

부산지역에서 최근 5년간 분리한 레지오넬라균에 대한 분자생물학적 특성연구

이승주[†] · 박성아 · 임효상 · 권영희 · 조경순 · 김성준 · 류병순
미생물과

Molecular Typing of *Legionella Pneumophila* Isolated in Busan, 2004-2008

Seung-Ju Lee[†], Sung-Ah Park, Hyo-Sang Lim, Young-Hee Kwon, Kyung-Soon Cho, Seong-Joon Kim and Byung-Soon Ryu
Microbiology Division

Abstract

We investigated the contamination of *Legionella* on water supply system including cooling towers, public baths and hospitals in Busan from 2004 to 2008. A total of 120 samples were collected and 53 *Legionella* isolates were identified to *L. pneumophila* serogroup 1. We analyzed the distribution of *L. pneumophila* serogroup 1 by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Among 53 isolates, 44 PFGE patterns were found. The most environmental isolates were showed sporadic and highly discriminatory PFGE pattern. PFGE was performed after the genomic DNA of *L. pneumophila* isolates was digested with *Sfi* I. The similarity of PFGE pattern was over 41.9%. PFGE may be a useful tool in molecular epidemiology studies and the monitor and control for water supply systems.

Key words : *Legionella pneumophila* serogroup 1, PFGE

서 론

레지오넬라증은 인공수계, 냉각탑수, 호흡기 치료장치 등이 레지오넬라균에 오염되었을 때 에어로졸의 전파에 의하여 집단 발생하는 급성폐렴질환으로 특히 면역기능이 저하된 장기이식 환자에서 발생하는 보고가 증가하고 있다¹⁾. 레지오넬라증의 발병은 전 연령층에서 발생 가능하지만 50세 이상의 성인에게서 주로 발생하며, 특히 면역 억제제 치료자, 수술 환자, 알콜 중독자, 깃연자, 노약자 등은 감수성이 높으며, 사람으로부터 사람으로의 감염은 일어나지 않고 사람만이 유일한 자연숙주로 알려져 있다²⁾. 병원의 수계시설이 레지오넬라균에 오염되어 장기이식, 암 등 면역체계가 약해진 환자들에서 레지오넬라증이 발생할 경우에는 적절한 치료를 하여도 50% 이상의 사망률을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 최근 들어 고령인구의 증가 동남아 및 유럽 등 발생 다발 지역으로의 여행객 증가, 지구 온난화로 인한 냉방시설의 이용 증가 등에 따라 전 세계적으로 레지오넬라증 발생은 증가추세에 있다. 우리나라에서는 1984년 처음으로 폰티악열(Pontiac fever)에 의한 레지오넬라증 발생이

보고되었고 1998년 3차 의료기관에서 발생한 레지오넬라증 사례보고 이후 지역사회 획득 및 병원 내 획득에 의한 레지오넬라증 감염사례들이 보고되었다. 또한 하절기인 7월에서 9월까지 주로 발생하는 계절적 양상을 띠는데 이는 중앙 냉방장치의 사용과 관련이 있다^{3),4),5)}.

특히 찜질방, 온천 등 다중 이용시설을 이용하는 인구가 증가하고 있어 오염된 수계시설을 통한 질환 발생의 위험에 노출될 기회가 많아지고 있다. 그러나 지역 사회에서 간헐적 또는 산발적으로 발생하는 경우에는 그 원인을 신속히 추적하여 밝히는 것이 매우 어렵기 때문에 예방 관리 차원에서 오염 가능성이 있는 수계환경의 레지오넬라균 오염도를 조사하고 분리된 레지오넬라균의 유형을 분석함으로써 환자발생 시 신속히 대처할 수 있는 체계적인 관리 시스템을 마련하는 것이 매우 중요하다. 지금까지 알려진 레지오넬라균종 가운데 *L. pneumophila* serogroup 1과 serogroup 6, *L. micdadei*에 의한 감염이 가장 많으며, 국내에서도 냉각탑수 등에서 분리된 레지오넬라균은 주로 *L. pneumophila* serogroup 1이 우세하였으며, 2003년 *L. busanensis* (ATCC BAA-518)이 국내 최초로

[†]Corresponding author. E-mail : nowhappy@korea.kr
Tel : +82-51-757-7502, Fax : +82-51-753-1424

