

삼차 의료기관에서 발생한 레지오넬라 폐렴 유행의 분자역학적 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리과*, 고려대학교 부설 생명과학연구소†
고려대학교 부속병원 감염관리실†

손장욱 · 정희진 · 우흥정 · 김우주 · 김민자 · 유세화 · 박승철 · 이도현* · 이창규* · 한수이† · 진희정†

A Molecular Epidemiological Study on a Cluster of *Legionella* Pneumonia Occurred in a Tertiary-Care Hospital

Jang Wook Sohn, M.D., Hee Jin Cheong, M.D., Heung Jeong Woo, M.D., Woo Joo Kim, M.D.,
Min Ja Kim, M.D., Se Hwa You, M.D., Seung Chull Park, M.D., Do Hyun Lee*,
Chang Kyu Lee, M.D.*, Su Iee Han† and Hee Chung Jin†

Department of Internal Medicine, and Department of Clinical Pathology*, College of Medicine,
Institute of Life Science†, Korea University, Infection Control Unit†, Korea University Hospital, Seoul, Korea

Background : Because of the ubiquity of *Legionella* species in aquatic environments, molecular epidemiological analysis of *Legionella* isolates is important in investigation for source of infection and subsequent control of nosocomial legionellosis. In association with an unusual cluster of nosocomial pneumonia with *Legionella* in a tertiary-care hospital, we performed an environmental surveillance with molecular epidemiological study of *Legionella* isolates.

Methods : We randomly collected 20 samples of environmental and portable water from the hospital where three cases of *Legionella* pneumonia occurred consecutively during the period of 5 months. We detected *Legionella* from the samples by using both culture and polymerase chain reaction(PCR), and analyzed *Legionella* isolates from patients and environmental samples together with 12 reference strains by ribotyping using *Hpa* I and *Eco*RI.

Results : *Legionella* was isolated from 3 out of 20(15%) samples by culture, and detected in 9 of 20(45%) by PCR. Ribotyping analysis showed that 2 patients' and 2 environmental isolates from a faucet of the patient's room and an air handling unit shared the same pattern which was also identical to that of *Legionella pneumophila* serogroup 6, a reference strain.

Conclusion : The study showed that the hospital environments were contaminated with at least 2 *Legionella* species including *L. pneumophila* serogroup 6, and indicated that an unusual cluster of *Legionella pneumonia* occurred in the hospital was possibly linked to the contamination of a faucet with *L. pneumophila* serogroup 6.

Key Words : *Legionella*, Ribotyping, Nosocomial pneumonia

서 론

다양한 환경수에 존재하는 *Legionella* 군중에 의한 감염은 전세계적으로 수 차례의 집단 발생이 기록되어 있으며, 북미와 유럽의 보고들에 의하면 산발적으로 발생하는 지역사회

폐렴의 2~15%를 차지하고 있다¹⁾. 또한 *Legionella* 군중에 의한 원내 폐렴은 병원의 환경수가 오염되어 있는 경우 전체 원내 폐렴의 10~50%까지 레지오넬라군에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다²⁾. 레지오넬라군에 의한 원내 폐렴의 유행 양상은 1980년대에는 대부분 3차 의료기관에서 돌발적인 집단 발생의 형태로 보고되었으나, 최근 수년간의 보고는 환경수가 오염되어 있는 병원에서 주로 산발적으로 발생하는 양상을 보이고 있다.

원내 레지오넬라 폐렴은 주로 노인, 만성 폐질환자, 장기

접수: 1998년 5월 4일, 승인: 1998년 5월 30일
교신저자: 김민자, 고려대학교 안암병원 감염내과
Tel: (02)920-5259, Fax: (02)920-5616
E-mail: macropha@chollian.net

이식환자, 스테로이드 등의 면역억제 요법을 받는 환자들이 주로 이환되며 조기 진단 및 적절한 치료가 이루어지지 못할 경우 급격히 진행하여 50%이상의 사망률을 보일 수 있다^{1, 3)}. 이들의 흔한 감염원으로는 원내 급수 시스템이나 냉각탑 수 또는 에어컨디셔너 시스템과 같은 냉방조절장치 등이며, 원인균의 대부분은 *Legionella pneumophila*이다^{1, 2, 7)}. *Legionella*에는 여러 종류의 군종과 혈청형들이 존재하므로 레지오넬라균에 의한 원내 폐렴의 역학조사에서 원내 환경수와 환자발생과의 역학적 연계성을 규명하기 위해서는 환경분리 군주와 환자 분리군주 간의 다양한 표현형과 분자형별의 분석이 요구되며, WHO는 레지오넬라증의 원인균의 역학적 연계성을 평가하는데 DNA fingerprinting 기법을 사용하는 것을 권장하고 있다⁴⁾.

한편, 국내에서 1984년 한 종합병원에서 레지오넬라 감염증의 하나인 폰티악 열의 집단 발생이 보고된 이후 현재까지 소수의 레지오넬라 원내감염 발생 예들만이 산발적으로 보고되고 있을뿐^{5, 8-10)}, 아직까지 국내의 병원들에서 레지오넬라 폐렴의 검사실적 진단방법이 아직까지 보편화되어 있지 않은 실정이며, 또한 임상 검체나 또는 환경에서 분리된 레지오넬라 군주들에 대한 분자형별의 분석이 연구된 바 없다.

