

## An Epidemiological Survey on Serological Diagnosis of *Legionella* Infection in Seoul, Korea

Yong-Tae Yoon\*, Chang-Ho Han, Sung-Sun Choi, Jung-Mi Lee,  
Chang-Kyu Kim and Sung-Min Choi

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

Serological investigation of antibodies to *Legionella* species in 1,802 sera collected in Seoul was conducted with indirect fluorescent antibody assay (IFA). With an antibody titer of  $\geq 1:128$  to be positive, 17 (0.9%) of these sera were positive and 6 (35.3%) of positive sera showed cross-reactions between *Legionella* species. The number of sera with antibody titers of  $\geq 1:128$  to *L. pneumophila* serogroup 1, *L. pneumophila* serogroup 4, *L. pneumophila* serogroup 5, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. anisa* were 6 (35.3%), 3 (17.6%), 3 (17.6%), 2 (11.8%), 1 (5.9%), 2 (11.8%) respectively. Among 17 positive sera, 10 (58.8%) sera were from male and 7 (41.2%) from female. An average age of them was 68.9 ( $\pm 15.3$ ; 27~89). Except for one serum, 16 (94.1%) of positive sera were from those older than 50 years old. The result suggests that the aged over 50 years old should be more careful of *Legionella* infection.

**Key Words:** *Legionella* species, Indirect fluorescent antibody assay (IFA)

### 서론

레지오넬라균은 1976년 필라델피아 한 호텔에서 56회 미국재향군인회 참석자들 중에서 182명의 폐렴환자와 29명의 사망자를 발생시킨 유행성 폐렴의 원인균으로 처음 알려졌고, 1977년 1월에 세균을 분리하여 *Legionella pneumophila*라 명명하였다. 그 이후 후향적인 연구로 1947년 군인에게서 발생한 원인불명의 질환도 레지오넬라균에 의한 것임이 밝혀졌다 (1~8). 미국과 유럽에서 발생하는 지역사회 획득폐렴(community acquired pneumonia, CAP)의 2~9%, 원내폐렴(hospital-acquired pneumonia, HAP)의 20~50%를 차지할 정도로 중요한 원인균이며 국내에서는 1984년 레지오넬라 감염증의 일종인 폰티악열의 집단 발병이 처음 보고되었다 (9).

레지오넬라균은 강, 호수 등에서 서식하는 그람음성,

통성혐기성 세균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 있다. 인공수계시설이나 호수 등 환경 중의 아메바나 폐에 있는 대식세포 등의 진핵세포를 감염시키고 그 세포 내에서 생존하고 액포에서 증식하여 궁극적으로 숙주세포를 사멸시키고 인근 식세포를 재감염시킨다 (3, 10~15). 식세포 내에서 증식하는 능력과 관련 있는 유전자는 *L. pneumophila*의 *mip* (macrophage infectivity potentiator)이며 초기에 macrophage 내 감염을 효과적으로 일으키는 역할을 한다 (5, 13).

레지오넬라 감염은 레지오넬라증(Legionnaires' disease, LD)과 폰티악열(Pontiac fever, PF)의 두 가지 형태로 일어난다. 레지오넬라증은 폐에 구멍이 나는 심각한 폐렴증상을 보이며 2~10일까지 배양기간이 길며 감염율이 0.1~5%이다. 인플루엔자와 비슷한 좀 더 순한 형태인 폰티악열형은 배양기간이 30~90시간(평균 36시간) 정도로 짧으며 90% 이상의 높은 감염율을 보인다 (16, 17). 레지오

Received: March 8, 2013/ Revised: April 5, 2013/ Accepted: May 6, 2013

\*Corresponding author: Yong-Tae Yoon. Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon-si, Gyeonggi-do, 427-070, Korea.

Phone: +82-2-570-3454, Fax: +82-2-570-3456, e-mail: ytytyoon@seoul.go.kr

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

넬라 감염은 레지오넬라균(*Legionella* species)을 포함하는 에어로졸을 흡입함으로써 이루어지며 알코올중독자, 흡연자, 노약자 등에 치명적이고 특히 장기이식수술환자 등 면역억제치료를 받는 환자에게는 non-*Legionella pneumophila*도 심한 감염을 일으킬 수 있으며, 사람에서 사람으로의 감염은 일어나지 않고 사람만이 유일한 자연 숙주로 알려져 있다 (7, 13, 18).

