

Molecular Epidemiology of *Legionella pneumophila* Isolated from Bath Facilities of Public Establishments in Seoul

Su jin Jeon*, Ji hun Jung, Young hee Jin, Jae kyoo Lee, Young hee Oh and Sung min Choi

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment,
Gwacheon-si, Gyeonggi-do, Korea

The genus *Legionella* is common in aquatic environments. Some species of *Legionella* are recognized as potential opportunistic pathogens for human, notably *Legionella pneumophila* that causes Legionellosis. During the summer season between June and August in 2010, we isolated 61 *L. pneumophila* from the bath facilities of public establishments of 25 wards in Seoul. The existence of 16S rRNA and *mip* gene of *L. pneumophila* was confirmed in the genome of the isolated strains by PCR. Among the 61 strains of *L. pneumophila*, thirty three isolates belong to serogroup 1 (54.1%), 13 isolates were serogroup 6 (21.3%), 9 isolates were serogroup 5 (14.8%), 3 isolates were serogroup 3 (4.9%), and 3 isolates were identified in serogroup 2 (4.9%). On pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis using *Sfi*I, genetic types of *L. pneumophila* were classified into 8 (A to H) patterns by the band similarity with excess of 65%. Our results suggest the existence of serological and genetic diversity among the *L. pneumophila* isolates.

Key Words: *Legionella pneumophila*, *mip*, Pulsed-field gel electrophoresis

서 론

*Legionella pneumophila*는 1976년 미국 필라델피아에서 집단 발생한 폐렴의 원인균으로 확인된 이후 미국은 물론 세계 각국에서 다수의 산발적인 발생뿐만 아니라 집단적으로 발생한 예도 보고되고 있다.

레지오넬라속균(*Legionella* spp.)은 자연계의 토양을 비롯하여 하천과 호수에서 서식하는 그람음성 막대균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 있다. 레지오넬라 감염은 대개 불현성으로 진행되며, 임상증상은 독감과 유사한 증상을 나타내는 폰티악열과 중증의 폐렴을 나타내는 레지오넬라증(재향군인병)의 두 가지 형태로 나타난다. 레지오넬라증의 발병은 면역억제제 치료자, 수술환자, 알코올중

독자, 흡연자, 노약자 등 면역력이 떨어진 개체에 치명적이며, 사람에서 사람으로의 감염은 일어나지 않고 사람만이 유일한 자연숙주로 알려져 있다 (1).

사람에 대한 병원성과 연관성이 깊은 레지오넬라균 유전자는 *mip* (macrophage infectivity potentiator)이 대표적이며, *L. pneumophila*를 다른 레지오넬라균에 대하여 구별할 수 있게 하는 표적 유전자이기도 하다 (2~4). 또한 *mip*은 초기에 macrophage 내 감염을 효과적으로 일으키는 역할을 한다 (5, 6).

레지오넬라 속에는 현재 48개의 종(species)과 70개의 혈청형이 존재하며, 분리율이 가장 높은 *L. pneumophila*를 비롯하여 20종이 사람에게 질병을 일으킨다. 이 중 *L. pneumophila* serogroup 1은 세계적으로 레지오넬라증을 일으키는 원인균의 95%를 차지하고, 그 subtype도 다양하다. 이런 다양한 *L. pneumophila* serogroup의 subtyping에는 단클론 항체 typing, plasmid 분석, multienzyme 또는 alloenzyme electrophoresis, restriction fragment length polymorphism, ribotyping 및 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)와 같은 macrorestriction enzyme digestion 등이 이

Received: August 5, 2011/ Revised: October 12, 2011

Accepted: November 9, 2011

*Corresponding author: Su jin Jeon. Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Yongmeori 2 gil 18, Gwacheon-si, Gyeonggi-do, 427-070, Korea.
Phone: +82-2-570-3419, Fax: +82-2-570-3418
e-mail: mermaid70@seoul.go.kr

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' → 3')	Product size
16S rRNA	F: AGGGTTGATAGGTTAAGAGG	386 bp
	R: CAACAGCTAGTTGACATGG	
<i>mip</i>	F: GGTGACTGCGGCTGTTATGG	630 bp
	R: GGCCAATAGGTCCGCAACG	

용되고 있다. 특히, 제한효소 *Sfi*I이나 *Not*I을 이용한 PFGE는 변별력이 가장 좋은 방법으로 역학적으로 관련이 있는 균을 분류하는데 이용하고 있다 (7).