본 연구의 목적은 5개월 동안 연속적으로 3명의 레지오넬라 원내 폐렴 환자가 발생한 삼차 의료기관에서 배양 검사 및 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 레지오넬라 오염에 대한 병원환경의 감시조사를 실시하고, 또한 환자에서 분리된 군주와 병원환경에서 분리된 군주에 대해 ribotyping을 실시하여 분리 군주들간의 역학적 연계성을 조사함으로써 레지오넬라 폐렴의 유행적 발생의 감염원 또는 전파경로를 규명하고 원내 레지오넬라 폐렴의 발생의 대책수립에 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 원내 레지오넬라 폐렴의 유행적 발생

약 600병상의 3차 의료기관에서 1995년 5월, 8월, 10월에 3명의 레지오넬라 원내 폐렴 환자가 연속적으로 발생하였다. 첫 번째 환자는 여자 17세로 전신성 홍반성 낭창으로 매일 사이클로포스파마이드 충격 요법 및 프레드니솔론 0.4 mg/kg으로 유지 치료받던 환자로 사이클로포스파마이드 충격요법 후 입원 21일째 폐렴이 발생하였다. 두 번째 환자는 여자 45세로 입원하여 급성 백혈병으로 진단받고 항암화학요법을 시행 받은 후 폐렴이 발생하였고, 세 번째 환자는 여자 47세로 전신성 홍반성 낭창으로 진단 받고 경구 프레드니솔론 0.9

mg/kg으로 유지 치료하고 퇴원한 후 5일째 확인된 폐렴환자였다. 첫 번째와 세 번째 환자는 모두 경피적 폐흡인술로 얻은 검체로부터 레지오넬라균이 분리되었고⁵⁾, 두 번째 환자로 부터는 균이 분리되지 않았으나 레지오넬라 간접면역항체검사에서 추적 혈청의 항체가가 1:128 이상으로 증가되어 진단하였던 예이다. 두 분리군주는 모두 *L. pneumophila* serogroup 1~6 polyvalent antisera(SciMedX, Denville, NJ)에 대한 응집검사에서 양성반응을 보였다.

2. 레지오넬라 배양을 위한 병원 환경의 감시조사

환자 병실의 수도꼭지, 라디에터, 가습기, 공조기, 냉각탑, 에어컨 등을 포함한 병원내의 20 곳을 임의로 선정하여 환경수 또는 운반수(portable water)에서 검체를 채취하였다. 수도꼭지는 소독된 면봉이나 칼 등을 사용하여 검체를 얻었고, 공조기(air handling unit), 라디에터, 에어컨 등은 그 안의 응결수를 채취하였으며, 냉각탑 수는 100 ml를 채취하였다. 각 환경 검체를 0.4 μ m의 여과지를 통과시킨 후 여과물을 1~2 ml의 생리식염수에 부유시켰다. 부유액의 0.5 ml를 취하여 4.5 ml의 0.2M KCl-HCl 용액(pH 2.2)을 가하고 vortex mixer로 균일하게 섞고 실온에서 5분간 방치 후, 0.1 ml를 취하여 α -ketoglutarate를 포함한 buffered charcoal extract(BCYE- α) 배지와 cyclohexamide, polymyxin B, cefamandole, vancomycin이 함유된 BCYE- α 선택배지에 각각 접종한 후 CO₂ incubator를 사용하여 37°C에서 3~5일 동안 배양하였다⁶⁾. 나머지 검체중 1 ml를 eppendorf tube로 옮긴 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전된 50 μ l만을 취하여 PCR 검사에 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

3. 환경 검체의 PCR 및 Southern hybridization

1) PCR

Template 준비를 위해, 채취된 50 μ l의 침전물에 50 μ l의 Tris-HCl(pH 8.0)을 가해 전체 용량이 100 μ l가 되게 한 후 lysozyme(100 mg/ml) 2 μ l를 가하고 강하게 섞은 뒤 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 2 μ l의 proteinase K(20 mg/ml)를 함유한 K-buffer[100 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0), 1% Tween 20(wt/vol)] 100 μ l를 가하여 55°C에서 2시간 반응시켰고 이어 proteinase K를 비활성화시키기 위하여 95°C에서 10분간 가열하였다. PCR에 사용하기 직전에 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 뒤 상층액 30 μ l를 취해 template로 사용하였다.

Primer는 모든 레지오넬라 군종에 공통적으로 존재하는 5S-rRNA coding gene으로부터 디자인한 primer 5R-1(5'

TCT-TGG-CGA-CTA-TAG-CGA-TTT 3')과 primer 5R-2(5' ATC-CTG- GCG -ATG-ACC-TAC-TTT 3')를 사용하였다.

Template DNA에 5 μ l의 10 \times PCR buffer, 1 μ l의 10 mM dNTP, 20 μ M primer 각각 1 μ l, 0.5 U의 Tag polymerase (Boehringer Mannheim)와 적당량의 증류수를 가하여 전체를 50 μ l로 만든 후 DNA Thermal cycler(Bio-Rad, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응조건은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension으로 30회 반복 시행하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension하였다. 반응액 10 μ l를 취하여 2% synergel(Diversified Biotech, USA)에서 100V로 1시간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 118 bp의 증폭산물을 관찰하였으며 UV하에서 polaroid 667 film으로 촬영하였다.

PCR 실험에서 검체간의 오염을 최소화하기 위하여 검체의 조작과 증합효소연쇄반응을 위한 시약준비는 각각 분리된 방에서 시행하였고 각 반응 시마다 음성 대조 생리식염수 검체를 같이 반응 시켰으며 별도의 pipetter와 filtered tip을 사용하여 검체간 또는 실험기구로부터의 오염을 방지하였다.

