

Article

경기도내 수계시설에서 분리된 레지오넬라균의 분포현황 및 *Legionella pneumophila* serogroup 1의 유전학적 다양성 연구

이현경* · 박용배 · 황선일 · 김영수 · 박난주 · 박광희 · 윤미혜

경기도보건환경연구원 미생물팀

Distribution of *Legionella* species from water systems and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in Gyeonggi-do

Hyun-Kyung Lee*, Yong-Bae Park, Sun-Il Hwang, Young-Su Kim, Nan-Joo Park, Kwang-Hee Park, and Mi-Hye Yoon
Microbiology Team, Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, Suwon 16205, Republic of Korea

(Received May 2, 2017; Revised July 17, 2017; Accepted July 18, 2017)

Legionnaires' disease (LD) is a severe and potentially fatal pneumonia caused by colonization of human-made water system and subsequent aerosolization and inhalation of *Legionella* bacteria. A total of 147 *Legionella* strains was isolated from environmental water sources from public facilities in Gyeonggi-do, South Korea. The distribution of *Legionella* isolates was investigated according to facility type, and sample type. *L. pneumophila* was distributed broadly throughout Gyeonggi-do, accounting for 85.7% of the isolates, and *L. pneumophila* serogroup (sg) 1 predominated in all of the public facilities. *L. wadsworthii* predominated among non-*L. pneumophila* species. We performed comparative analyses of *L. pneumophila* sg 1 isolated from environment water of public facilities in Gyeonggi-do by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and sequence-based typing (SBT). Thirty-two isolates were classified into 22 types by PFGE and 9 sequence types (STs) by SBT and categorized into 3 groups. ST1 was the most prevalent sequence type and two STs obtained in this study had unique allelic profiles. The use of SBT data from different countries for epidemiology study of LD constitutes a technically uncomplicated and relatively easy method for strain subtyping, especially compared to other contemporary techniques.

Keywords: *Legionella* spp., *Legionella pneumophila*, Legionnaires' disease (LD), PFGE, SBT

*For correspondence. E-mail: hk1155@gg.go.kr;
Tel.: +82-31-250-2553; Fax: +82-31-250-2559

레지오넬라증(Legionellosis)은 우리나라 제 3군 법정감염병으로, 감기증상과 유사한 폰티악 열(Pontiac fever)이나 높은 치사율을 가지고 있는 레지오넬라 폐렴(재향군인병; Legionnaires' disease, LD)의 두 질환형을 나타낸다(Bartram *et al.*, 2007). 레지오넬라증은 1976년 미국 재향군인회에 참가한 회원들과 인근 지역 주민들 사이에서 집단 폐렴이 발생하여 221명의 환자들 중에 34명(15%)이 사망하면서 처음으로 보고 된 이후, 미국은 물론 세계 각국에서 다수의 산발적인 발생뿐 아니라 집단적으로 발생한 예가 보고 되고 있다(Fraser *et al.*, 1977; Miyamoto, 2003; Lee *et al.*, 2012). 특히, 2015년 미국에서는 레지오넬라증이 집단으로 발병하여 113명이 균에 감염되고 이중 12명이 사망한바 있다. 우리나라에서는 1984년 서울소재 종합병원 중환자실에서 발생한 이후로는 산발적으로 발생한 예들이 보고되어 있을 뿐 집단 감염은 없었지만(Kim *et al.*, 1985; Choe *et al.*, 1990), 질병관리본부의 전염병 통계에 따르면, 2016년 11월말 레지오넬라증 환자 신고건수는 116건으로 전년 같은 기간의 38건보다 3배 증가하였다(<http://is.cdc.go.kr/dstat/index.jsp>).