보고된 이후⁶⁾, *L. pneumophila* serogroup 6, 12, *L. micdadei*, *L. erythra*, *L. londiniensis*, *L. anisa*, *L. taurinensis* 등 다양한 균종들이 우리나라 다중이용시설의 수계에서 분리되고 있다. 또한 1985년-2001년 사이에 냉각탑수에서 분리된 *L. pneumophila* sg 1의 PFGE 유형을 분석한 결과, 외국의 참조균주(Philadelphia-1, ATCC 33152)와 동일한 유형을 발견할 수는 없었으나, 다양한 PFGE 유형 및 지역적 특성이 있음을 알 수 있었다⁷⁾. 국내에서는 환경수계의 분리균주에 대한 연구는 보고되고 있으나, PFGE 방법을 이용한 환자와 환경분리주 사이의 역학적인 연관성을 알아보는 기초연구는 이 등의 1985년부터 2001년 까지 분리한 레지오넬라균에 대한 molecular typing 연구 및 박등의 2001년부터 2003년까지 부산지역에서 분리한 레지오넬라균에 대한 분자 생물학적 연구 등 미미한 실정이다^{8,9,10)}. 따라서 레지오넬라증 환자 발생 시 원인균의 유래를 확인하여 질병관리에 이용하려면 분리되는 레지오넬라균의 유전자형에 대한 지속적이고 체계적인 분석이 필요하며, 이를 위해서는 분리균주에 대한 유전형 분석의 데이터 베이스에 대한 연구가 요구된다.

본 연구는 2004년부터 2008년 부산지역의 환경수계시설 검체에서 분리된 레지오넬라균 120균주 중 *L. pneumophila* serogroup 1으로 동정된 53균주를 사용하였다. 아울러 분리된 레지오넬라균의 유전학적 분석을 위한 PFGE를 실시하여 유전적인 양상을 지역별로 분류하여 지역적인 특성을 파악하고, 데이터 베이스화하여 향후 부산지역에서 레지오넬라균에 의한 질병 발생 시 역학의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

대상균주

2004년부터 2008년 사이 부산지역 환경수계로부터 병원체에 대한 분리 검사를 시행하였다. 분리된 병원체는 GVPC(glycine-vancomycin-polymyxin B-colisitin)를 첨가한 BCYE- α (buffered charcoal yeast extract- α -ketoglutarate) 선택배지에서 37°C 7일간 1차 배양 한 후 회백색, 반투명, 습윤한 집락을 선별하였다. 선별균주는 BCYE- α 한천배지, L-cysteine 결핍 BCYE- α 한천배지, 혈액한천배지 2차 배양한 후 BCYE- α 한천배지에서만 배양되는 *L. pneumophila* 120주를 분리하였다. 분리주는 순수 배양 후, Denka사에서 제조한 *Legionella* 진단용 kit (DENKA, Seiken, Japan)을 사용하여 slide응집 반응을 확인한 후 *L. pneumophila* serogroup 1으로 확인된 53주를 선별하였다.

Legionella 균속 독소 유전자 검출

*L. pneumophila*의 주요 독성요소인 *mip* 유전자의 존재를 중합효소 연쇄반응을 사용하였다. premix(AccuPower PCR Premix Bioneer)를 사용하였으며 반응은 95°C에서 60초, 60°C

에서 60초, 72°C에서 60초, 30회 조건으로 증폭시켜 630bp 크기의 유전자 산물을 확인하였다.

Pulsed Field Gel Electrophoresis(PFGE)

환경에서 분리된 *L. pneumophila* serogroup 1들간의 유전학적인 유사도를 비교하기 위하여 PFGE를 수행하였으며, Plug 준비는 순수 배양된 균을 Cell Suspension TE buffer (100mM Tris; 100mM EDTA, pH 7.5)에 넣어 현탁시키고 같은 양의 1.2% SeeaKem Gold Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME., USA)를 섞었다. 만들어진 plug는 proteinase K가 들어 있는 ES buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine)에 넣어 균을 용균시킨 후 세척하였다. 용균 처리된 plug는 *Sfi*III (Roche, Basel, Switzerland)에서 반응시킨 후에 CHEF mapper apparatus (Bio-Rad, Richmond, Ca., USA)에서 1% agarose gel에 넣어 0.5X Tris-brate-EDTA buffer, 6V/cm, 14°C, initial time 2,16초에서 final time 54,17초 switch time의 조건으로 18시간 동안 전기영동을 하였다.