진단방법으로 균배양 검사, 혈청학적 진단, 항원검출, 유전자 검사 등이 있다 (19). 균배양 검사는 100%의 특이도를 가지는 gold standard이지만 배양하기에 까다롭고 분리하는데 시간이 3~7일 필요하므로 전통적으로 혈청학적 진단이 사용되고 있다. 하지만 혈청학적 진단은 오로지 후향적 분석만 가능하고 민감도가 떨어지고 교차반응이 일어나는 단점이 있다 (20, 21). 유전자 검사는 소량의 레지오넬라 유전자도 짧은 시간에 증폭할 수 있고 특히 하부호흡기 분비물에서 민감도가 높다는 장점이 있으나 위양성 등의 문제가 있다 (4). Maiwald 등 (19)은 어떠한 방법도 민감도와 특이도를 모두 충족시키지 못하므로 여러 분석방법을 병행할 것을 권장하고 있다.

본 연구에서는 검사 의뢰된 혈청을 간접면역형광항체법(indirect fluorescent antibody assay, IFA)으로 양성을 확인한 후, PCR에 의한 유전자 검사를 실시하여 레지오넬라 감염 확인을 위한 실험실 진단 기초 자료를 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 혈청

2011년과 2012년에 서울지역 병원에서 레지오넬라 항체가 검사 의뢰된 혈청 1,802건에 대해 간접면역형광항체법을 실시하였다.

### 레지오넬라 균주

*L. pneumophila* serogroup (sg) 1 (ATCC 33152), *L. pneumophila* sg 2 (ATCC 33154), *L. pneumophila* sg 3 (ATCC 33155), *L. pneumophila* sg 4 (ATCC 33156), *L. pneumophila* sg 5 (ATCC 33216), *L. pneumophila* sg 6 (ATCC 33215), *L. bozemanii* (ATCC 33217), *L. gormannii* (ATCC 33297), *L. micdadei* (ATCC 33218), *L. longbeachae* sg 1 (ATCC 33462), *L. feeleyi* sg 2 (ATCC 33849), *L. dumoffii* (ATCC 33279), *L. busanensis* (BAA-518), *L. anisa* (isolate).

**Table 1.** Primers used in this study

Pimer	Sequence (5'→3')	Product size
16rRNA	F: AGGGTTGATAGCTTAAGAGG	386 bp
	R: CAACAGCTAGTTGACATGG	
mip	F: GGTGACTGCGGCTGTTATGG	630 bp
	R: GGCCAATAGGTCCGCCAACG	

### Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 유전자 검출

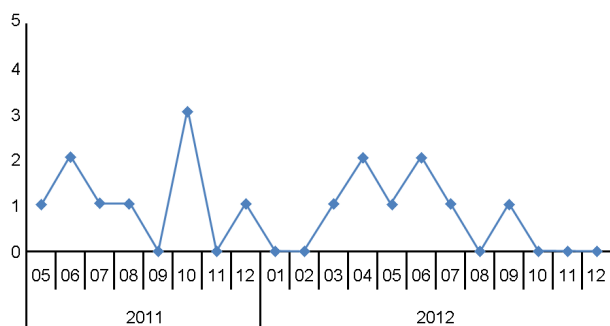
검출대상 유전자로는 모든 레지오넬라균에 특이도를 보이는 16S rRNA 유전자와 *L. pneumophila*에만 특이도를 보이는 mip 유전자에 대한 PCR를 실시하였다 (4, 19). 가열법으로 추출한 DNA를 GeNeT Bio premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 97℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 40초를 30회 반복하고 최종 72℃에서 5분간 증폭시킨 후 이 PCR 산물을 1.5% agarose gel을 이용하여 25분간 전기영동한 후 16S rRNA 및 mip 유전자의 증폭유무를 확인하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같다.

