리섬유 멤브레인(0.4 cm × 0.5 cm)으로 이루어진 중합체 패드에는 HRP가 중합된 탐지항체를 분주하여 잔류하게 함으로써 시료 내의 *L. pneumophila*와 1차 면역복합체를 형성하게 하였다. 탐지항체용액은 1 mg/mL 농도의 탐지항체 0.1 μL, 40% trehalose 용액 2.5 μL, 40 mM ascorbic acid 용액 1 μL와 5% casein 용액 4 μL를 혼합하여 제조하였다. 준비된 탐지항체용액은 유리섬유 멤브레인에 흡수시킨 후 55 °C에서 30 min간 건조하여 준비하였다.

스트립 센서는 범용 OHP 필름(0.4 cm × 5.7 cm)을 기반으로 사용하여, 다음의 순서로 제작하였다. 신호발생 패드는 필름 하단에서 1.4 cm 위에 위치하도록 가정 먼저 고정하였다. 중합체 패드는 신호발생 패드 아래 쪽으로 0.1~0.2 cm 겹쳐 부착하고, 모세관 현상에 의한 시료 흐름을 유도하는 역할을 하는 흡수 패드인 셀룰로오스 멤브레인(0.4 cm × 1.5 cm)은 신호발생 패드와 0.1~0.2 cm 겹쳐서 필름의 가장 상단에 위치시켰다. 유리섬유 멤브레인을 사용한 시료주입 패드(0.4 cm × 1.5 cm)는 중합체 패드와 0.1~0.2 cm 겹치도록 필름 가장 하단에 고정하였다. Figure 1(a)에 완성된 스트립의 개략적 구성도를 나타내었다.

### 2.3. 스트립을 이용한 *L. pneumophila* 분석

*L. pneumophila*를 포함한 시료용액 100 μL가 담긴 시험관에 시료 주입패드가 잠기도록 스트립을 거치한다. 스트립을 따라 시료 주입패드에서 흡수 패드 방향으로 흐르는 시료에 존재하는 *L. pneumophila*는 항원-항체 반응에 의해 중합체 패드의 탐지항체와 1차 면역복합체를 형성한다. 그 후 신호발생 패드에서 1차 면역복합체와 포획항체간 2차 면역복합체를 형성하며, 반응하지 않은 탐지항체는 control 항체

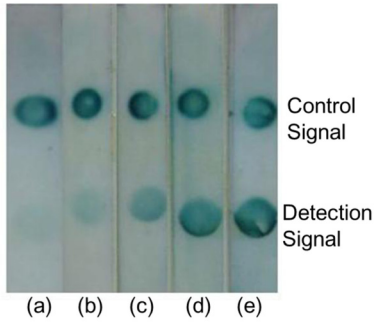


Figure 2. Images of colorimetric signal with concentration of *L. pneumophila*. (a) Control sample (without *L. pneumophila*), (b)  $1.3 \times 10^3$  CFU/mL, (c)  $1.3 \times 10^4$  CFU/mL, (d)  $1.3 \times 10^5$  CFU/mL, and (e)  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL.

와 결합한다. 위에서 기술한 면역반응의 순서는 Figure 1(b)에 도식적으로 설명하였다. 15 min간 면역반응을 위한 시료흐름이 완료된 후, 효소기질 주입 패드인 유리섬유 멤브레인(GFB-R4, 1.2 cm × 1.5 cm)과 효소기질 흡수패드인 셀룰로오스 멤브레인(1.2 cm × 1.5 cm)을 각각 신호발생 패드의 반대방향 측면에 0.1 cm씩 겹쳐 고정시켰다. 효소반응의 기질용액인 TMB 용액을 효소기질주입 패드에 분주한 후 흡수패드로의 흐름에 의한 효소반응을 충분히 일으키도록 5-10 min간 방치한다. 효소 반응에 의해 생성된 발색 신호는 육안에 의한 정성적 관찰이 가능하나, 정량적 분석을 위해 디지털 카메라(S750, Olympus, Japan)를 이용하여 이미지를 얻었다(해상도 1920 × 2560 pixels, 노출 시간 1/8 s, ISO 감도 200). 이미지는 자체 제작된 이미지분석 소프트웨어를 이용하여 발색 신호에 맞춰 픽셀크기를 조절하고 선택된 픽셀들의 발색신호를 RGB 삼원색으로 분리하여 각각의 원색 세기의 평균값으로 발색신호 세기를 수치화하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 면역 스트립 발색신호의 정성적 분석