각 PFGE 유형사이의 유사도는 BioNumeric software V5.0 (Applied Math, Kortrijk, Belgium)을 사용하여 분석하였다. Band pattern의 분석은 Dice coefficient와 1.5% tolerance를 적용하였고, dendrogram은 unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) 방법으로 작성하였다.

결과 및 고찰

균주 분리현황

환경으로 분리된 120주의 혈청형 확인 결과 *L. pneumophila* serogroup 1이 53주로 확인되었다. 본 연구에서 확인된 *L. pneumophila* serogroup 1의 분리시기별 결과는 2004년 6건, 2005년 4건, 2006년 5건, 2007년은 12건, 2008년에는 26건이 분리되었고 분리지역별 결과는 강서구 4건, 금정구 1건, 남구 3건, 동구 6건, 동래구 2건, 부산진구 4건, 사상구 2건, 사하구 3건, 서구 4건, 수영구 4건, 연제구 8건, 영도구 3건, 중구 5건, 해운대 4건으로 확인되었다.(Fig. 1) 환경수계 시설별 결과는 대형건물 냉각탑수에서 33건, 종합병원 냉각탑수에서 10건, 목욕탕내 온수에서 4건, 대형목욕탕 샤워기온수, 목욕탕 샤워 냉수, 종합병원 샤워실 온수, 목욕탕 샤워헤드 swab, 목욕탕 수도냉수, 종합병원 화장실 수도온수에서 각각 1건이 분리되었다(Fig. 2).

Legionella 균속 독소 유전자 검출

중합효소 연쇄반응을 이용하여 *Legionella* 균속 독소유전자 보유 여부를 확인한 결과, 53주 모두에서 630bp 크기의 *mip* 유전자가 증폭이 되어 대상균주 모두가 이 유전자들을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

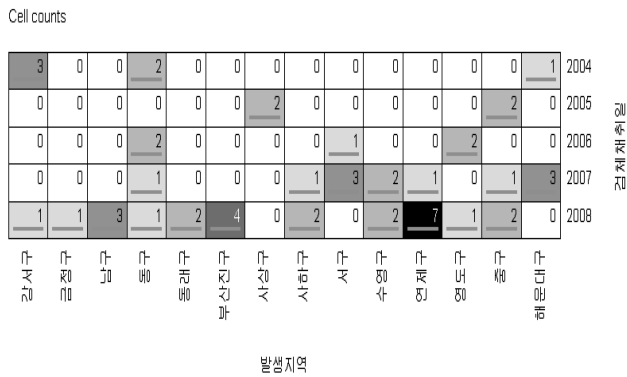


Fig. 1. Distribution of *Legionella pneumophila* sg 1 isolated in Busan during 2004 - 2008.

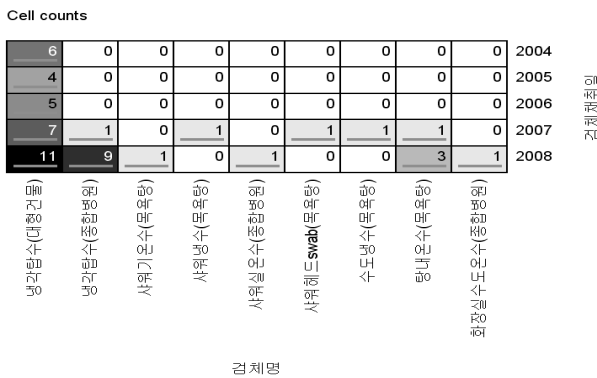


Fig. 2. Distribution of *Legionella pneumophila* sg 1 isolated from water system in Busan during 2004 - 2008.

