대한임상미생물학회지 : 제7권 제1호 2004
Korean J Clin Microbiol 2004 ; 7(1) : 38-42

분자역학적 방법을 이용한 부산시내 대형건물 냉각탑수의 레지오넬라균의 형별 분류

김정만[1], 정석훈[2], 서대영[3], 박은희[4], 송은주[5], 최재철[6], 이은엽[6], 장철훈[6]

동아대학교 의과대학 진단검사의학교실[1], 고신대학교 의과대학 진단검사의학교실[2],
동의의료원 진단검사의학과[3], 부산광역시 보건환경연구원 미생물과[4],
부산대학교 자연과학대학 미생물학과[5], 부산대학교 의과대학 진단검사의학교실[6]

Molecular Strain Typing of *Legionella* Isolates from Water in Cooling Towers of Big Buildings in Busan, Korea

Jeong Man Kim[1], Seok Hoon Jeong[2], Daeyoung Seo[3], Eun Hee Park[4], Eun Ju Song[5], Jae-Cheol Choi[6], Eun Yup Lee[6], and Chulhun L. Chang[6]

Department of Laboratory Medicine[1], Dong-A University College of Medicine; Department of Laboratory Medicine[2], Kosin University College of Medicine; Department of Laboratory Medicine[3], Dong-Eui Medical Center; Microbiology Division[4], Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment; Department of Microbiology[5], Pusan National University College of Natural Sciences; and Department of Laboratory Medicine[6], Pusan National University College of Medicine

Background : It is important to define a source of infection when outbreak of *Legionella* infections has occurred. The performance of a molecular strain typing method was evaluated for environmental and clinical isolates of *Legionella pneumophila*.

Methods : Thirteen environmental strains, eleven clinical isolates and one type strain (ATCC 33152) of *Legionella pneumophila* were used for the analysis of pulsed field gel electrophoresis.

Results : All 25 strains were discriminated into 21 types. Two strains isolated from different locations in a same building showed different types. Each two, four, and two strains were shown as the same PFGE patterns.

Conclusions : Even though PFGE typing of *Legionella pneumophila* is excellent for strain differentiation, the same pattern does not necessarily indicate the same source of isolates.

(Korean J Clin Microbiol 2004;7(1):38-42)

Key words : *Legionella*, Pulsed field gel electrophoresis

서 론

레지오넬라 폐렴은 지역사회 획득 폐렴의 2-16%를 차지하지만[1,2], 그람 염색 혹은 혈액한천배지를 이용한 배양에서 원인균이 검출되지 않기 때문에 진단이 어렵다. 우리나라에서도 지역사회 획득 폐렴의 0-2.3%가 이 세균에 의한 것으로 알려졌으나[3, 4], 배양에 의해 병원균이 증명된 경우는 단 한 예에 불과하다[5]. 진단미생물검사실에서 레지오넬라의 선택배지인 buffered charcoal yeast extract (BCYE) 한천을 항상 준비하고 있기 어렵기 때문에 이 세균에 의한 감염이 의심되는 환자가 왔을 때에도 원인균의 배양은 잘 이루어지지 않고 있고, 또한 미생물 검사실의 종사자들이 레지오넬라의 집락 모양, 배

접수번호 : CM7-1-4
이 논문은 2002학년도 동아대학교 학술연구비 (공모과제) 지원에 의하여 이루어졌음
교신저자 : 장철훈
(602-739)부산광역시 서구 아미동 1가 10.
부산대학교 의과대학 진단검사의학교실
TEL : 051) 240 - 7417 FAX : 051) 247 - 6560
E-mail : cchl@pusan.ac.kr

양 조건, 그외 여러가지 미생물학적 특징들을 익힐 기회가 적다.