레지오넬라증의 원인체인 레지오넬라균 속(Genus *Legionella*)은 포자와 혐박이 없는 호기성 그람음성 간균이다(Bartram *et al.*, 2007). 레지오넬라균은 급수시설의 배관이나 냉각탑수에서 흔히 발견되는 균으로 수온상승 등의 생육하기 적합한 환경이 되면 과다증식이 일어나 오염된 시설의 물 입자를 통해

사람에게 감염된다. 특히 일부 감수성이 높은 면역저하환자나 노약자 등 면역력이 떨어진 사람에게는 치명적이다. 레지오넬라균 속에는 59개의 종과 70개 이상의 혈청군이 존재하며 (<http://www.bacterio.net/legionella.html>), *L. pneumophila*에는 15개의 혈청군이, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensis*, *L. spiritensis*, *L. erytra*, *L. quinlivanii* 등에는 각각 2개의 혈청군이 있으며, 나머지 종들은 1개의 혈청군을 가지고 있다(Kang *et al.*, 2005). 레지오넬라균 속에서 인간에게 레지오넬라증을 유발하는 종은 20여 종으로 이 중 *L. pneumophila* serogroup (sg, 혈청군) 1은 세계적으로 레지오넬라증을 일으키는 원인균의 50~75%를 차지하고, 그 subtype도 다양하다(Jeon *et al.*, 2014).

이렇게 다양한 *L. pneumophila* sg 1의 subtyping은 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)나 sequence-based typing (SBT)을 주로 사용하고 있다(Guo *et al.*, 2015; Essig *et al.*, 2016). 국내에서는 PFGE를 통한 다중이용시설의 수계시설에서 분리된 레지오넬라균의 유전학적 다양성에 대한 연구는 다수 보고되었지만(Seung *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2014), SBT를 이용한 레지오넬라균의 유전학적 특성연구는 거의 보고된 바가 없다(Lee *et al.*, 2010).

본 연구에서는 2015년 1월부터 12월까지 경기남부지역의 환경수계시설에서 분리된 레지오넬라균의 시설별, 수계환경별 분포현황을 조사하고, *L. pneumophila* sg 1으로 동정된 균주들을 대상으로 PFGE와 SBT를 실시하여 유전학적 특성을 비교 분석하였다. 이를 통해 경기도내 환경수계에서 분리된 레지오넬라균의 우세종을 파악하고 향후 집단발생시 환자와 환경수계 분리균주간의 상관관계 규명, 감염원의 추적 및 감염경로 규명을 통해 레지오넬라증의 발생 및 확산 방지에 필요한 기초자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구는 2015년 1월부터 12월까지 경기남부지역 다중이용시설의 냉각탑수, 탕내 냉·온수, 샤워기 냉·온수, 화장실 수도 냉·온수, 분수 953건을 대상으로 조사하였다.

시료전처리 및 균주분리

무균채수병에 채수된 검체 1 L를 0.2 μm 또는 0.45 μm pore size의 membrane filter에 여과한 후 멸균증류수 20 ml에서 강하게 진탕하여 부유시켰다. 시료 중 레지오넬라균 이외의 미

생물이 많을 것으로 예상되어 레지오넬라균 검출의 간섭을 줄이기 위해 50°C 항온수조에서 30분간 열처리 한 뒤, 원액과 멸균증류수로 10배 희석한 검액 각 100 μl 를 GVPC agar (bioMérieux)에 도말하였다. 도말된 배지는 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기(Sanyo)에서 3~10일간 배양하면서 전형적인 집락 형성을 관찰하였다.

PCR에 의한 *L. pneumophila* 검출

GVPC agar에서 순수 배양된 집락을 멸균증류수 200 μl 에 현탁시키고, 100°C에서 5분간 가열한 뒤 13,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리한 상등액을 주형 DNA로 사용하였다. Kwon 등(2012)의 방법으로 레지오넬라균 속에 특징적인 16S rRNA 유전자와 *L. pneumophila*에 특이적으로 존재하는 독소 유전자(*mip*: macrophage infectivity potentiator)를 증폭하여 두 유전자가 모두 증폭되는 *L. pneumophila*와 16S rRNA 유전자만이 증폭되는 non-*L. pneumophila*를 검출하였다.