2) Southern hybridization

PCR 증폭산물의 특이성을 확인하기 위하여 Southern hybridization을 시행하였다¹¹⁾. 즉, 전기영동 종료 후 agarose gel을 depurination, denaturation, neutralization처리하고, vacuum transfer를 이용하여 Hybond-N membrane(Amersham)으로 DNA를 전이시킨 후 membrane을 건조시키고 UV cross-linker(Spectronics, USA)에서 3분간 crosslink하였다. Membrane을 hybridization bottle에 넣고 hybridization buffer[5 \times SSC, 1% blocking reagent, 0.1%(wt/vol) N-laurylsarcosine, 0.02% SDS]를 가하여 hybridization oven(Hybaid, UK)에서 68 $^{\circ}$ C, 1시간동안 prehybridization하고 probe DNA가 함유된 새 hybridization buffer로 바꾸어 넣은 다음, 68 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응하였다. Probe는 표준균주 *L. pneumophila* serogroup 1의 chromosomal DNA를 template로 하여 상기한 방법으로 PCR을 시행하여 118 bp의 증폭산물을 얻고 100% 에탄올로 침전 정제한 후 digoxigenin labelling kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 제조회사의 지시대로 제작하였으며 hybridization buffer에 가하기 직전에 10분간 끓여서 변성시켰다. Hybridization 종료 후 membrane을 꺼내어 2 \times SSC, 0.1% SDS 용액에 68 $^{\circ}$ C에서 15분씩 2회 세척하고 공기 중에서 건조시킨 다음 DIG DNA detection kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 digoxigenin-labelled probe와 결합된 DNA band를 검출하였다. 즉, membrane을 buffer-1(0.1 M

maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)으로 1분간 씻은 후 buffer-2(1% blocking reagent in buffer-1) 150 ml에 30분간 방치한 다음, buffer-1로 가볍게 행구어 내고, antibody-conjugate solution(8 μ l antibody- conjugate in 40 ml buffer-1)에 30분간 반응시킨다. 150 ml의 buffer-1로 membrane을 15분간 두 번 씻어주고 buffer-3(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) 30 ml에 2분간 방치한 후 color-substrate solution(45 μ l NBT- solution and 35 μ l X-phosphate solution 10 ml buffer-3)에 반응시킨다. DNA band가 발색되면 100 ml의 buffer-4(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 씻은 후 말려서 보관한다.

4. 레지오넬라 균주의 ribotyping

대상균주는 원내 폐렴 환자로부터 분리된 *L. pneumophila* 두 균주와 병원 환경감시에서 분리된 3균주 그리고 국립보건원으로부터 분양받은 *L. pneumophila* serogroup 1, 3, 4, 5, 6 과 non-*L. pneumophila* group에 속하는 7개 균주를 포함한 12개의 레지오넬라 표준균주들을 ribotyping¹²⁻¹⁵⁾ 분석에 사용하였다(Table 1).

방법은 레지오넬라균을 BCYE- α 배지에서 48시간 배양한

Table 1. *Legionella* Strains Used in the Study

Strain	Species, Serogroup	Source
reference	<i>L. pneumophila</i>	
	serogroup 1	ATCC33152
	serogroup 3	ATCC33155
	serogroup 4	ATCC33156
	serogroup 5	ATCC33216
	serogroup 6	ATCC33125
	<i>L. anisa</i>	ATCC35292
	<i>L. dumoffi</i>	ATCC33279
	<i>L. sainthelens</i>	ATCC33248
	<i>L. gormanii</i>	ATCC33297
environmental isolates	<i>L. jordanis</i>	ATCC33623
	<i>L. micdadei</i>	ATCC33218
	<i>L. oakridgensis</i>	ATCC35761
	<i>L. pneumophila</i>	air handling unit in 3rd floor
	<i>L. pneumophila</i>	faucet in the intensive care unit
	<i>L. pneumophila</i>	faucet in 763 ward
clinical isolates	<i>L. pneumophila</i>	lung aspirate of SLE patient
	<i>L. pneumophila</i>	lung aspirate of SLE patient

후 균주의 집락을 채취하여 OD₅₅₀이 0.7이 되도록 현탁액을 만든 다음 이중 1.5 ml을 취하여 이미 기술된 방법대로 chromosomal DNA를 분리하였다¹⁶⁾. 약 1~3 μ g의 DNA를 취하여 10 U의 *Hpa*I과 *Eco*RI(Boehringer Mannheim)으로 각각 37°C에서 5시간 반응시킨 후 30V에서 18 시간 동안 전기영동 하였다. Riboprobe의 제작은 *Escherichia coli*의 16s-와 23s-ribosomal RNA와 역전사 효소를 사용하여 digoxigenin 표지된 DNA probe를 제작하여 사용하였다. 즉, 10 \times primer 2 μ l, 5 \times reaction buffer 4 μ l, rRNA(*E. coli* 16s- and 23s-rRNA, 4 μ g/ μ l) 0.25 μ l, DEPC-water 10.75 μ l의 혼합물을 68°C에서 5분간 가열한 후 실온으로 서서히 식혔다. 10 \times dNTP 2 μ l와 AMV-RT(25 U/ μ l) 1 μ l를 넣고 섞은 후 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 4 M LiCl 2 μ l와 cold ethanol 50 μ l를 넣은 후 13,000 \times g에서 15분간 원심분리하고 70% ethanol로 씻어준 후 pellet을 말려서 TE 20 μ l에 녹였다. Riboprobe는 사용직전 5분간 끓여 변성시켰으며, Southern hybridization은 위에서 이미 기술한 방법과 동일하게 시행하였고, DIG DNA detection kit를 사용하여 digoxigenin-labelled probe와 결합된 절편 양상을 관찰하였다.