분리균주들 사이의 유전학적 연관성

PFGE를 이용하여 *L. pneumophila* serogroup 1 균주 53주의 연관관계를 분석하였다. 각 PFGE 유형의 명명은 부산지역, *Legionella* 균속과 사용한 제한효소를 기준으로 명명하였으며 그 결과, 분리된 *L. pneumophila* serogroup 1 균주는 BSLEGS 12.001에서 BSLEGS12.044 까지 44개의 PFGE 유형으로 나뉘었다. (Fig. 3, Fig. 4) 44개의 PFGE 유형 중 100% 유사도로 분석된 유형은 BSLEGS12.004, BSLEGS12.012, BSLEGS12.027, BSLEGS12.034, BSLEGS12.037 유형 각 2주, BSLEGS12.022, BSLEGS12.036 유형 각 3주가 확인되었다.

BSLEGS12.001; BSLEGS12.002; BSLEGS12.003 유형, BSL EGS12.012; BSLEGS12.013 유형, BSLEGS12.015; BSLEGS12.016 유형, BSLEGS12.019; BSLEGS12.020; BSLEGS12.021 유형, BSLEGS12.027; BSLEGS12.028 유형, BSLEGS12.036; BSLEGS 12.037; BSLEGS12.038; BSLEGS12.039; BSLEGS12.040 유형, BSLEGS12.041; BSLEGS12.042 유형간 유사도가 90%이상으로 분석되었으며 전체 유형간 유사도는 49.1%이상으로 분석되었다 (Fig. 5).

L. pneumophila 수계 환경 내 상당수를 차지하고 있고 수도관등을 통해서 이동될 수 있으며 고인 물에서 번식하다가 물 분무 입자와 함께 이동되어 사람의 호흡기를 통해 감염된다. 본 연구에서는 2004년에서 2008년 까지 부산지역 수계 환경에서 분리된 *L. pneumophila* 중 44%를 차지하고 있는 혈청형이 serogroup 1으로 확인된 분리주 사이의 유전학적 유사도를 분석하고 분리시기 및 장소와 연관성을 확인하고자 하였다.

본 연구 대상균주는 2007년 12주, 2008년 25주로 2007년 이후 환경 내에서 *L. pneumophila*가 증가 추세에 있었으며, 부산 지역 내 대형건물, 종합병원, 목욕탕 등의 공공시설 내 수계 환경에서 분리한 결과 냉각탑수에서 분리주가 전체 분리주의 85%를 차지하는 것으로 확인되었다.

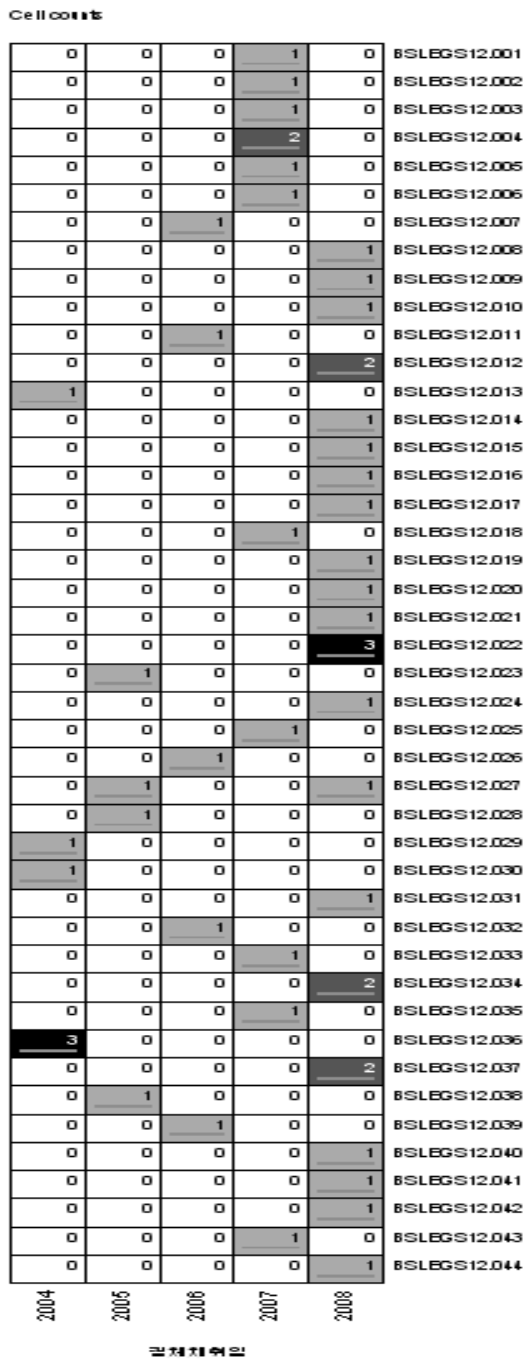


Fig. 3. Analysis of PFGE of 53 *L. pneumophila* serogroup 1 isolates in Busan during 2004 - 2008.