Non-*L. pneumophila*의 염기서열분석

분리된 non-*L. pneumophila*는 GVPC agar에 순수분리 배양한 후, 집락을 멸균증류수 200 μl 에 현탁시키고, 100°C에서 5분간 가열한 뒤 13,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리한 상등액을 주형 DNA로 사용하였다. Backer 등(2004)의 방법으로 16S rRNA의 염기서열분석 후 NCBI database의 서열들과 비교분석을 통해 non-*L. pneumophila* 종을 확인하였다.

혈청학적 동정

분리된 *L. pneumophila*는 GVPC agar에서 순수분리 배양한 후, *Legionella antisera* (Denka Seiken)를 이용하여 혈청군을 조사하였다. 순수 배양된 집락을 생리식염수에 풀고 100°C에서 1시간 가열 처리한 후 슬라이드 글라스에 항혈청 한 방울과 항원 부유액을 한 방울씩 떨어뜨리고 응집유무를 관찰하였다. 1분 이내 강한 응집을 일으키는 것을 양성으로 판독하여 *L. pneumophila* serogroup (sg) 1에서 sg 6까지의 혈청군으로 결정하였다.

PFGE (pulsed field gel electrophoresis) 분석

GVPC agar에서 순수배양된 *L. pneumophila* sg 1 내 균주를 멸균면봉에 묻혀낸 다음, 2 ml의 cell suspension TE (100 mM Tris and 100 mM EDTA, pH 8.0)에 15~20% 투명도로 현탁시켰다. 현탁액 200 μl 와 1.2% agarose (seakem gold agarose, TaKaRa) 200 μl 를 섞은 후 바로 plug mold에 넣어 응고시켰다.

균인 plug는 ES buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, and 1% sodium-lauroyl sarcosine, pH 8.0) 1.5 ml와 proteinase K (20 mg/ml) 40 µl를 넣고 55°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, plug wash TE buffer (10 mM Tris; pH 7.5 and 1 mM EDTA; pH 8.0)를 밀폐된 용기나 PVC tube에 넣고 55°C 진탕 항온수조에서 20분간 5회 세척하였다. 세척이 끝난 plug는 1 mm 두께로 잘라 제한효소 *Sfi*I (40 U/µl, Roche) 1 µl, 제한효소 완충용액 10 µl, BSA 1 µl, 멸균증류수 88 µl를 넣고 50°C 항온수조에서 4시간 반응시켰고, size marker로 사용된 *Salmonella enterica* serotype Braenderup H 9812 (ATCC #BAA-664)는 *Xba*I (40 U/µl, Roche)을 처리하여 37°C에서 2시간 30분 동안 반응시켰다. 제한효소를 처리한 plug 절편을 1% PFGE agarose gel로 만들고, CHEF Mapper (Bio-Rad)를 사용하여 initial time 2.16 초, final time 54.17초, gradient 6.0 V/cm, included angel 120°, 14°C에서 19시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 완료되면 SYBR gold 염색시약(Invitrogen)으로 30분간 염색 후, 증류수에 1시간 동안 탈색 후, DNA Image Visualizer (Bio-Rad)로 관찰하였다. PFGE 분석은 BioNumerics software (Applied Maths)를 이용하였고, dendrogram은 UPGMA (unweight pair group method of average linkage)법으로 유연관계를 비교·분석하였다.

SBT (sequence-based typing) 분석

L. pneumophila sg 1 내 균주의 유전학적 특성을 sequence-based typing (SBT) 방법으로 분석하였다. SBT protocols version 5.0의 방법에 따라 7개 유전자(*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*,

proA, *neuA*)를 대상으로 유전자 증폭을 실시하고, 염기서열 분석을 수행하였다(Gaia et al., 2005; Mentasti and Fry, 2012). Sequence type (ST) 분석은 European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)의 SBT database를 이용하였다 (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php). 분석된 7개 유전자의 concatenated sequence로 MEGA v 5.01 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5.01) software (Tamura et al., 2011)를 이용하여 clustal W (1.6) method로 서열 정렬 후, maximum likelihood tree를 구축하였고, bootstrap 값은 1,000회의 resampled data로부터 추론하였다.