결 과

1. 병원환경의 레지오넬라균의 오염도에 대한 조사

레지오넬라 원내폐렴이 발생한 병원의 환경 검체의 배양에서 20검체 중 3검체(15%)에서 레지오넬라균이 분리되었으며, PCR의 결과는 agarose gel 전기영동상에서 20검체중 9검체에

서 양성 반응을 보였다. 이 PCR 산물의 특이도를 보기 위해서 시행한 Southern hybridization의 결과 PCR에서 양성반응을 보인 8곳에서 모두 양성 소견을 보였으며, 양성 반응이 의심되는 한 band 역시 양성 반응을 보여 총 9개의 검체(45%)

Table 2. Detection of *Legionella* Species by Culture and PCR with Southern Hybridization in 20 Samples Collected from the Hospital Environments

Sample No.	Source	Culture	PCR	Southern hybridization
1	radiator of hemodialysis room	no growth	—	—
2	dialysate of hemodialysis room	no growth	—	—
3	faucet of 809 ward	no growth	+	+
4	air handling unit on 3rd floor	<i>Legionella</i>	+	+
5	faucet in hemodialysis room	no growth	—	—
6	faucet in emergency room	no growth	+	+
7	faucet in 8th floor	no growth	—	—
8	faucet in intensive care unit	<i>Legionella</i>	+	+
9	faucet in 917 ward	no growth	—	—
10	faucet in 955 ward	no growth	—	—
11	faucet in laboratory	no growth	—	—
12	faucet in 717 ward	no growth	—	—
13	portable water of intensive care unit	no growth	—	—
14	faucet in 8th floor	no growth	—	—
15	faucet in 819 ward	no growth	+	+
16	faucet in 763 ward	<i>Legionella</i>	+	+
17	evaporative condenser of intensive care unit	no growth	—	—
18	faucet in 858 ward	no growth	+	+
19	portable water of 819 ward	no growth	+	+
20	cooling tower	no growth	+	+

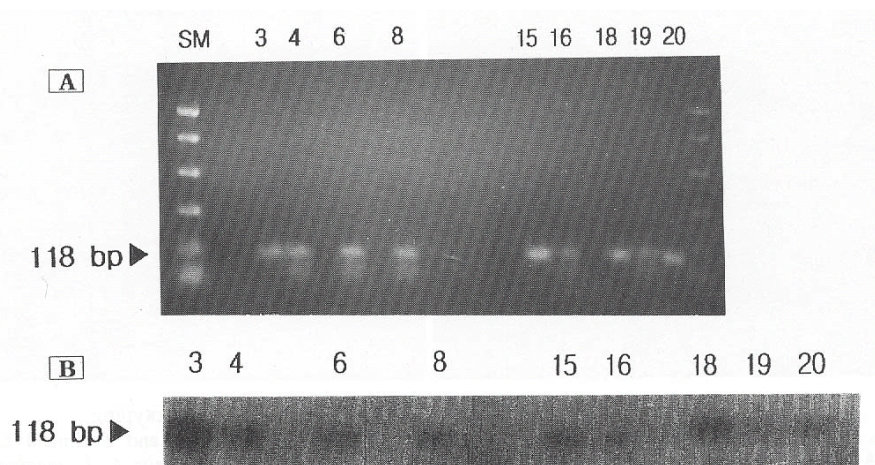


Figure 1. PCR detection of *Legionella* sp. in environmental water samples.
 A. 2% Synergel electrophoresis showing PCR products(arrow), SM: size marker.
 B. Southern analysis of PCR products(arrow) probed with riboprobe.

에서 양성이었다(Table 2, Figure 1). PCR에서 음성 반응을 보인 검체중 어느 것에서도 Southern hybridization의 결과 양성반응을 보인 것은 없어서 환경내에서 레지오넬라균 검출에 대한 PCR 검출법의 예민도와 특이도가 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

2. 환자 및 환경 분리균주들의 ribotyping 분석

원내 레지오넬라 폐렴환자에서 분리된 2균주 및 환경에서 분리된 3균주와 표준 균주 12주들의 ribotyping을 실시하여 분석한 결과에서 *Hpa*I으로 제한효소 처리된 ribotyping 양상은 환자 분리 2균주 모두와 환경 분리 3균주 중에서 3층 공조기와 환자가 있던 병실에서 각각 분리된 2균주는 모두 동일한 ribotype 양상을 보였고, 동시에 표준균주 *L. pneumophila* serogroup 6의 절편 양상과도 완전히 동일한 양상을 보임으로써 환자 분리 2균주와 환경분리 2균주는 *L. pneumophila* serogroup 6로 확인되었다. 다른 한 환경 분리균주는 중환자실 수도꼭지에서 분리된 것으로 환자 분리균주나 이 연구에서 분석한 표준균주 중 어느 것과도 같지 않은 ribotype을 보였다(Figure 2A). 또한 *Eco*RI 제한효소로 처리된 ribotyping 양상도 *Hpa*I으로 제한효소 처리된 ribotyping 양상과 같은 소견을 보였다(Figure 2B).

결론적으로 병원의 환경수는 *L. pneumophila* serogroup 6를 포함하여 적어도 2종류의 *Legionella*균에 의해 오염되어 있었고, 병원에서 발생한 레지오넬라 원내폐렴은 *L. pneumophila* serogroup 6에 의한 것이며, 환자 병실의 오염된 수도꼭지가 감염원으로 추정되었다.