### Indirect fluorescent antibody assay (IFA)

혈청을 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6)로 1:32부터 1:256로 2배 단계 희석하였다. 불활화 시킨 14개의 서로 다른 레지오넬라균 항원이 고정된 슬라이드의 각 well에 2 µl씩 희석한 혈청을 떨어뜨린 후, moist chamber에 넣고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이때 양성 대조구는 키트에서 제공한 토끼 항혈청을 사용하였다. 멸균 PBS (pH 7.6)로 3회 세척하여 항원에 부착되지 않은 잔여혈청을 제거하고 공기 중에서 살짝 건조시켰다. 멸균 PBS (pH 7.6)을 이용하여 1:400으로 희석된 goat FITC-conjugate anti-human IgGMA (Cappel, #55156)를 각 well당 2 µl씩 떨어뜨린 후, moist chamber에 넣고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 양성대조구인 토끼 항혈청에는 1:400으로 희석된 FITC-conjugate anti-rabbit IgG (Cappel, #55646)를 사용하였다. PBS (pH 7.6)로 슬라이드를 2회 세척, 멸균 증류수로 1회 세척하여 부착되지 않은 잔여 conjugate를 제거하고 공기 중에서 살짝 건조시켰다. FA mounting fluid (pH 9.0)을 well에 떨어뜨리고 cover glass를 덮었다. 현미경(Zeiss HBO100, German)으로 ×400 하에서 검경하여 1:128 이상에서 end point 2+ 이상일 경우(전체적으로 일정하나 희미하게 균이 염색된 경우, 균체수가 50% 보일

**Table 2.** Number of serums used in this study by sex and age

Age	0~9	10~19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	80~89	90~99	Total
Male	2	35	63	88	73	162	211	250	93	11	988
Female	0	36	79	99	81	150	138	139	82	10	814
Total	2	71	142	187	154	312	349	389	175	21	1,802

**Figure 1.** Number of indirect fluorescent antibody assay positive sera by month.

때) 양성으로 판독하였다. IgGMA에서 1:128 이상 양성으로 판정된 혈청의 경우에는 양성으로 판정된 해당항원, goat FITC-conjugate anti-human IgG (Cappel, #55144)와 goat FITC-conjugate anti-human IgM (Cappel, #55153)을 이용하여 IgG와 IgM에 대한 항체가 측정을 추가적으로 실시하였다. 법정감염병 진단기준에서는 병원성 레지오넬라균 (*Legionella* species) 감염에 의한 급성 호흡기질환 환자에서 간접형광항체법을 이용하여 레지오넬라균에 대한 항체가 급성기와 회복기 혈청에서 4배 이상 증가로 정의하고 있다 (22).

## 결과 및 고찰

2011년 5월부터 2012년 12월까지 의뢰된 혈청은 남성이 54.8%(988건), 여성이 45.2%(814건)으로 남성의 비율이 높았으며 6~99세의 연령분포를 보였다. 간접면역형광항체가 검사한 1,802건의 성별, 연령별 분포는 Table 2와 같으며 50대 이상이 전체의 69.1%(1,246건)를 차지하였다.

항체가 1:128 이상 양성으로 판정된 혈청은 0.9% (17건)으로 Ngeow 등 (21)이 보고한 지역사회감염 중 *L. pneumophila*의 감염율 2.5%보다 낮았다. 2011년과 2012년

의 월별 발생현황을 보면 월별 특이성은 보이지 않으나 2012년 1월, 2월, 11월, 12월에 양성발생이 없어 겨울철에는 줄어드는 양상을 보이고 있다(Fig. 1).

양성혈청은 연령별로 70대 이상이 6건(35.3%)로 가장 높았으며 평균 연령은 68.9세( $\pm 15.3$ ; 범위 27~89)였다. 성별은 남성 58.8%(10건), 여성 41.2%(7건)으로 남성의 비율이 높았다. 이것은 Lyu 등 (9)이 보고한 레지오넬라 폐렴구균의 대상환자군 특성의 남성비율 82.1%보다는 낮았지만 Song 등 (8)이 보고한 *L. pneumophila* sg 1 감염 환자 중 남성의 비율 53.7%보다는 조금 높은 수치이다 (Table 3). Ngeow 등 (21)에 의하면 비정형 폐렴이 기저질환과 고령층에서 특히 심각한 증상을 보인다고 하였고 본 연구에서도 20대 1건을 제외한 16건(94.1%)이 모두 50대 이상에서 발생하고 있으므로 고연령층은 레지오넬라 감염에 대한 세심한 주의가 필요하다고 생각한다.