결과 및 고찰

레지오넬라균 검출 결과

2015년 1월부터 12월까지 경기남부지역에서 의뢰된 냉각탑수, 탕내 온수 등 검체 953건 중 147건(15.4%)에서 레지오넬라균이 검출되었으며, 검체 당 각 1개씩의 균주 총 147주의 레지오넬라균을 순수분리 배양하였다.

환경수계 시설별 레지오넬라균 검출률(Table 1)은 찜질방, 사우나, 목욕탕 등에서 20.5%, 대형건물, 백화점, 대형쇼핑센터 등에서 17.7%, 병원에서 14.7%, 호텔 등 숙박시설에서 10.7%, 복지시설에서 3.9%이었으며, 분수대에서는 1건도 검출되지 않았다. 2008년부터 2012년까지 경기북부지역 다중이용시설의 수계환경에 대한 레지오넬라균의 오염도 조사보고에서도

Table 1. Incidence of *Legionella* spp. isolated from water supply systems of public facilities in Gyeonggi-Do

Facility	Sampling type	Cooling tower water	Bath water		Shower water		Tap water		Spout water	Total
			hot	cold	hot	cold	hot	cold		
Building & Shopping center		34/184 (18.5%)			1/5 (20.0%)	0/5 (0%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)		35/198 (17.7%)
Hospital		14/57 (24.6%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	11/75 (14.7%)	7/70 (10.0%)	15/76 (19.7%)	5/70 (7.1%)		52/354 (14.7%)
Public bath		1/2 (50.0%)	36/101 (35.6%)	3/57 (5.3%)	8/51 (15.7%)	6/52 (11.5%)				54/263 (20.5%)
Hotel		2/9 (22.2%)			1/10 (10.0%)	0/8 (0%)		0/1 (0%)		3/28 (10.7%)
Welfare facility		1/4 (25.0%)	0/2 (0%)	0/3 (0%)	1/25 (4.0%)	1/21 (4.8%)	0/13 (0%)	0/9 (0%)		3/77 (3.9%)
Fountain									0/33 (0%)	0/33 (0%)
Total		52/256 (20.3%)	36/106 (34.0%)	3/63 (4.8%)	22/166 (13.3%)	14/156 (9.0%)	15/90 (16.7%)	5/83 (6.0%)	0/33 (0%)	147/953 (15.4%)

역시 대형목욕탕과 대형쇼핑센터의 검출률은 각각 31.0%와 26.5%로 높게 나타났다(Kwon *et al.*, 2012).

수계환경에 따른 검출률(Table 1)은 탕내 온수 34.0%, 냉각탑수 20.3%, 화장실수도 온수 16.7%, 샤워기 온수 13.3%, 샤워기 냉수 9.0%, 화장실수도 냉수 6.0%, 탕내 냉수 4.8% 순으로 수온이 높을수록 많은 균주들이 검출되었으며, 이는 기존의 연구결과들과도 일치하였다(Seung *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2014).

Non-*L. pneumophila* 분포현황

분리된 레지오넬라균 147주 중 85.7%(126주)가 *L. pneumophila* 였고, non-*L. pneumophila*가 14.3%(21주)를 차지하였다. Non-*L. pneumophila* 21주 중 20주가 찹질방, 사우나, 목욕탕, 대형건물, 병원에서 분리되었다.

Non-*L. pneumophila* 21주 중 15주의 종 분석결과 *L. wadsworthii* 가 3주, *L. anisa*, *L. erythra*, *L. quinlivaniis*, *L. rubrilucens*가 각 2주씩, *L. fairfieldensis*, *L. jamestowniensis*, *L. londiniensis*, *L. longbeachae*가 각 1주씩 검출되었다. 분리된 균주 중 *L. wadsworthii*, *L. anisa*, *L. erythra*, *L. longbeachae*는 사람에게 감염을 일으킨다고 알려져 있고(Kang *et al.*, 2005), 특히 *L. longbeachae*는 호주, 미국, 일본 등에 감염사례보고가 많다고 알려져 있다(Steele *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 2007). *L. wadsworthii* 경우 2주가 병원에서 분리가 되었고, 병원 수계시설의 레지오넬라균 오염은 면역저하 혹은 암 등의 고위험군 환자들에게 병원 내 감염을 일으킬 가능성이 높으므로 특히 주의가 필요할 것으로 생각된다.