시료 중 *L. pneumophila* 농도에 따라 얻어진 발색 세기변화를 Figure 2와 같이 얻을 수 있었다. 이미지 하단의 탐지 신호는 시료 안에 존재하는 *L. pneumophila*와 HRP 중합 탐지항체간 면역반응에 의한 1차 면역복합체가 포획항체와 샌드위치 면역반응에 의하여 2차 면역복합체를 형성하여 발색 효소반응에 의해 생성된 것이고, 상단의 control 신호는 *L. pneumophila*와 반응하지 못한 HRP 중합 탐지항체가 control 항체와 결합한 위치에서 발색 효소반응에 의해 생성된 것으로 면역효소반응 스트립의 정상 작동 여부를 확인시켜준다. 사용된 *L. pneumophila* 시료의 농도 범위는  $1.3 \times 10^3 - 1.3 \times 10^6$  CFU/mL였으며, 농도가 증가함에 비례하여 더 짙은 발색신호를 발생하는 것을 정성적으로 확인할 수 있었다.

#### 3.2. 면역 스트립 발색신호의 정량적 분석

개발된 면역효소반응 스트립 센서의 정량적 분석 성능을 평가하기 위하여, 디지털카메라로 얻어진 발색신호 이미지는 자체 제작된 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 해석하였다. 발색 부위에서 선택된 픽셀들의 색도는 RGB 삼원색으로 분리하여, 각 원색의 세기를 수치화하였다. 각 원색의 세기는 0~255 사이의 값으로 상대적인 세기를 표현하였으며, 수치는 색의 짙음에 반비례하여 색이 짙을수록 상대적

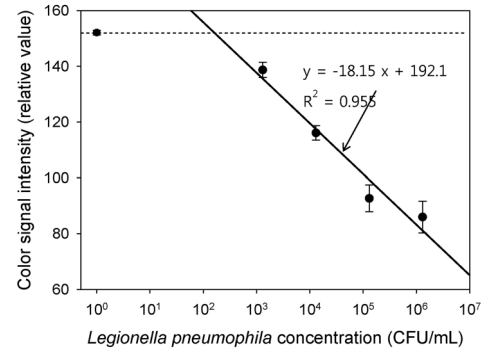


Figure 3. Calibration curve of colorimetric signal with *L. pneumophila* concentration. Solid line is first-order calibration curve and dashed line is signal intensity obtained from control sample without *L. pneumophila*.

수치는 작은 값을 나타낸다. 다양한 *L. pneumophila* 농도범위에서 얻어진 발색 신호는 삼원색의 수치화된 세기를 평균하여 전체 발색 세기 값을 그래프로 표현하였으며, 그 결과는 Figure 3과 같다. 사용된 *L. pneumophila* 시료 농도 범위인  $1.3 \times 10^3 - 1.3 \times 10^6$  CFU/mL에서 얻어진 발색 신호의 정량적 데이터는 *L. pneumophila*를 포함하지 않는 대조군의 발색신호와 뚜렷이 구분되었으며, 균주 농도와 발색 신호 데이터간 선형적 검량선을 얻을 수 있었다. 계산된 선형 검량선의 기울기와 절편값은 Figure 3에 표기하였고, 검량선과 데이터 간의 상관계수(correlation coefficient)는 0.955로 매우 높게 확인되었다. 따라서, 개발된 효소면역반응 스트립 센서는 *L. pneumophila*를 육안에 의한 정성적 분석뿐만 아니라, 이미지 분석방법에 의한 정량적 분석에도 유용함을 확인할 수 있었다.