한편, 레지오넬라 감염증이 집단 발생하였을 때는 임상적, 역학적인 특성 때문에 지역사회 획득 폐렴보다는 진단하기가 쉽다. 하지만 이 경우는 환경수 배양 등을 통한 감염원의 규명이 중요하며, 이를 위하여 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)를 비롯한 다양한 분자역학적 분석 방법들이 사용되고 있다. PFGE는 연구자에 따라서 레지오넬라의 균주간 감별하는데 분별력이 가장 우수하다는 주장과 함께 역학적으로 전혀 무관한 균주 사이에서도 동일한 절단 양상을 보이기 때문에 감염원을 추정하고자 할 때 주의깊은 해석을 요한다는 보고도 있다 [6-11].

본 연구의 목적은 환경이나 환자의 검체에서 이미 분리된 레지오넬라 균을 대상으로 하여 균주의 형별 분류에 자주 이용되는 PFGE 방법으로 형별 분류를 시도해 봄으로써, 부산과 경상남도의 여러 지역에서 검출된 균들의 형별이 잘 구분되는지를 확인해 보고, 향후 집단 감염의 발생 등으로 역학적 조사가 필요할 때 본 방법을 사용할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 균주

2001년 6-7월에 부산과 경상남도에 소재한 호텔 등 대형 건물의 냉각탑에서 분리된 *Legionella pneumophila* 13균주(B1-13), 1994년부터 2002년에 일본의 레지오넬라증 환자의 객담 또는 폐 조직에서 분리된 *L. pneumophila* 11균주(J1-11) 및 표준균주(*L. pneumophila* ATCC 33152)를 대상으로 하였다(Table 1). 국내 분리 균주 중 B5와 B6은 같은 건물의 다른 장소에서 분리된 것이며, 나머지 균주들은 분리된 건물이 서로 다르고, 일본의 환자 유래 균주들은 분리된 시기 혹은 지역이 달라서 역학적으로 관련이 없는 것으로 생각되는 균주들이었다.

2. 균의 분리 및 동정

대형 빌딩의 환경수로부터 균을 분리하고 동정한 과정은 다음과 같다. 균의 분리는 냉각탑수 1 L를 채수하여 여과지(0.2 μm)를 통과시킨 후 여과지를 절단하여 여액 20

Table 1. Strains used in this study

Strain No.	Date of isolation	Sources	Species
ATCC33152			*L. pneumophila* serogroup 1
B1	Jun-01	Busanjin D	*L. pneumophila* serogroup 1
B2	Jun-01	Haeundae D	*L. pneumophila* serogroup 1
B3	Jun-01	Gijang	*L. pneumophila* serogroup 1
B4	Jun-01	Gumjeong	*L. pneumophila* serogroup 7-14*
B5	Jun-01	Gimhae A	*L. pneumophila* serogroup 5
B6	Jun-01	Gimhae A	*L. pneumophila* serogroup 7-14*
B7	Jun-01	Tongyoung	*L. pneumophila* serogroup 5
B8	Jun-01	Dong	*L. pneumophila* serogroup 1
B9	Jun-01	Busanjin C	*L. pneumophila* serogroup 5
B10	Jul-01	Buk A	*L. pneumophila* serogroup 7-14*
B11	Jun-01	Haeundae B	*L. pneumophila* serogroup 5
B12	Jun-01	Haeundae A	*L. pneumophila* serogroup 1
B13	Jun-01	Busanjin B	*L. pneumophila* serogroup 6
J1	Sep-94	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J2	Dec-96	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J3	Apr-97	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J4	Feb-96	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J5	Oct-98	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J6	Jun-99	Patient's bronchoalveolar larvage	*L. pneumophila* serogroup 1
J7	Jul-99	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J8	Sep-99	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 1
J9	Aug-00	Patient's lung tissue	*L. pneumophila* serogroup 9
J10	Feb-02	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 3
J11	Jul-02	Patient's sputum	*L. pneumophila* serogroup 5

* These strains were reactive with a polyvalent antiserum (serogroup 2-14) and nonreactive with each antiserum of serogroup 1 to 6.