*L. pneumophila*는 여러 가지 경로를 통하여 인공의 수계시설로 유입되면서 레지오넬라 질환의 발생이 증가하고 있다. 인공의 수계시설로는 건물의 냉각 순환수로 사용되는 냉각탑수를 비롯하여, 목욕탕수, 분수 등이 있으며, 불특정 시민들이 이용하는 이러한 다중이용시설의 증가로 인하여 이들 시설을 통한 감염이 우려되고 있으므로, 이들 다중이용시설에 대한 주기적인 감시 강화가 필요할 것으로 사료된다 (8, 9).

본 연구는 2010년 6월부터 8월까지 서울시 25개구 소재 대형목욕탕, 찜질방 및 사우나 등 다중이용목욕시설의 탕내 냉수, 탕내 온수, 탕내 샤워냉수, 탕내 샤워온수 등으로부터 분리된 *L. pneumophila*를 대상으로 혈청형, 병원성 유전자의 확인 및 PFGE pattern 분류를 실시하였다. 이를 통해 *L. pneumophila*의 유전적 분포실태 파악과 예방관리 근거 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취

2010년 6월에서 8월 동안의 서울시 25개구 소재 대형목욕탕, 찜질방, 사우나 등의 다중이용목욕시설에 대해 탕내 샤워냉수, 탕내 샤워온수, 탕내 냉수, 탕내 온수 등을 대상으로 총 242건에 대하여 *L. pneumophila* 검출 실험을 실시하였다.

분리균주의 분리 및 동정

채취시료 1 L를 여과지(0.2 µm)를 통과시켜 균을 모은 후 여과지를 잘게 잘라 멸균증류수 20 ml에 넣어서 강하게 와류시킨 다음, 50°C에서 30분간 열처리한 후 이것을 검액으로 사용하였다. 검액 0.1 ml와 0.01 ml을 glycine-

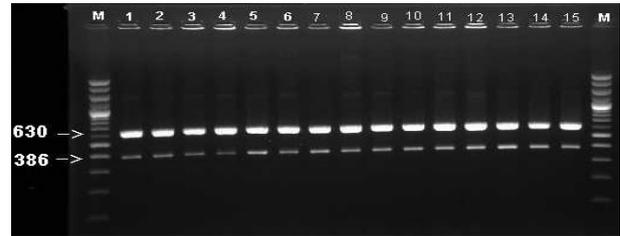


Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products of *mip* gene (630 bp) and 16S rRNA (386 bp) on 1.5% agarose gel. M was 100 bp DNA ladder. All lanes (1~15) were showed bands of correct size for *L. pneumophila*.

vancomycin-polymyxin B-colistin (GVPC)을 첨가한 buffered charcoal yeast extract- α -ketoglutarate (BCYE- α , Difco, Sparks, USA) 선택배지에 각각 희선도말하고, 37°C에서 7일간 배양하였다. 3일째부터 자란 집락 중 회백색이고, 약간 투명감이 있고, 습윤한 집락으로 특유의 신냄새가 있고 해부 현미경 상에서 cut-glass의 형태를 띠는 집락에 대하여 그람염색을 시행하였다. 그람음성 막대균으로 확인된 집락을 다시 BCYE- α 한천배지와 L-cysteine (Difco)이 결핍된 BCYE- α 한천배지 및 혈액한천배지에 각각 계대배양하였다. L-cysteine은 성장을 자극하는 역할을 한다. BCYE- α 한천배지에서는 발육하고 L-cysteine 결핍된 BCYE- α 한천배지 및 혈액한천배지에서는 발육하지 않는 그람음성 막대균을 레지오넬라균으로 일차 동정하였다 (10, 11).

PCR (Polymerase chain reaction)에 의한 *mip* 유전자 검출

*L. pneumophila*의 16S rRNA 및 특이적으로 존재하는 *mip* 유전자에 대한 PCR을 실시하였다. 사용된 primer는 *mip*-X (5'-GGTGACTGCGGCTGTTATGG-3')와 *mip*-Y (5'-GGCCAATAGGTCCGCAACG-3')을 사용하였다(Table 1).