항체가 1:128 이상인 레지오넬라균 분포는 *L. pneumophila* serogroup 1이 6건(35.3%), *L. pneumophila* serogroup 4가 3건(17.6%), *L. pneumophila* serogroup 5는 3건(17.6%), *L. bozemanii* 2건(11.8%), *L. micdadei* 1건(5.9%), *L. anisa* 2건(11.8%)으로 *L. pneumophila*가 12건(70.6%)를 차지하여 Fields 등 (23)이 보고한 레지오넬라 감염의 90%가 *L. pneumophila*에 의한다는 결과보다는 낮았다. 하지만 Fields 등 (23)은 이 보고에서 *L. pneumophila*의 감염율이 높게 나타난 것은 non-*L. pneumophila*에 대한 분석기술의 부족에 기인할 수도 있다고 하였다. Ngeow 등 (21)과 Ditommaso 등 (24)은 간접면역형광항체가 검사 시 교차반응이 일어날 수 있다고 보고하였으며, 본 연구에서는 17건의 양성혈청 중 두 개의 항원에 교차반응을 보인 경우는 *L. micdadei*와 *L. busanensis*, *L. bozemanii*와 *L. anisa*, *L. pneumophila* sg 5와 *L. anisa*, *L. pneumophila* sg 5와 *L. busanensis*, *L. pneumophila* sg 4와 *L. pneumophila* sg 5의 5건이고 세 개의 항원에 교차반응을 보인 경우는 *L. pneumophila* sg 1와 *L. pneumophila* sg 4와 *L. feeleei* sg 2의 1건 등 총 6건(35.3%)의 혈청에서 중간 또는 serogroup간

**Table 3.** Sera of indirect fluorescent antibody assay antibody titers  $\geq 1:128$  in response to *Legionella* species

Age	Sex	Number	Species	Antibody titers
20~29	Female	1	<i>L. bozemanii</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. anisa</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
50~59	Male	1	<i>L. pneumophila</i> sg 1	IgG 1:128, IgM 1:64
	Female	1	<i>L. pneumophila</i> sg 4	IgG 1:128, IgM <1:32
		2	<i>L. pneumophila</i> sg 5	IgG 1:128, IgM <1:32
		3	<i>L. pneumophila</i> sg 1	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. pneumophila</i> sg 4	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. feeleyi</i> sg 2	IgG 1:128, IgM <1:32
60~69	Male	1	<i>L. pneumophila</i> sg 1	IgG 1:128, IgM <1:32
	Female	1	<i>L. pneumophila</i> sg 5	IgG 1:128, IgM <1:32
70~79	Male	1	<i>L. pneumophila</i> sg 1	IgG 1:128, IgM <1:32
		2	<i>L. pneumophila</i> sg 4	IgG 1:128, IgM <1:32
		3	<i>L. pneumophila</i> sg 4	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. pneumophila</i> sg 5	IgG 1:128, IgM <1:32
		4	<i>L. bozemanii</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
		5	<i>L. longbeachae</i> sg 1	IgG 1:128, IgM <1:32
		6	<i>L. anisa</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
80~89	Male	1	<i>L. micdadei</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
		2	<i>L. busanenesis</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. pneumophila</i> sg 5	IgG 1:128, IgM <1:32
	Female	1	<i>L. anisa</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
		1	<i>L. longbeachae</i> sg 1	IgG 1:128, IgM <1:32
		2	<i>L. pneumophila</i> sg 5	IgG 1:128, IgM <1:32
			<i>L. busanenesis</i>	IgG 1:128, IgM <1:32
Total		17		

교차반응을 보였다.

간접면역형광항체가 시험결과 항체가 1:128인 17개 혈청에 대해 PCR를 실시하여 16rRNA 및 *mip* 유전자의 증폭유무를 확인결과 양성대조에서는 16rRNA 및 *mip* 유전자가 증폭되었으나 양성혈청에서는 16rRNA 및 *mip* 유전자를 확인할 수 없었다. 이는 PCR의 민감도가 혈청의 유전자를 감지할 정도에 미치지 못하거나, 현증감염 확인을 위한 급성기와 회복기 혈청의 항체가를 검사하지 못하였기 때문일 수 있다. 레지오넬라균에 대한 급성기와 회복기 혈청에서 항체가 4배 이상의 상승을 확인할 필요가 있으며 민감도가 개선된 실험실 진단방법도 고려해 볼

필요가 있다고 생각한다.

이 연구의 제한점은 서울지역에 국한되었다는 점과 기저질환, 장기이식, 병원입원, 여행, 사우나 등에 대한 자료 없이 성별, 나이만으로 분석이 이루어졌고 단일항체가 검사라는 점이다. 따라서 정확한 진단을 위해서는 급성기, 회복기 혈청의 의뢰와 검사가 필요하며 시공간적 요소를 고려한 실험실 진단과 평가도 필요하다.