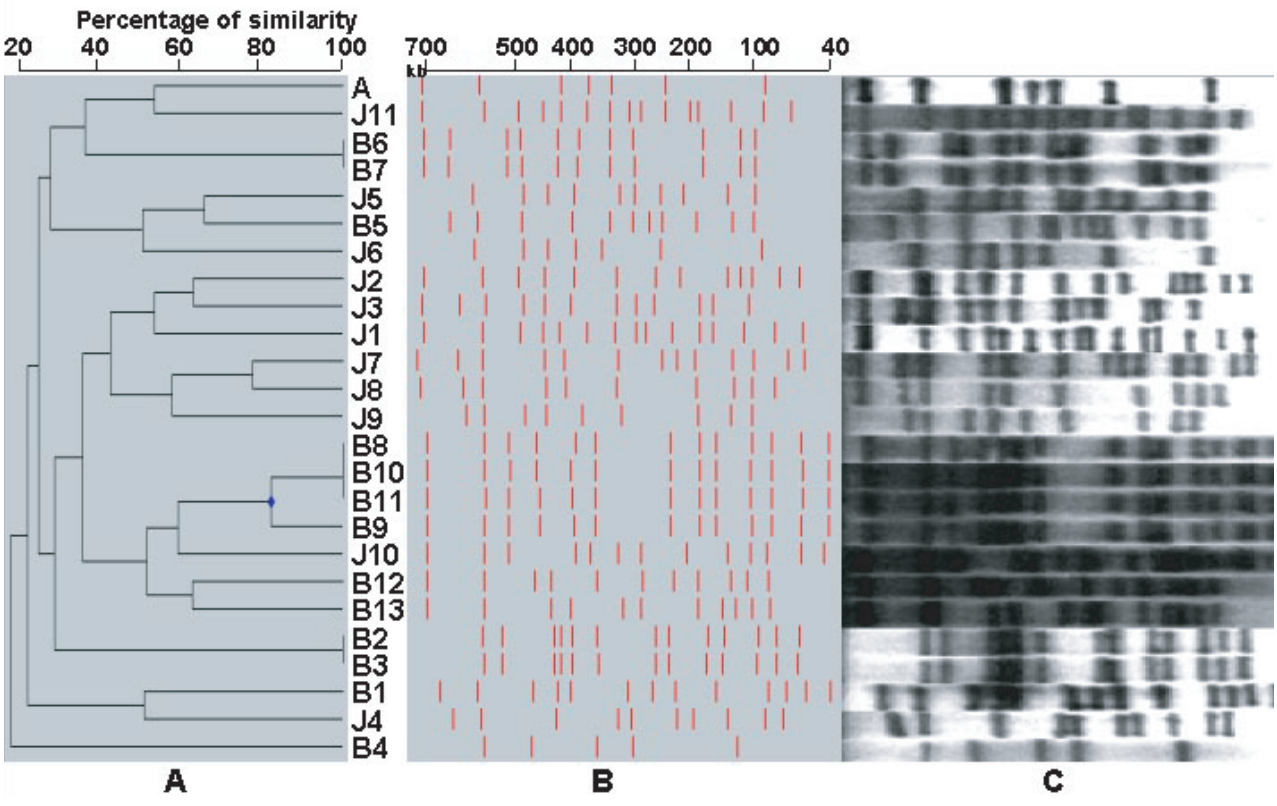

Fig. 1. Clustering of *L. pneumophila* isolates by PFGE patterns. (A) Dendrogram corresponding to panel B in accordance with UPGMA clustering on a matrix based on the Dice coefficient. (B) Schematic representation of PFGE patterns. (C) PFGE electrophoretic patterns.