가열법으로 추출한 DNA를 GeNeT Bio premix를 사용하여 97°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 40초를 30회 반복하고 최종 72°C에서 5분간 증폭시켰다. 이 PCR 산물을 1.5% agarose gel을 이용하여 25분간 전기영동한 후 16S rRNA 및 *mip* 유전자의 증폭유무를 확인하였다 (Fig. 1).

분리균주의 혈청학적 동정

분리된 *L. pneumophila* 시험균주를 다시 BCYE- α 한천배지에서 배양 후, serotyping kit (Denka Seiken, Japan)를 사용하여 혈청형을 확인하였다. 생식식염수에 시험균을

진하게 푼 다음 100°C에서 1시간 또는 120°C에서 15분간 가열 처리한 후, 슬라이드 응집 시험법에 의한 항혈청-항원액 반응으로 혈청형을 결정하였다 (12).

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

BCYE- α 한천배지에서 72시간 배양한 실험균주를 cell suspension 용 TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 현탁하여 탁도를 20% 정도로 조정된 후, 균 현탁액 200 μ l에 1.2% agarose solution을 동량 첨가하여 plug mold에서 4°C, 5분간 성형시켰다. Proteinase K (20 mg/ml stock) 40 μ l와 ES buffer 1.5 ml의 혼합액에 균힌 plug을 넣어서 55°C 진탕 항온수조에서 2시간 동안 처리한 후, 55°C의 멸균증류수로 15분간 1회, 55°C의 Plug Wash TE buffer로 30분간 5회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 자른 다음, *Sfi*I이 첨가된 반응 혼합액에 넣어 50°C 항온수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 plug를 gel 성형용 comb에 위치시킨 다음, 1% agarose를 gel 성형틀에 부어 균힌 다음 CHEF Mapper PFGE system (BioRad, USA)를 이용하여 gradient 6.0 V/cm, included angle 120°, initial time 2.16초, final time 54.17초의 조건으로 14°C에서 18시간 동안 전기영동을 실시하였다. EtBr (0.5 μ g/ml) 용액에서 gel을 30분간 염색한 후, 증류수로 탈색과정을 거친 다음 transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하였다. PFGE 결과 분석을 위하여 BioNumerics software (Applied Maths, Belgium) version 3.5를 이용하여 dendrogram을 작성하였다 (13).

결과 및 고찰

분리균주의 혈청형

서울시내 다중이용목욕시설의 탕내 샤워냉수, 탕내 샤워온수, 탕내 냉수, 탕내 온수 등 총 242건의 *L. pneumophila* 배양검사를 실시하였다. 그 결과 61건(25.2%)에서 *L. pneumophila*가 검출되었다. 분리 동정된 세균의 혈청형 분포는 1형이 33주(54.1%), 6형이 13주(21.3%), 5형이 9주(14.8%), 3형이 3주(4.9%), 2형이 3주(4.9%)로 확인되었다(Table 2). 한편 기존에 발표된 연구보고들과 비교해 볼 때 4형은 여전히 검출되지 않았다 (10, 12).

Whang 등 (11)과 Kim 등 (14)은 서울시내 냉각탑수에서 분리된 *L. pneumophila*의 혈청형 1형이 각각 87.4%와 86.4%로 보고하였다. 본 연구에서는 대형목욕탕, 찜질방,

Table 2. Serotyping of *L. pneumophila* strains isolated from bath facilities of public establishments in Seoul

Species	Serogroup	Number of isolates (%)
<i>L. pneumophila</i>	1	33 (54.1%)
	6	13 (21.3%)
	5	9 (14.8%)
	3	3 (4.9%)
	2	3 (4.9%)
	4	0
Total		61

사우나 등의 다중이용목욕시설에서 분리된 균주의 혈청형 1형은 54.1%를 나타내었다. 혈청형 6형의 경우 Whang 등 (11)과 Kim 등 (14)은 냉각탑수에서 각각 6.3%와 13.6%가 검출되었다고 보고한 반면, 본 연구에서는 다중이용목욕시설에서는 21.3%가 검출되어 혈청형 분포에 있어서 냉각탑수와 차이를 나타내었다. 이와 같은 연구결과로 미루어 혈청형 6형은 혈청형 1형과 함께 우세하게 상존하는 레지오넬라 혈청형일 것으로 추정된다.