고 찰

본 연구에서 조사된 레지오넬라 원내 폐렴의 유행은 3월에 불과하고 5 개월의 기간 동안에 산발적으로 발생하였으나, 모두 면역 기능이 현저히 저하된 환자이며 임상적으로 매우 중증의 폐렴 양상을 보임으로써 이에 대한 적극적인 원인 규명 과정에서 레지오넬라 원내 폐렴의 유행이 강하게 인지되었고 감염원의 규명과 조절대책을 마련하기 위해 역학조사를 실시하게 되었다.

레지오넬라증의 거의 85~90%는 *L. pneumophila*가 원인이며, 65~70%는 *L. pneumophila* serogroup 1에 의한다. *Legionella*는 적어도 41종(species)과 60가지 이상의 혈청군이 확인되고 있고, 일부 혈청형에는 여러 아형(subtype)이 있으며 특히 *L. pneumophila* serogroup 1 에는 적어도 50개의 아형이 존재하여 매우 이질적인 혈청군으로 알려져 있다¹⁷⁾. *L.*



A. *Hpa*I ribotyping

B. *Eco*RI ribotyping

Figure 2. Ribotyping analysis of 12 *Legionella* reference strains, 3 environmental and 2 clinical *Legionella* isolates. A and B. Lanes : 1, *L. anisa*; 2, *L. dumoffi*; 3, *L. gormanii*; 4, *L. jordanis*; 5, *L. micdadei*; 6, *L. oakridgensis*; 7, *L. saintelensis*; 8, *L. pneumophila* SG 1; 9, *L. pneumophila* SG 3; 10, *L. pneumophila* SG 4; 11, *L. pneumophila* SG 6; 12, *L. pneumophila* SG 5; 13, 14, 15, 3 environmental isolates; 16, 17, clinical isolates. Note that lanes 13, 15, 16, and 17 showed the identical patterns to that of *L. pneumophila* SG6, lane 11, as a reference strain in both *Hpa*I or *Eco*RI ribotyping.

pneumophila serogroup 1의 subserogroup의 구별에 있어서 7개의 monoclonal antibody panel을 이용하는 subtyping scheme이 널리 인정되고 레지오넬라증의 감염원의 규명에 이용되어왔으나^{17, 18)}, 이들 cell line의 일부가 계속 유지되지 못하여 더 이상 이용할 수 없는 실정이며 *Legionella*의 배양조건에 따라 monoclonal antibody 반응양상이 다르게 나타날 수 있다^{19, 20)}. 또한 *L. pneumophila* serogroup 1 이외의 혈청군의 아형들에 대한 monoclonal antibody들은 잘 확립되지 않았다. 그러므로 레지오넬라증 유행의 역학조사에서 환경분리 군주와 레지오넬라증 환자에서 분리된 군 사이의 연계를 확인하기 위해서는 혈청형의 구분만으로는 불충분하며 molecular subtyping을 이용한 접근 방법이 권장되고 있다.

*Legionella*에 대한 분자역학적 조사도구로서 DNA fingerprinting 분석을 근거로 하는 ribotyping, PFGE(pulsed-field gel electrophoresis), AP-PCR(arbitrarily primed-polymerase chain reaction), repetitive element PCR, random amplified fragment length polymorphism(AFLP) 등 여러 방법들이 제시되고 있으며^{12-15, 21)}, 각각 고가의 장비, 숙련된 기술, 소요시간, 오염 등의 면에 있어서 장단점을 지니고 있다. 본 연구에서 이용한 ribotyping 방법은 유행 군주와 역학적으로 관련이 없는 다른 군주와의 감별에는 다소 제한이 있을 수 있으나, 유행적 발생에서 분리된 *L. pneumophila*의 아형을 알아내어 역학적 조사를 하는 데는 유용한 것으로 알려져 있으며, 레지오넬라증의 여러 유행의 역학적 조사에서 그 유용성이 입증된 바 있다^{11, 12)}.

본 연구에서 환자 2명에서 분리된 군주는 ribotyping 결과에서 환자가 입원하였던 병실의 수도꼭지와 다른 층에 있는 공조기에서 각각 분리된 2 군주와 동일한 ribotype 임이 입증되었는데, 특히 병실에서 오염된 수도꼭지는 환자의 감염원으로 사료되었다. 이들에서 정확한 감염 경로는 알 수 없었으나 오염된 수도꼭지의 비말의 흡인이나 오염된 수도꼭지를 운반수로 사용함에 따라 감염되었을 것으로 추정할 수 있다. 이들 동일한 ribotype 절편양상을 보인 환자 및 환경분리 군주들은 또한 본 연구에서 조사한 12종류의 표준군주들 중에서 *L. pneumophila* serogroup 6와 동일한 양상을 보여 조사된 유행은 *L. pneumophila* serogroup 6에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 중환자실의 수도꼭지에서 분리된 나머지 한 주는 본 연구에서 사용된 표준군주들이나 다른 분리 군주들과는 다른 절편양상을 나타내므로써 유행이 발생된 병원 환경은 적어도 *L. pneumophila* serogroup 6를 포함하여 2 종류의 *L. pneumophila*에 의해 오염되어 있음을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 ribotyping에 의한 군주의 분별력을 향상시키기

위해 *Hpa*I과 *Eco*R I의 2 종류의 restriction enzyme을 사용하여 ribotyping을 시행하였는데 두 경우에 있어서 환자 및 환경 분리군주들의 각각의 ribotype들에 있어서 동일한 결과를 보여 주었다.