## 참 고 문 헌

- 1) Simmons G, Jury S, Thornley C, Harte D, Mohiuddin J, Taylor

- M. A legionnaires' disease outbreak: A water blaster and roof-collected rainwater systems. *Water Res* 2008;42:1449-58.
- 2) Ricci ML, Fontana S, Bella A, Gaggioli A, Cascella R, Cassone A, *et al.* a preliminary assessment of the occupational risk of acquiring legionnaire's disease for people working in telephone manholes, a new workplace environment for *Legionella* growth. *Am J Infect Control* 2010;38:540-5.
  - 3) Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Harb OS. Stone invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*. *Bull Inst Pasteur* 1998;96:237-47.
  - 4) Diederer BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* 2008;56:1-12.
  - 5) Ozerol IH, Bayraktar M, Cizmeci Z, Durmaz R, Akbas E, Yildirim Z, *et al.* Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in turkey. *J Hosp Infect* 2006;62:50-7.
  - 6) Declerck P, Behets J, Margineanu A, van Hoef V, De Keersmaecker B, Ollevier F. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res* 2009;164:593-603.
  - 7) Lee HK, Woo MK, Ju YI, Baek SJ, Song HJ, Choi JS, *et al.* Prevalence of antibodies in response to *Legionella* species, analysis of a healthy population from Jeollanam-do province, Korea. *J Microbiol* 2008; 46:160-4.
  - 8) Song HS, Suh JH, Ahn JH, Yoon BI, Lee SJ, Lee MG, *et al.* The etiological role of *Legionella pneumophila* in patients with community-acquired pneumonia in Korea. *Tuberc Respir Dis* 2001;50:409-14.
  - 9) Lyu JW, Song JW, Choi CM, Oh YM, Lee SD, Kim WS, *et al.* Comparative study of pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila*. *Tuberc Respir Dis* 2010;68:74-9.
  - 10) Verdon J, Berjeaud JM, Lacombe C, Héchard Y. Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* 2008;29: 978-84.
  - 11) Triassi M, Di Popolo A, Ribera D'Alcalà G, Albanese Z, Cuccurullo S, Montegrosso S, *et al.* Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. *J Hosp Infect* 2006; 62:494-501.
  - 12) Lück PC, Freier T, Steudel C, Knirel YA, Lüneberg E, Zähringer U, *et al.* A point mutation in the active site of *Legionella pneumophila* O-acetyltransferase results in modified lipopolysaccharide but does not influence virulence. *Int J Med Microbiol* 2001;291:345-52.
  - 13) Jeon SJ, Jung JH, Jin YH, Lee JK, Oh YH, Choi SM. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* isolated from bath facilities of public establishments in Seoul. *J Bacteriol Virol* 2011;41:295-300.
  - 14) Morozova I, Qu X, Shi S, Asamani G, Greenberg JE, Shuman HA, *et al.* Comparative sequence analysis of the icm/dot genes in *Legionella*. *Plasmid* 2004;51:127-47.
  - 15) Cianciotto NP. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 2001;291:331-43.
  - 16) Di Stefano F, Verna N, Di Gioacchino M. Cavirary *Legionella pneumonia* in a patient with immunodeficiency due to hyper-IgE syndrome. *J Infect* 2007;54:121-3.
  - 17) Remen T, Mathieu L, Hautemaniere A, Deloge-Abarkan M, Hartemann P, Zmirou-Navier D. Pontiac fever among retirement home nurses associated with airborne *Legionella*. *J Hosp Infect* 2011;78:269-73.
  - 18) Schoen ME, Ashbolt NJ. An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water Res* 2011;45:5826-36.
  - 19) Maiwald M, Helbig JH, Luck PC. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *J Microbiol Methods* 1998; 33:59-79.
  - 20) Welti M, Jatón K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:85-95.
  - 21) Ngeow YF, Suwanjutha S, Chantarojanasriri T, Wang F, Sanieel M, Alejandria M, *et al.* An asian study on the prevalence of atypical respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Int J Infect Dis* 2005;9:144-53.
  - 22) Korea Ministry of Health & Welfare. Case Definitions for National Notifiable Infectious Diseases. Seoul: KMW Notification No. 2010-136, 2010.
  - 23) Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:506-26.
  - 24) Ditommaso S, Giacomuzzi M, Gentile M, Zotti CM. Antibody detection and cross-reactivity among species and serogroups of *Legionella* by indirect immunofluorescence test. *J Microbiol Methods* 2008;75:350-3.