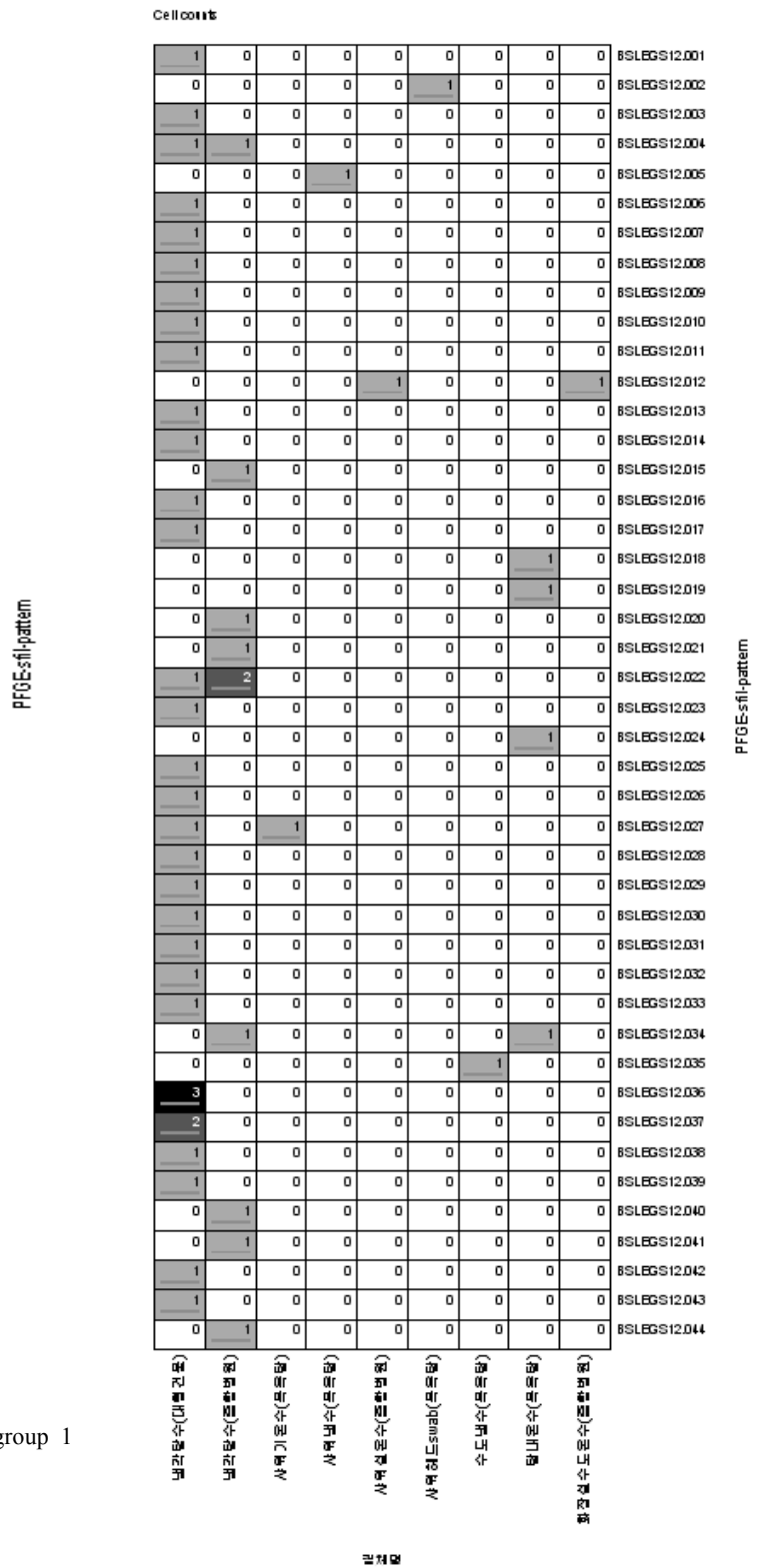


Fig. 4. Analysis of PFGE of 53 *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from water system.