한편, Schoonmaker 등¹²⁾은 원내 레지오넬라증의 유행적 발생의 분자역학적 연구에서 분리된 *L. pneumophila* serogroup 6의 6주가 *sf*I 제한효소를 사용한 PFGE 분석에서 8가지 다른 PFGE양상으로 구분되는 반면, ribotyping에 의한 분석에서는 6군주가 3가지 절편양상으로 구분되므로써 ribotyping법에 비해 PFGE법이 더 군주의 판별력이 우수함을 보고하였다. 비록 본 연구에서 환자 및 환경분리에서 분리된 4 군주가 ribotyping에서 모두 동일하였으나 추후 PFGE법에 의한 분석을 통해 확인함으로써 더 정확한 감염원의 규명에 도움이 될 수 있을 것으로 사료되었다.

*Legionella*는 환경에서 검출하기에 비교적 어려운 균이며 임상 검체에서 검출하기에는 더욱 어렵다. 이것은 환경에서는 아메바 등에서 그리고 인체에서는 폐포 대식세포 내에서 생존하며 영양분을 공급받고 증식하는 까다로운 성질에 기인한다. 레지오넬라 균의 검출의 최선의 방법은 배양법이지만 민감도가 떨어지고 특수배지를 필요로 한다. 민감도를 향상시킨 비배양법으로는 직접 형광항체법, PCR 등이 있다. 직접 형광항체법은 특이 항체를 사용해야하는데 모든 레지오넬라 군종에 특이하게 반응하는 항체는 아직 없으며, 대부분의 연구보고는 이의 민감도나 특이도가 상대적으로 떨어진다고 보고하고 있다²²⁾. 반면에 PCR법은 *Legionella* 검출에 있어서 민감도나 특이도가 매우 높은 가치 있는 방법으로 알려지고 있으나²³⁾, 죽은 균이나 또는 BCYE- α 배지에서는 자라지 않는 *Sarcobium lyticum*과 같은 유사균 등도 검출이 가능하므로 PCR 결과의 해석 시에 주의를 기울여야 한다.

본 연구에서 원내 환경수와 운반수에서의 레지오넬라균의 오염도의 감시조사를 위해 기존의 배양법과 PCR법을 동시에 수행하였는데, *Legionella*의 검출율은 각각 15%, 45%로서 PCR법이 배양법보다 훨씬 예민한 결과를 보여주었고, 이 PCR 결과의 특이도는 Southern hybridization을 통하여 확인되었다. 임의로 선정하여 검사한 검체의 약 반 수에서 *Legionella*가 검출되어서 병원의 환경의 상당수가 레지오넬라균에 오염되어 있음을 시사하였다. 이와 같이 PCR 검출법은 환경의 *Legionella* 오염도를 조사하는데 있어서 매우 유용하나, *Legionella*는 환경 어디서나 쉽게 서식하고 검출될 수 있어서 *Legionella*의 유행의 역학조사에서 감염원으로 작용하였는지를 증명하기 위해서는 분자학적 수준에서의 비교분석이 필요하므로 이에 앞서 효과적인 배양검사와 균분리가 반드시

행해져야 할 것이다.

Legionella 균을 분리하기 위한 검체의 채취방법으로 물 또는 표면 환경원을 수집하거나 오염된 비말을 함유할 것으로 의심되는 공기를 채취하는 방법이 있는데, 환경수 또는 수도꼭지, 샤워기 등의 환경표면으로부터는 검체의 채취가 용이하고 비용이 저렴하며, 레지오넬라균의 수는 공기 중에서 보다 물에서 일정하게 유지되고, 일부 환자들은 오염된 물의 섭취로 인해 이환될 수 있으므로 환경에서 *Legionella*의 오염유무에 대한 감시 조사 방법은 공기보다 물이 더 적절한 검체로 인정되고 있다. 특히 원내 레지오넬라증 발생시에 냉각탑 수와 원내 급수 시스템의 검체는 반드시 검사해야 하며, 온수탱크의 바닥은 물에서 *Legionella*가 증식하는데 최적 온도인 35~46℃를 제공하므로 이 부위의 검체 수집은 매우 중요하다고 알려져 있다. 냉각탑 수, 응축기, 에어컨디셔너, 수도꼭지, 샤워꼭지, 분무기와 호흡기 보조 치료장치 등은 외국의 레지오넬라증의 여러 유행에서 감염원으로 규명된 바 있다.

Legionella 감염에서 두 가지 위험인자는 몸에 도달하는 레지오넬라 균의 접종 양과 숙주의 저항력이다. 젊고 건강한 사람에서 병독성이 있고 많은 양의 균이 전파된다면 병을 일으킬 수 있으나, 장기이식환자나 AIDS환자, 항암화학요법을 받고있는 면역기능저하자들은 적은 양의 균이 침입해도 병을 일으킬 수 있으므로 감염의 위험이 가장 높으며, 흡연가와 65세 이상의 고령자들은 중등도의 위험을 지닌다. 주로 오염된 비말의 흡입이 가장 중요한 전파경로로 알려져 있으나 식수에 오염이 되어있는 경우 물을 마시거나 오염된 물의 흡인에 의해서도 발생할 수 있다.