L. pneumophila 혈청군 분포현황

L. pneumophila 126주 중 84주에 대하여 혈청군을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 레지오넬라증의 주요 원인균으로 알려진 *L. pneumophila* serogroup (sg) 1은 84주 중 32주로 검출률이 38.1%로 가장 높게 나타났고, sg 3가 13.1%(11주), sg 5

가 10.7%(9주)를 차지하였다. 이어 sg 4가 2.4%(2주), sg 2와 sg 6가 각각 1.2%(1주)를 차지하였다. Lee 등(2010)의 연구에서도 *L. pneumophila* sg 1은 국내 7개 지역(서울, 경기도, 강원도, 충청도, 경상도, 전라도, 제주도)에서 모두 가장 우점한다고 보고하였다. 하지만, 기존 연구에서 경기지방에는 sg 5와 sg 6가 높은 검출률을 보였던 반면, 본 연구에서는 sg 5의 검출률은 역시 높았지만 sg 3가 많이 검출되었고, 검출되지 않았던 sg 4도 검출되었다. Hwang 등(2014)의 연구에서는 연도별, 지역별로 분리되는 혈청군 분포에는 차이가 있을 수 있다고 보고하였으므로, 경기도내 수계환경에서 분리된 *L. pneumophila*의 혈청군 분포가 연도별로 변화하는지에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

환경수계 시설별 혈청군 분포를 보면 *L. pneumophila* sg 1이 대형건물, 백화점, 대형쇼핑센터 등에서 65.2%(15주), 병원에서 44.4%(12주)로 가장 두드러지게 우세했던 반면, 찹질방, 사우나, 목욕탕 등에서는 sg 3가 16.7%(5주)로 가장 많이 검출되었다.

수계환경에 따른 혈청군 분포를 보면 냉각탑수는 기존의 연구들에서 보고된 바와 같이 *L. pneumophila* sg 1이 65.5%(19주)으로 가장 높게 나타났다(Lee *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2012). 샤워수 냉·온수, 탕내 냉·온수, 화장실수도 냉·온수에는 sg 1에서 sg 6까지 다양하게 검출되었다.

혈청군 분석결과 *L. pneumophila* sg 1에서 sg 6 이외의 혈청군이 33.3%(28주)를 차지하였다. 부산지역 다중이용시설의 수계시설에서 분리된 *L. pneumophila*를 대상으로 15가지 혈청군의 분포현황을 조사한 연구결과에서도 sg 1에서 sg 6 이외의 혈청군들이 다수 분리되었고(Hwang *et al.*, 2014), 2008년 다중이용시설에서 분리된 레지오넬라균의 다양성을 연구한 국립보건연구원에서도 sg 7부터 sg 15까지 다양하게 분리되었으며(Lee *et al.*, 2010), 특히 sg 7과 sg 10은 각각 6.2%와 2.7%를 차지하는 등 분리가 높게 나타났으므로, 추후 sg 7에서 sg 15까지의 혈청군 분석도 필요할 것으로 생각된다.

L. pneumophila sg 1 내 균주의 PFGE와 SBT 분석결과

분리균주 중 가장 우세한 혈청군인 *L. pneumophila* sg 1 내 균주의 유전학적 다양성을 PFGE와 SBT 방법으로 비교·분석하였다.