PFGE 패턴 분석

*L. pneumophila*의 패턴 분석에는 *NotI*을 사용하는 것보다 *Sfi*I을 사용하는 것이 세분화된 분류를 하기에는 더 변별력이 있다고 한 Park 등 (15)의 결과를 토대로 *Sfi*I 제한효소를 이용하였다. 다중이용목욕시설에서 분리된 *L. pneumophila* 61건에 대한 PFGE를 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 65% 이상의 상동성을 기준으로 A~H까지 8개의 유형으로 분류되었다. 이를 다시 75% 이상의 상동성을 기준으로 A는 A1~A3, B는 B1~B2, C는 C1~C4, D는 D1~D2, E는 E1~E4, F는 F1~F3의 subtype으로 분류되었다(Fig. 2와 Table 3).

가장 많은 유형은 E유형으로 61균주 중 18주(29.5%)로 나타났으며, F유형 18.0%, C유형 14.8%, A유형 13.1%, D유형 11.5%, B유형 9.8%로 다양한 유전적 양상을 보였다. 가장 많은 E유형을 살펴보면 18주 중 11주가 혈청형 1로 서로간에 상동성이 90.3% 이상의 상관관계를 나타냈다. 또한 혈청형 5는 E1에 속하였으며 서로간에 상동성이 90% 이상으로 이들 균주는 동일한 유래의 균주로 추정할 수 있었다. 혈청형 6은 E1, E2, E4에 나타났으며 서로간의 상동성은 74% 이상으로 관찰되었다. F유형의 경우도 혈

Table 3. Categories of PFGE and serogroup (sg) pattern of *L. pneumophila* strains isolated from bath facilities of public establishments in Seoul

PFGE pattern	PFGE sub-pattern	Sample name	Serogroup	
A	A1	Dongdaemun-7	sg 6	
		Youngdeungpo-1	sg 5	
	A2	Youngdeungpo-6	sg 5	
		Youngdeungpo-7	sg 5	
		Nowon-2	sg 5	
		Guro-3	sg 1	
		Seodaemun-1	sg 2	
	A3	Dongdaemun-2	sg 5	
	B	B1	Seongdong-7	sg 1
			Seongdong-8	sg 2
B2		Songpa-1	sg 2	
		Songpa-2	sg 1	
		Nowon-3	sg 1	
		Dongjak-2	sg 1	
C	C1	Dongdaemun-1	sg 6	
		Seongdong-5	sg 6	
		Seongdong-10	sg 1	
		Seongdong-2	sg 6	
		Nowon-5	sg 6	
	C2	Youngdeungpo-5	sg 6	
		Youngdeungpo-4	sg 1	
	C3	Jongno-3	sg 1	
		Youngdeungpo-3	sg 1	
		C4	Gangbuk-1	sg 1
Jongno-4	sg 1			
D	D1	Gangnam-2	sg 1	
		Songpa-6	sg 1	
		Nowon-4	sg 1	
		Yongsan-1	sg 6	
		Yongsan-2	sg 3	
		D2	Dongdaemun-3	sg 5
	Dongdaemun-4		sg 1	
	Seongdong-1		sg 1	
	Seongdong-9		sg 1	
	E	E1	Songpa-4	sg 1
Songpa-5			sg 5	
Gangdong-1			sg 1	

Table 3. Continued

PFGE pattern	PFGE sub-pattern	Sample name	Serogroup
E	E1	Gangdong-2	sg 5
		Jongno-5	sg 1
		Seongdong-3	sg 6
		Jongno-6	sg 5
	E2	Gangnam-1	sg 1
		Geumcheon-2	sg 6
		Gangdong-3	sg 1
	E3	Jongno-1	sg 1
		Jongno-7	sg 1
		Jongno-4	sg 1
E4	Seongdong-4	sg 1	
	Youngdeungpo-2	sg 6	
F	F1	Guro-1	sg 1
		Dongjak-1	sg 1
		Songpa-3	sg 1
		Dongdaemun-5	sg 1
		Seongdong-6	sg 6
		Gangnam-3	sg 3
		Dongdaemun-8	sg 1
		Jongno-2	sg 1
		Guro-2	sg 1
		Dongdaemun-6	sg 6
Nowon-1	sg 6		
G	G1	Geumcheon-1	sg 3
H	H1	Guro-4	sg 1