mL에 부유하여 50℃ 에서 30분간 열처리하였다. 항생 물질 glycine, vancomycin, polymicxin B 및 cyclohexamide와 영양물질 L-cysteine 및 ferric pyrophosphate가 첨가된 BCYE 한천배지에 열처리한 검체 100㎕를 접종하여 90 % 습도를 유지하여 37℃에서 5 10일간 배양하였다. 균의 동정은 배양 4일 후부터 자라 나온 회백색의 집락을 BCYE 한천배지와 혈액한천배지에 동시에 접종하여 BCYE 한천배지에서는 자라고 혈액한천배지에서는 자라지 못하는 균주를 대상으로, 그람 음성, catalase 양성인 균을 *Legionella* 속으로 추정하여, 혈청형으로 동정하였다. 동정 및 혈청형 확인은 *Legionella* latex test kit (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY. *L. pneumophila* 혈청형 1-6까지 구분할 수 있는 제품임), *Legionella* antisera (Denka Seiken, Tokyo, Japan. *L. pneumophila* 혈청형 1을 구분할 수 있고, 혈청형 2-14까지 다가 항혈청만 제공하는 제품임)로 확인하였으며, *Legionella* latex test kit에서 반응이 없고, *Legionella pneumophila* 2-14에서 응집된 것은 혈청형 7-14로 표시하였다. 환자에서 분리된 균주는 일본 각지에서 Toho 의과대학 미생물학교실(Tokyo, Japan)에 분리배양이 의뢰되어 통상적인 레지오넬라 분리방법으로 분리한 후 보관되어 있던 균주를 균주명과 함께 제공받았으며, 균 동정명과 혈청형은 본 실험에서 따로 확인하지 않았다.

3. PFGE analysis

GenePath Group 5 Reagent K (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)와 GenePath™ Strain Typing System (Bio-Rad)을 이용하여 분석하였다. 일련의 검사 과정, 즉, 균주 부유액의 plug mold 제작, proteinase K 처리, *Sfi*I 제한효소 처리, GenePath electrophoresis cell을 이용한 전기영동의 과정을 제조사의 권유에 따랐다.

3. 결과 분석

GenePath에서 얻어진 겔 사진은 Fingerprinting II (FP-II) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. Lambda ladder 패턴에 근거하여 수직 또는 수평적으로 strip을 정렬하여 각각의 밴드를 읽고 각 균주의 패턴을 데이터베이스화한 후 겔 내 또는 겔 간의 패턴을 비교하여 연관성 백분율을 계산하였다. Clustering은 Dice 연관성 계수로 계산된 유사성 결과에 대해 UPGMA법을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

결 과

25균주의 염색체 DNA는 *Sfi*I 제한효소에 의해 40-700 kb 크기의 분절 5개-15개로 절단되었으며, 총 21개의 형으로 구분되었다 (그림 1). 같은 건물의 다른 장소에서 분리된 균주 B5와 B6은 서로 다른 PFGE 분절 양상을 보여서 다른 감염원에서 유래된 것으로 판단되었다. 같은 분절 양상을 보이는 균주들은 다음과 같다. 경상남도 김해와 통영에서 분리된 B6과 B7, 부산시 동구, 북구, 해운대구, 부산진구에서 분리된 B8, B10, B11, B9 및 부산시 해운대구와 기장군에서 분리된 B2와 B3의 염색체 DNA는 각각 같은 절단양상을 보였다. 이들 균주 중 B8과 B9 및 B2와 B3은 서로 인접한 지역에서 분리된 것이었고, 나머지 균주들은 같은 절단 양상을 보이는 다른 균주들과 멀리 떨어진 곳에서 분리된 것이었다. 일본의 폐렴 환자에서 분리된 균주들은 서로간에 혹은 한국의 환경분리 균주들과 현저하게 다른 절단 양상을 보였다.