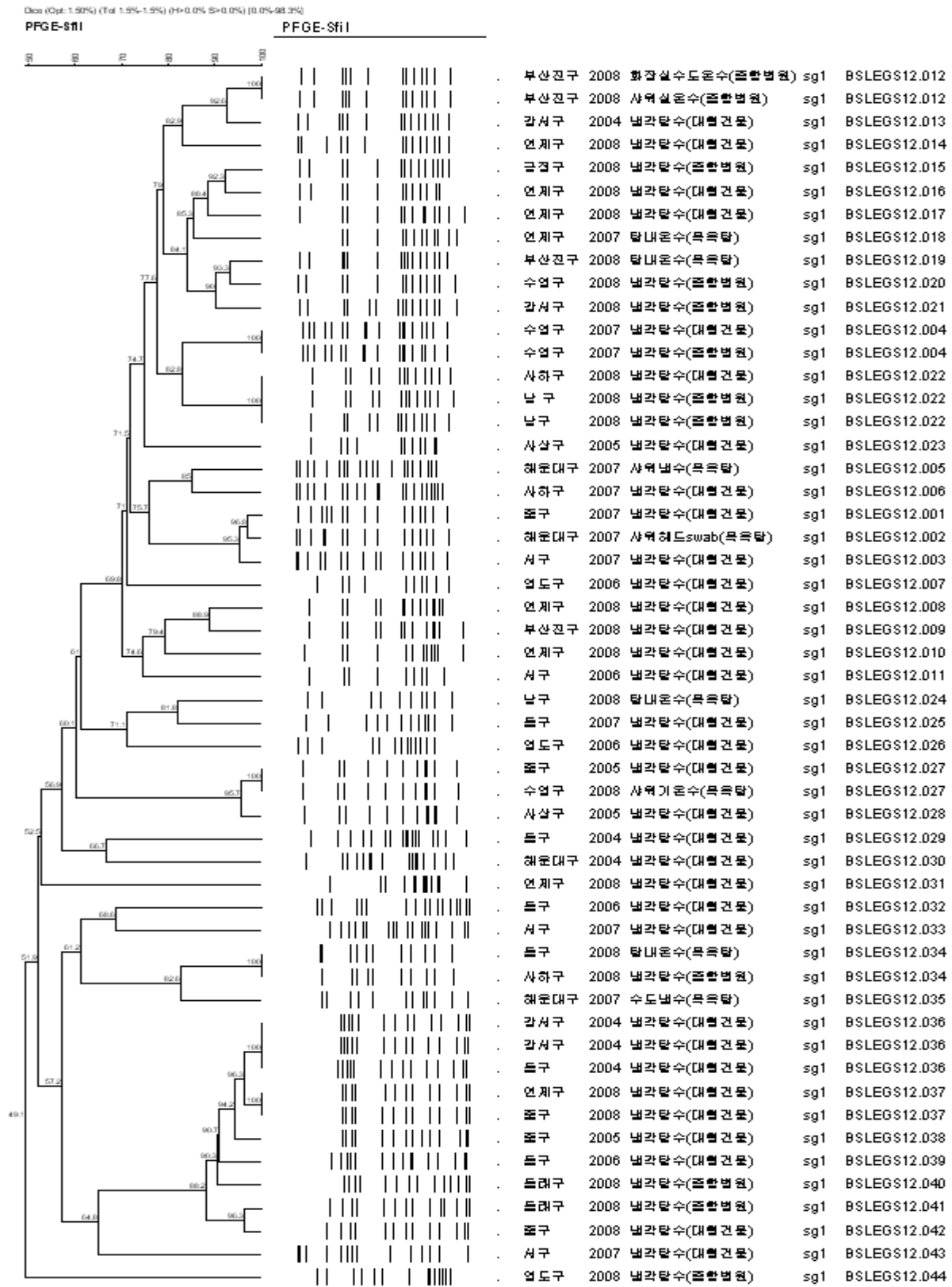


Fig. 5. DNAs were cleaved with *Sfi* I. Dendrograms based on dice coefficients of similarity for *L. pneumophila* serogroup 1.