외국의 경우 원내 *Legionella* 감염증의 빈도는 비교적 높게 보고되고 있는 편이나 지역에 따라 차이가 있고, 대체로 원내 레지오넬라증은 진단되지 않은 채로 간과되고 있으며, 진단이 된 경우들도 잘 보고되지 않는 것으로 알려지고 있다²⁴⁾. 국내에서는 1984년도에 서울시 한 종합병원에서 발생했던 폰티악 열의 집단 발생 사례가⁹⁾ 아직까지는 최초의 그리고 유일한 집단감염으로 기록되고 있고, 그 이후 소수의 산발적인 증례 보고가 있을 뿐이나 사실상 *Legionella*의 진단검사가 일상적으로 가능하지 않고, 소수 기관에서 수행하고 있는 혈청학적 진단검사가 급성기 환자의 진단에 그다지 도움이 되지 않는 등의 진단상의 어려움이 있으므로 정확히 빈도를 알 수 없는 실정이다. 사실상, 본 연구에서도 임상적으로 레지오넬라증을 강하게 의심하여 이를 확인하려는 의지와 노력으로 환자들이 발견된 것이다. 더구나 최근 들어 각종 장기 이식술과 악성 종양에 대한 항화학요법에 따른 면역기능저하자들의 수가 현저히 증가하고 있음을 감안할 때, 이들에서 발생하는 중증의

원내 폐렴에서 *Legionella*는 가능한 원인균의 하나로 반드시 검사되어야 하며, 특히 이런 환자들이 집중되어 있는 의료기관에서는 환경의 감시조사를 통한 레지오넬라증의 예방까지도 고려되어야 할 것이다.

*Legionella*에 대한 병원환경의 감시조사에 대한 지침은 아직 논란이 되고 있는데, 미국 CDC에서는 원내 레지오넬라증 환자가 확인될 때까지는 환경의 감시조사를 권장하고 있지 않는 반면, 일부 관련 전문가들은 환례가 발견되지 않는 병원의 경우도 정기적인 환경 감시조사가 필요하다고 주장하고 있다. 일례로 미국의 Pennsylvania의 Allegheny County는 지역 내에 있는 레지오넬라증의 유행이 없었던 병원을 포함한 모든 병원내의 급수시설에 대한 통상적인 *Legionella* 배양지침을 가지고 있으며¹³⁾, 모든 병원에 대해 매년 환경 감시를 실시할 것을 제안하고 있는데, 만약 *Legionella*의 진단에 대한 특수검사를 쉽게 사용할 수 없는 경우에 원내 레지오넬라증은 임상에서 쉽게 간과되기 때문이다. 이 지침에 의하면 적어도 원내의 10곳의 수도꼭지, 샤워기 꼭지와 모든 온수 탱크가 배양 되어야 하며, 만약 *Legionella*가 증명되면 그 후 의료진은 원내 레지오넬라 폐렴에 대해 경각심을 가지고 원내 폐렴환자들에 대해 *Legionella*에 대한 특수 검사를 시행해야 할 것을 권하고 있다. 또한 병원환경의 감시조사에서, 1) 30% 이상의 검체에서 *Legionella*가 검출되거나, 2) 이전에 원내 레지오넬라증이 확인된 병원에서 30% 이하이나 선별조사에서 하나 이상의 검체에서 *Legionella*가 검출될 때, 3) 원내 레지오넬라증이 확인되는 경우들에서 원내 급수시스템에서 소독을 시행하므로써 원내의 레지오넬라증의 발생 또는 유행의 위험을 최소화 할 수 있다고 하였다.

과거 13년 이상 *Legionella*에 대한 다양한 소독방법이 시도되어왔으나, 현재 고온 멸균법, copper-silver ionization units 장치, 염소 소독법(염소 농도가 2~6 ppm으로 유지)이 사용되고 있으며 어느 것도 이상적인 방법은 아니다. 고온 멸균법은 물 분배 시스템의 소독에 널리 이용되나, 말초 분배 시스템의 분출을 유지하기가 어려우며 온수탱크의 온도가 낮아지면 재발하는 경향이 있고 환자 및 의료진의 화상의 위험도 있다. 염소 소독 방법은 레지오넬라균이 상대적으로 염소에 내성이 있으므로 안정된 항균 효과의 염소농도를 유지하기가 어렵고, 연공관 시스템의 부식, 발암성 부산물의 생성 등의 단점이 있다. 금속이온 방법은 가격이 비싸지만 현재 효과적인 것으로 알려져 있다^{1, 2, 7)}. 본 연구의 경우 오염된 환경원이 원내 폐렴의 감염원임을 규명하여, 원내 환경수에 대해 염소 소독법을 실시하였다. 이후 실시된 감시배양에서 더 이상 레지오넬라균은 분리되지 않았으며 레지오넬라 원내 폐렴도

발생하지 않아서, 효과적으로 환경 감염원의 조절 및 전파 방지를 할 수 있었다.

결론적으로 본 연구는 원내 레지오넬라 폐렴의 유행에서 ribotyping을 이용한 분자역학적 조사를 실시하여 원내의 추정 감염원을 확인하였으며, 감염원의 조절 및 전파방지에 매우 중요한 자료를 수집 할 수 있었고 아울러 오염된 원내 급수시스템 및 환경의 소독을 실시함으로써 더 이상의 유행적 발생을 차단할 수 있었다. 따라서 원내 레지오넬라증은 높은 사망률과 이환율을 나타내지만, 예방 가능한 질병으로 면역기능이 저하된 사람이 많은 의료기관에서는 이의 발생을 염두에 두고 필요시 적절한 환경감시와 소독을 실시하는 것이 바람직하다.

요 약

목적 : 본 연구의 목적은 5 개월동안 연속적으로 3명의 레지오넬라 원내 폐렴 환자가 발생한 3차 의료기관에서 병원 환경의 *Legionella* 오염도를 조사하고, 환경수에서 분리 동정된 균들과 환자에서 분리 동정된 균들과의 역학적 연계성을 molecular typing 분석을 통하여 조사함으로써 감염원을 규명하고 더 이상의 전파를 방지하고자 하였다.