#### 3.3. 면역 스트립의 교차 반응성 검증

오염된 수체는 *L. pneumophila*뿐만 아니라 다양한 병원성 미생물에 의한 오염 가능성이 있기 때문에, *L. pneumophila* 검출용 면역스트립의 타 병원성균과의 반응 특이성이 없음을 검증하는 교차반응성 검증은 매우 중요하다. 교차반응성을 관찰하기 위해 측정대상 외 병원성 세균으로 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*를 이용하여 교차반응성 검증을 수행하였다[14]. 제작된 면역스트립에 다른 종류의 병원성 세균이 존재하는 시료 용액을 흘려주어 반응시킨 후, 발색신호의 발생여부를 관찰하였으며(데이터 수록하지 않음), 교차 반응성 실험을 위해 사용된 세 종류의 병원성 미생물은 *L. pneumophila*와 특이적 반응성을 가지는 포획항체, 탐지항체와 반응하지 않고 제작된 면역스트립에 대한 positive false 신호 발생이 일어나지 않는 것을 확인하였다[14].

### 4. 결 론

본 연구에서는 효소면역 측정법(ELISA)과 면역크로마토그래픽 분석법을 결합하여 *L. pneumophila* 측정용 면역스트립 센서를 제작하였다. 개발된 면역스트립 센서는 *L. pneumophila*의 정성적 검출 및 정량적 측정에 성공적으로 적용되었으며, HRP에 의한 발색효소반응으로 센서의 민감도가 향상되어, *L. pneumophila*의 농도  $1.3 \times 10^3 - 1.3 \times 10^6$  CFU/mL 범위에서 사용 유효성을 보였으며, 30 min 이내에 전 분석과정의 수행이 가능하였다. 우리나라의 수중 레지오넬라균 관리기

준인 질병관리본부의 레지오넬라증 관리지침[4]에서는  $10^3$  CFU/L 미만의 농도를 안전한 수질로,  $10^6$  CFU/L 이상의 경우를 예는 즉시 대응이 필요한 수준으로 결정하였다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 효소면역반응 크로마토그래픽 스트립을 레지오넬라균 관리에 사용하기 위해서는 1000배의 농축이 요구되며, 이를 위한 전처리 설비가 필요하다. 개발된 면역스트립 센서는 간단하고, 사용하기 쉬우며, 제작비용이 저렴하고, 신호의 정성 및 정량 분석이 가능하다는 장점을 가지므로, 농축 전처리 장치와 같이 결합하여 수질 관리에 적용될 수 있을 것이다.

## References

1. S. J. Jeon, J. H. Jung, H. J. Seung, C. K. Kim, Y. H. Jin, Y. H. Oh, S. M. Choi, and Y. Z. Chae, Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* isolated from water supply systems in Seoul, Korea. *J. Environ. Health. Sci.*, **39**, 166-177 (2013).
2. Y.-G. Zo, Meta-analysis of risk factors for contamination of environmental waters by *Legionella*, *Kor. J. Microbiol.*, **49**, 424-428 (2013).
3. B. M. W. Diederer, *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J. Infect.*, **56**, 1-12 (2008).
4. Center for Disease Control and Prevention Korea, *Guideline for management of Legionnaires' disease*, Osong, Korea (2012).
5. Ministry of Environment Korea, *Guideline for management of water quality in interactive waterscape facilities*, Korea (2010).
6. E. C. Alocilja and S. M. Radke, Market analysis of biosensors for food safety, *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 841-846 (2003).
7. O. Lazcka, F. Javier Del Campo, and F. Xavier Munoz, Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1205-1217 (2007).
8. A. D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, and S. Jiang, Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 752-758 (2006).
9. L. Yang and R. Bashir, Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, *Biotechnol. Adv.*, **26**, 135-150 (2008).
10. S. Kim, W.-S. Jeong, and S.-H. Paeg, Development of DNA chromatographic system for on-site detection of food-contaminating bacteria, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 190-196 (2003).
11. S. Ko and S. A. Grant, A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1283-1290 (2006).
12. C. Fernandez-Sanchez, C. J. Mcneil, K. Rawson, O. Nilsson, H. Y. Leung, and V. Gnanapragasam, One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum, *J. Immunol. Methods*, **307**, 1-12 (2005).
13. K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue, A competitive immunochromatographic assay for testosterone based on electrochemical detection, *Talanta*, **73**, 886-892 (2007).
14. J. Park, S. Park, and Y.-K. Kim, Multiplex detection of pathogens using an immunochromatographic assay strip, *BioChip J.*, **4**, 305-312 (2010).