결 론

2004년부터 2008년까지 부산시내의 수계환경에서의 분리한 *L. pneumophila* serogroup 1 53주의 균주에 대하여 제한효소 *Sfi* 1를 사용하여 PFGE 분석을 실시한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *L. pneumophila* 53건의 년도별 검체건수는 2004년 6건, 2005년 4건, 2006년 5건, 2007년 12건, 2008년 26건이며, 발생지역은 강서구 4건, 금정구 1건, 남구 3건, 동구 6건, 동래구 2건, 부산진구 4건, 사상구 2건, 사하구 3건, 서구 4건, 수영구 4건, 연제구 8건, 영도구 3건, 중구 5건, 해운대 4건으로 고루 분포하는 경향을 나타내었다.

2. 53개의 검체에서 분리된 균종 모두 *L. pneumophila* 에서만 검출되는 630 bp의 *mip* 유전자가 검출되어 *L. pneumophila*임을 확인할 수 있었다.

3. 분리주 120균주 중 53주가 *L. pneumophila* serogroup 1로 동정되었으며, 냉각탑수 등의 환경수계에서 분리된 레지오넬라균은 *L. pneumophila* sg 1이 우세하였다.

4. 53주의 *L. pneumophila* 분리주에 대해 PFGE를 시행한 결과, 41.9% 이상의 상동성을 기준으로 44개의 pattern으로 나타났으며 각 구별로 다양한 균주가 계속적으로 분포하고 있는 것으로 추정된다.

감사의 글

본 논문에 많은 도움을 주신 질병관리본부 장내세균과 김준영 선생님께 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser, R.E : Legionella and Legionnaires'Disease 25 Years of Investigation, Clin, Microbiol, Rev. 15, pp.506~526(2000).
- 김정순, Legionellosis의 역학. 감염. 제16권, 제2호, 심포지움. pp.1~11(1984).
- Stout JE, Yu VL, Muraca P, Joly J, Troup N and Tompkins LS : Potable water as a cause of sporadic cases of community acquired Legionnaires' disease, N. Engl. J. Med., 326, pp.151~155(1992).
- 감염병발생정보. vol.9, 국립보건원, 서울, pp.77~81(1998)
- 김민자, 정희진, 손장욱, 심희선, 박대원, 박승철, 우준희, 강재영, 김유겸, 신완식, 김양리, 이환중, 김지희 : 성인 지역사회 폐렴의 원인 미생물에 대한 전향적 다기관 연구 : *Legionella*, *Leptospira*, Hantavirus and *Orientia tsutsugamushi*, 감염, 33, pp.24~31(2001).
- Park, M.Y., Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.S., and Kook, Y.H. : *Legionella busanensis* sp. Nov., isolated from cooling tower water in Korea, Inter, J, Sys, Evol. Microbiol, 53, pp.77~80(2003).
- Benson RF and Fields B.S : Classification of the genus *Legionella*, FEMS Microbiol Lett 72, pp.253~257(1998).
- 이혜경, 양현성, 홍세라, 박만석, 심수경, 이병철, 박미연. 1985년부터 2001년까지 분리한 레지오넬라 국내분리균주에 대한 molecular typing. 국립보건원보, 38, pp.18~30(2001).
- 이혜경, 양현성, 홍세라, 박만석, 심수경, 유천권, 박미연: Pulsed-Filed Gel Electrophoresis(PFGE) 및 Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)을 이용한 국내 레지오넬라 분리균주의 분자유전학적 유형분석, 국립보건원보 37, pp.15~27(2000).
- 박은희, 김미희, 김정아, 한난숙, 진성현: 부산지역에서 분리한 레지오넬라균에 대한 분자생물학적 연구 부산광역시 보건환경연구원 13권, pp.39~53(2003).
- Hwang MG, Katayama H, Ohgaki S: Effect of intracellular resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphage* cell on the antimicrobial properties of silver and copper, Environ Sci Techol 40, pp.7434~7439(2006).
- Kuchta JM, States SJ, MaGlaughlin JE, Overmeyer JH, Wadowsky RM, McNamara AM, Wolford RS, Yee RB: Enhanced chlorine resistance of tapwater-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains, Appl Environ Microbiol 50, pp.21~26(1985).