고 찰

레지오넬라에 의한 폐렴은 임상 증상만으로 다른 원인균에 의한 폐렴과 구분하기에 쉽지 않다[2, 12, 13]. 배양은 환자가 객담을 배출하지 않는 경우가 많고 검사의 민감도도 10% 이하에 불과하며, 소변 항원 검출법은 민감도와 특이도가 높지만 *L. pneumophila* serogroup 1만 검출할 수 있는 단점이 있고, 그 외 혈청 항체 검사나 PCR 검사가 갖고 있는 한계 등을 고려해 보면 현재 사용 가능한 검사들 중에서 레지오넬라 감염증을 진단하기에 충분한 검사법은 없다고 할 수 있다[14]. 이로 인하여 지역사회 획득 폐렴으로 산발적으로 발생하는 레지오넬라 감염증은 실제보다 낮은 빈도로 진단되고 있을 것으로 생각된다. 레지오넬라는 집단 감염을 흔히 유발하며, 냉각탑이나 온천수같이 적당하게 높은 온도를 가진 물이 감염원인 것으로 알려졌다. 집단 감염을 흔히 유발하는 레지오넬라의 감염원 확인은 이 질환의 예방과 전파 차단에 매우 중요하다.

레지오넬라의 형별 분류 방법으로는 PFGE[15, 16], amplified fragment length polymorphism (AFLP)[17, 18], infrequent-restriction-site (IRS) PCR[19], variable-number tandem repeats (VNTR) typing[20], arbitrarily primed PCR [21] 등이 있다. PFGE는 변별력과 재현성이 높은 방법이므로[6-8], 본 연구자들도 *Sfi*I 제한효소로 처리한 염색체 DNA를 PFGE하여서 균주들의 형별 분류를 시도하였다.

검사 결과 25 균주의 형별이 21개로 구분되어 PFGE가 레지오넬라의 형별 분류에 매우 우수한 검사임을 확인할 수 있었다. 또한 한 건물의 두 장소에서 분리된 두 균주도 서로 다른 형을 보여서 집단 감염의 발생시 감염원의 확인에도 유용한 검사임을 알 수 있었다. 다만, 서로간에 역학적 관련성이 없는 것으로 생각되는 균주들 사이에도 동일한 PFGE 절단 양상을 보일 경우, 이 균주들에 대한 해석은 신중히 할 필요가 있을 것으로 생각된다. 본 연구 결과에서도 그런 예가 관찰되었는데, 그 가능성은 첫째, 드문 확률로 동일한 균주가 둘 이상의 장소에서 분리되었거나, 둘째, 서로 기원이 다른 균주가 우연히 같은 PFGE 양상을 보이는 경우로 생각할 수 있다. PFGE에 의한 형별 분류법의 변별력이 우수하다고는 하지만[6, 15, 22] 때론 감염원이 다른 *L. pneumophila* 균주에서 같은 형의 염색체 DNA 절단 양상을 보이는 경우가 있어서 해석에 주의를 요한다는 보고도 있다[9-11]. 이들의 연구에 의하면 여러 곳의 환경 오염원으로부터 분리된 균주가 특정한 하나의 PFGE 형을 보일 수 있고, 병원감염으로 추정되는 폐렴 환자에서 분리된 형과 동일한 형을 보이는 균주가 감염원으로 의심되는 병원 뿐만 아니라 다른 병원이나 건물에서도 분리된 바 있어서 PFGE 양상 만으로 감염원을 추정하는 것은 오류를 유발할 가능성이 있다고 한다. 따라서, 본 연구에서 같은 염색체 DNA 절단 양상을 보이는 균주들도 서로 다른 감염원에서 기원한 것이면서 우연히 같은 절단 양상을 보이고 있을 가능성이 있다.

결론적으로, 본 연구 결과 PFGE를 이용한 레지오넬라의 형별 분류는 분별력이 우수한 검사로 감염원의 동일성을 증명하는데 매우 유용한 검사이기는 하지만, 동일한 절단 양상이 반드시 동일한 감염원에서 유래한 균주임을 확증하는 것은 아님을 확인할 수 있었다.