방법 : 원내 환경수 20곳을 임의로 선정하여 채취한 환경수를 일부는 여과한 후 BCYE- α 배지에서 배양하고, PCR과, Southern법을 시행하였다. 환경 검체로부터 분리된 레지오넬라 3균주와 분리 동정된 레지오넬라 2균주와 이를 비교하기 위해 *Legionella* 표준 균주 12균주를 포함하여, 각각 *Hpa*I 과 *Eco*RI으로 ribotyping을 실시하였고 그 양상을 비교 분석하였다.

결과 : 병원 환경검체의 15%(3/20)에서 레지오넬라균이 배양되었고, PCR 및 Southern hybridization으로는 45% (9/20)에서 균이 검출되었다. Ribotyping 결과 환경수에서 분리 동정된 3균주중 2균주(공조기 및 병실 수도꼭지)가 환자들로부터 분리된 2균주와 동일한 ribotype 양상을 보였고 이들은 표준 균주인 *L. pneumophila* serogroup 6와 동일한 ribotype 양상을 보였다.

결론 : 병원의 환경수는 *L. pneumophila* serogroup 6를 포함하여 적어도 2종류의 레지오넬라균에 의해 오염되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 병원에서 발생한 레지오넬라 원내폐렴은 *L. pneumophila* serogroup 6에 의한 것이며, 이들 환자 병실의 오염된 수도꼭지가 감염원으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건 의료기술개발 연구과제(96-M-1-0005)의 지원으로 수행되었다.

참 고 문 헌

- 1) Stout JE, YU VL: *Legionellosis*. N Eng J Med 337: 682-687, 1997
- 2) Mulazimoglu L, Yu VL: *Legionella infection* In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL(eds): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed, p928-933, New York, The McGraw-Hill Companies, INC., 1998
- 3) Kirby BD, Synder KM, Meyer RD, Finegold SM: *Legionnaires' disease : Report of Sixty-five Nosocomially Acquired Cases and Review of the literature*. Medicine 59:188-205, 1980
- 4) World Health Organization: *Epidemiology, prevention, and control of legionellosis*. Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 68:155-164, 1990
- 5) 조상경, 신진호, 정길만, 권영주, 김우주, 김민자, 표희정, 이창규: 전신성 홍반성 낭창환자에서 발생한 다발성 종괴양 레지오넬라 폐렴 2예. 대한신장학회지 17: 31-35, 1998
- 6) Bopp CA, Summer JW, Morris GK, and Wells JG: *Isolation of Legionella spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium*. J Clin Microbiol 13:714-719, 1981
- 7) 김민자: 레지오넬라증. 감염 26:401-407, 1994
- 8) 김권범, 강민승, 정희진, 우홍정, 김민자, 유세화, 박승철: *Legionella pneumophila* Serogroup 1에 의한 치명적인 원내 폐렴 1예. 감염 30:106-110, 1998
- 9) 최강원, 김성민, 김양수, 배현주: *Legionnaires' disease* 1예. 감염 22:93-96, 1990
- 10) 김정순, 이성우, 심한섭, 오대규, 조민기, 오희복, 우제홍, 정윤섭: 1984년 7월 K병원 중환자실을 중심으로 집단 발생한 비폐렴성 legionellosis(Pontiac fever)에 관한 역학적 연구. 한국역학회지 7:44-58, 1985
- 11) Sambrook J, Fritch EF, and Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. N. Y., Cold Spring Harbor, 1989
- 12) 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 30:1491-1498,

1992

- 13) Gomez-Lus P, Fields BS, Benson RF, Martin WT, O'Connor SP, and Black CM: *Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping Legionella pneumophila serogroup 1*. J Clin Microbiol 31:1940-1942, 1993
- 14) Tram C, Simonet M, Nicolas MH, Offredo C, Grimont F, Lefevre M et al.: *Molecular typing of nosocomial isolates of Legionella pneumophila serogroup 3*. J Clin Microbiol 28:242-245, 1990
- 15) van Ketel, R. J., and B. de Wever: *Genetic typing in a cluster of Legionella pneumophila infections*. J Clin Microbiol 27:1105-1107, 1989
- 16) Owen RJ, Borman P: *A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis*. Nucleic Acids Res 15:3631, 1987
- 17) Brundrett GW: *Legionella and Building Services*. Oxford, England, Butterworth-Heinemann Ltd., 1992
- 18) Ta AC, Stout JE, Yu VL, and Wagener MM: *"Comparison of Culture Methods for Monitoring Legionella Species in Hospital Portable Water Systems and Recommendations for Standardization of Such Methods"*. J Clin Microbiol 33:2118-2123, 1995
- 19) Colbourne JS, Dennis PJ, Trew RM, Berry C, Vesey G: *Legionella and public water supplies*. Water Science and Technology 20:5-10, 1988
- 20) Edelstein PH, Beer KB, Deboynton ED: *Influence of growth temperature on virulence of Legionella pneumophila*. Infect Immun 55:2701-2705, 1987
- 21) Georgiou, PR, Doggett AM, Kielhofner MA, Stout JE, Watson DA, Lupsky JR et al.: *Molecular fingerprinting of Legionella species by repetitive element PCR*. J Clin Microbiol 32:2989-2994, 1994
- 22) Joly JR: *Monitoring for the presence of Legionella : where, when, how?* In: Barbaree JM, Brieman RF, Dufour AP, ed.s, p. 211. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993
- 23) Miller LA, Beebe JL, Butler JC, Martin WT, Benson R, Hoffman RE et al.: *Use of polymerase chain reaction in an epidemic investigation of Pontiac fever*. J Infect Dis 168:769-772, 1993
- 24) Freije MR, Barbaree JM, Dufour AP: *Legionellae control health care facilities; A guide for minimizing risk*. Indianapolis, USA, HC Information Resources, Inc., 1996