청형 1이 11주 중 7주로 가장 높게 나타났으며, F1 속하는 균주는 서로 90% 이상의 상동성을 나타냈다. F유형에 속하는 혈청형 6는 모두 강북지역에서 분리되었으며 80% 이상의 서로 상동성을 나타냄으로써 동일 유래균으로 추정할 수 있었다. C유형은 혈청형 6과 혈청형 1만 분리되었으며 혈청형 6은 C1과 C2로 나타났으며 둘의 상동성은 65.9%로 나타났지만 같은 지역에서 분리된 균인 경우 82.4%의 높은 상동성을 나타내었다. 혈청형 1은 C3, C4로 나타났으며 서로간의 상동성은 65.3%로 나타났다. C유형의 경우 성동구와 영등포구에서 주로 분리되었으며, 이 유래 균주가 강남과 강북지역 구분되지 않고 넓게 퍼져 있는 것을 볼 수 있다. A유형의 경우는 혈청형 5가 대

부분을 차지하였으며 78.9%의 상동성을 나타냈으며 A2의 영등포구에서 분리된 균은 상동성이 96.3%로 같은 유래균으로 추정할 수 있었다. G유형과 H유형은 각각 1균주가 분리되었으며 다른 균주들과 상동성이 많이 떨어짐으로 서로 다른 유래 균주로 판단되었다.

이와 같은 결과를 볼 때 같은 혈청형이라 할지라도 다양한 유전형이 분포되는 것을 알 수 있었다. 또한 인공의 수계시설에서 분리한 *L. pneumophila*가 유전적으로 다양하게 분화되어 감을 알 수 있었다. 앞으로 국내 여러 지역과 서로 다른 분리 장소에서 분리한 레지오넬라 분리균주에 대한 혈청형, 유전형의 분포, 그리고 국내 레지오넬라 질환 발생과 관련된 혈청형과 유전형을 지속적으로 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 서울지역 대중목욕탕, 사우나, 찜질방 등의 다중이용목욕시설에서 분리되는 *L. pneumophila*에 대한 노출이 증가하고 있는 시점에서 환경뿐만 아니라 사람에서 분리한 *L. pneumophila*를 함께 연구하고, 이들 분리균주에 대한 유전자 pattern 분석결과를 데이터베이스화하면, 레지오넬라증의 집단 발생 또는 산발적인 질병 발생이 있을 경우 분자역학적인 도구로서 이용할 것으로 생각된다. 또한 감염원과 감염경로의 파악 및 대책수립에 유용한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 Years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15:506-26.
- Nintasen R, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Bhumiratana A, Suzuki Y, Suthienkul O. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene-specific nested polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 2007;51:777-85.
- Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 2005;49:1027-33.
- Cooper IR, White J, Mahenthalingam E, Hanlon GW. Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the *mip* gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. J Hosp Infect 2008;70:154-9.
- Köhler R, Fanghänel J, König B, Lüneberg E, Frosch M, Rahfeld JU, et al. Biochemical and functional analyses of the *mip* protein: Influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 2003;71:4389-97.
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. J Infect Dis 1990;162:121-6.
- 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.
- Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. Semin Respir Infect 1998;13:90-9.
- Hsu BM, Chen CH, Wan MT, Cheng HW. *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. Water Res 2006; 40:3267-73.
- Kim SH, Kim MJ, Kee HY, Kim TS, Seo JJ, Kim ES, et al. Surveillance of *Legionella* contamination on water supply systems of public utilizing facilities in Gwangju, Korea. J Bacteriol Virol 2010;40:19-28.
- Whang KH, Hwang YO, Kim EJ, Jung JH, Cho NJ. Distribution and serological characteristics of *Legionella* spp. isolated from cooling tower waters of public establishments in Seoul. Kor J Env Hlth Soc 1999;25:20-3.
- Kim JA, Jung JH, Kim SJ, Jin YH, Oh YH, Han GY. Molecular epidemiological relationship of the pathogenicity of *Legionella* spp. isolated from water systems in Seoul. Kor J Microbiol 2009;45:126-32.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33: 2233-9.
- Kim KY, Kim YS, Song JC, Lee SJ, Kim SU, Choi TY, et al. Comparison of method for identification and the effects on *Legionella pneumophila* of the cooling towers in Seoul. J Korean Occup Environ 2003;13:234-52.
- Park EH, Kim MH, Kim JA, Han NS, Lee JH, Min SG, et al. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolated in Busan, using PFGE. J Life Sci 2005;15:161-8.