요 약

배 경 : 레지오넬라 감염증이 집단 발생하면 감염원의 규명이 중요하다. 본 연구자들은 환경이나 환자의 검체에서 이미 분리된 레지오넬라 균을 대상으로 하여 분자역학적 방법으로 형별 분류를 시도하여 보았다.

방 법 : 환경에서 분리된 *Legionella pneumophila* 13균주, 환자에서 분리된 11균주(J1-11) 및 표준균주(*L. pneumophila* ATCC 33152)를 사용하여 pulsed field gel electrophoresis 방법으로 실험하였다.

결 과 : 25균주가 21개의 형으로 구분되었다. 같은 건물의 다른 장소에서 분리된 두 균주가 서로 다른 PFGE 분리 양상을 보였고, 다른 지역에서 분리된 균주들이 각각 2균주, 4균주, 2균주씩 같은 양상을 보였다.

결 론 : PFGE를 이용한 레지오넬라의 형별 분류는 분별력이 우수한 검사로 감염원의 동일성을 증명하는데 매우 유용한 검사이기는 하지만, 동일한 절단 양상이 반드시 동일한 감염원에서 유래한 균주임을 확증하는 것은 아님을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Bartlett JG, Mundy LM. Community-acquired pneumonia. N Engl J Med 1995;333:1618-24.

2. Lieberman D, Porath A, Schlaeffer F, Boldur I. *Legionella* species community-acquired pneumonia. A review of 56 hospitalized adult patients. Chest 1996;109:1243-9.
3. 김민자, 정희진, 손장욱, 심희선, 박대원, 박승철 등. 성인 지역사회 폐렴의 원인 미생물에 대한 전향적 다기관 연구: *Legionella, Leptospira*, Hantaan virus and *Orientia tsutsugamushi*. 감염 2001;33:24-31.
4. 송홍석, 서지현, 안종호, 윤병인, 이승준. 이명구 등. 입원한 지역사회획득 폐렴 환자에서 요중 레지오넬라 항원 검사를 통해 본 *Legionella pneumophila* 감염의 비중. 결핵및호흡기질환 2001;50:409-14.
5. 최태윤, 김원배, 이동화, 강득용. 원내 및 원외감염성 향균병 3예. 대한임상병리학회지 1993;13:467-72.
6. 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.
7. Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsborg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, et al. A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. Clin Microbiol Infect 1999;5:462-77.
8. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch 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.
9. Drenning SD, Stout JE, Joly JR, Yu VL. Unexpected similarity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of unrelated clinical isolates of *Legionella pneumophila*, serogroup 1. J Infect Dis 2001;183:628-32.
10. 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.
11. 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.
12. Breiman RF, Butler JC. Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. Semin Respir Infect 1998;13:84-9.
13. Roig J, Aguilar X, Ruiz J, Domingo C, Mesalles E, Manterola J, et al. Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumonias. Chest 1991;99:344-50.
14. Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. Legionella and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. Am J Med 2001;110:41-8.
15. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassiday 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.
16. Ott M, Bender L, Marre R, Hacker J. Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. J Clin Microbiol 1991;29:813-5.
17. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. J Clin Microbiol 1995;33:1716-9.
18. Fry NK, Bangsborg JM, Bernander S, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, et al. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:773-80.
19. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J Clin Microbiol 1996;34:2386-90.
20. Pourcel C, Vidgop Y, Ramisse F, Vergnaud G, Tram C. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. J Clin Microbiol 2003;41:1819-26.
21. Gomez-Lus P, Fields BS, Benson RF, Martin WT, O'Connor SP, Black CM. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol 1993;31:1940-2.
22. Marrie TJ, Johnson W, Tyler S, Bezanson G, Haldane D, Burbridge S, et al. Potable water and nosocomial Legionnaires' disease--check water from all rooms in which patient has stayed. Epidemiol Infect 1995;114:267-76.