32주를 제한효소 *Sfi*I로 처리한 PFGE pattern을 dendrogram으로 나타낸 결과 22개의 PFGE pattern을 보였고, 전체 54.4~100%의 유연관계를 보였다(Fig. 1). 73% 이상 상동성을 기준으로 3개의 group으로 분류되었다. Group 1의 경우 20주가 12개의 PFGE pattern을 보이며 75.8%의 상동성을 보였다. Group 2의 경우 8주가 7개의 PFGE pattern을 보이며 73.7%의 상동성

Table 2. Distribution of *L. pneumophila* serogroup isolates (n = 84)

<i>L. pneumophila</i>	No. of isolate (%)
Serogroup 1	32 (38.1%)
Serogroup 2	1 (1.2%)
Serogroup 3	11 (13.1%)
Serogroup 4	2 (2.4%)
Serogroup 5	9 (10.7%)
Serogroup 6	1 (1.2%)
Others	28 (33.3%)

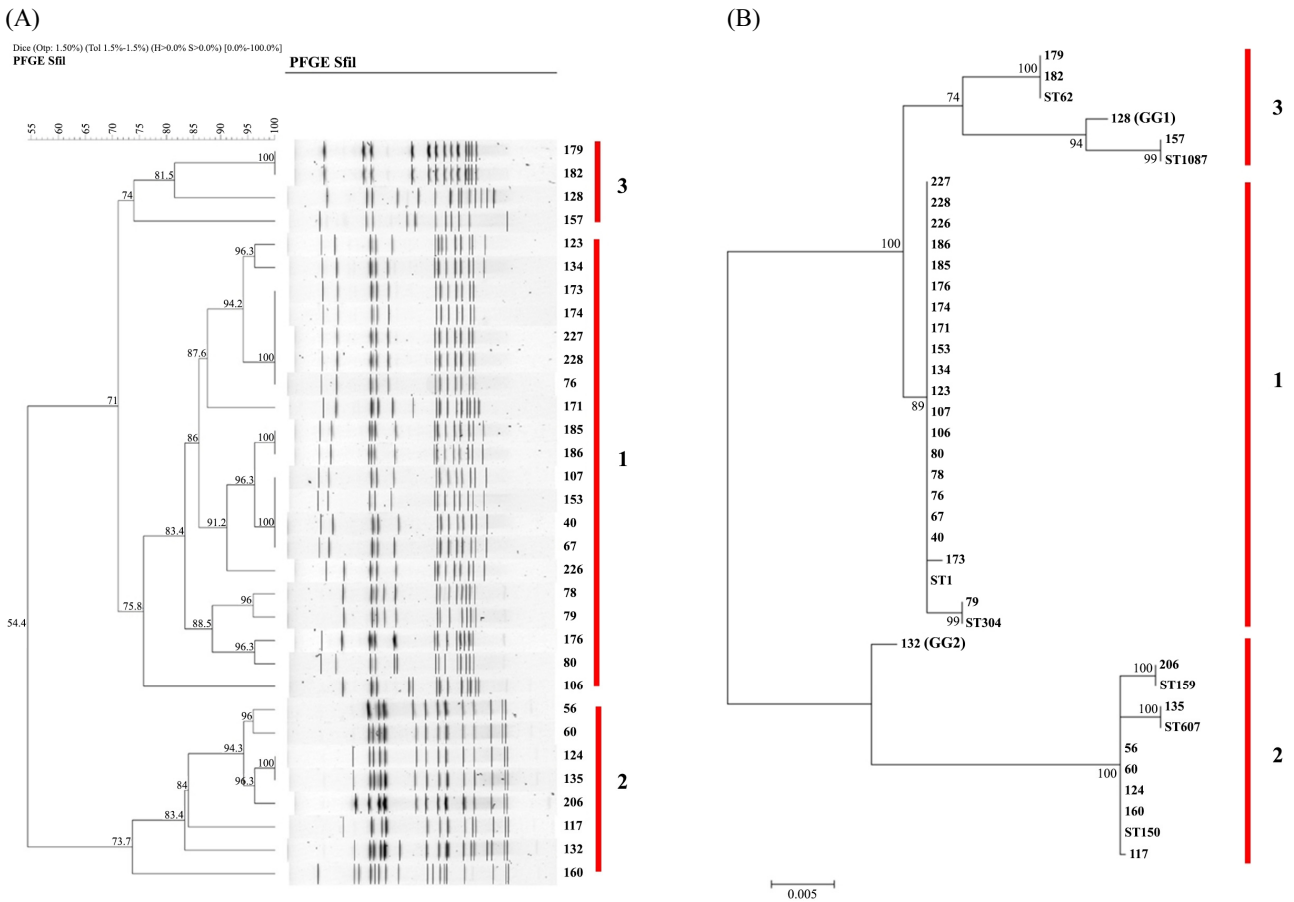


Fig. 1. Phylogenetic tree (Clustering results) based on PFGE and SBT analysis. (A) Dendrogram of PFGE pattern constructed from *L. pneumophila* serogroup 1 isolates. (B) Phylogenetic analysis of the concatenated sequences (*flaA*, *piE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates. More than 60% of bootstrap values are shown on the branches.

을 보였다. Group 3의 경우 4주가 3개의 PFGE pattern을 보이며 74.0%의 상동성을 보였다.

SBT는 Gaia 등(2005)의 방법을 이용하여 *flaA*, *piE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*, 7개 유전자를 사용하였으며, 염기서열 분석은 European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)의 SBT database를 이용하였다. 분리된 32주의 SBT 유형을 분석한 결과, 9개의 유형으로 나눌 수 있었다(Table 3). 이 중 ST1 (1, 4, 3, 1, 1, 1, 1)이 59.4% (19주)로 가장 우세하였으며, ST150 (11, 14, 16, 1, 15, 13, 1)이 15.7% (5주), ST62 (8, 10, 3, 15, 18, 1, 6)가 6.3% (2주)의 검출률을 보였다. 그밖에 ST159, ST304, ST607, ST1087이 1개씩 분리되었으며, 2주에 대해서는 EWGLI SBT database에서 sequence type (ST)을 결정할 수 없었다. 본 연구에서는 GG1 (7, 12, 17, 3, 35, 11, 11)과 GG2 (11, 14, 3, 1, 13, 13, 1)로 명명하였다. 기존의 연구들에서도 ST1은 세계에서 가장 널리 분포되어 있으며, 임상시료에서도 빈번하게 분리된다고 알려져 있다(Lee et al., 2010; Kozak-

Table 3. ST distributions of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates (n = 32)

Sequence type	No. of isolate (%)
ST1 (1, 4, 3, 1, 1, 1, 1)	19 (59.4%)
ST150 (11, 14, 16, 1, 15, 13, 1)	5 (15.7%)
ST62 (8, 10, 3, 15, 18, 1, 6)	2 (6.3%)
ST159 (11, 14, 16, 1, 15, 13, 2)	1 (3.1%)
ST304 (1, 4, 1, 1, 1, 1, 1)	1 (3.1%)
ST607 (11, 14, 16, 16, 15, 13, 1)	1 (3.1%)
ST1087 (7, 6, 17, 28, 13, 11, 11)	1 (3.1%)
GG1 (7, 12, 17, 3, 35, 11, 11)	1 (3.1%)
GG2 (11, 14, 3, 1, 13, 13, 1)	1 (3.1%)

Muiznieks et al., 2014; Enrhard et al., 2015; Guo et al., 2015). ST1과 ST150은 우리나라 뿐 아니라, 중국, 일본에서도 분리가 된다고 보고되어있고(Amemura-Maekawa et al., 2012; Qin et al., 2014), ST62는 2009년 12월부터 2010년 1월 사이에 독일 울름과 노이울름에서 일어난 64명의 레지오넬라 유행의 원

인균이었으며(Essig *et al.*, 2016), 캐나다 온타리오주에서 1978년부터 2007년까지 분리된 194개의 임상분리균주에서 분리된바 있다(Tijet *et al.*, 2010). 본 연구에서 명명한 GG1은 Lee 등(2010)의 연구에서 온수에서 주로 분리된 ST-K1과 동일한 균주로 국내에서만 상주하는 균주로 생각된다.

가장 우점하였던 ST1은 환경수계 시설별로는 57.9% (11주)가 병원에서 분리되었고, 수계환경에 따라서는 52.6% (10주)가 냉각탑수에서 분리되었다. Lee 등(2010)의 연구에서도 ST1은 냉각탑수에서 주로 분리되었다. ST150, ST62, ST159, ST304, ST607은 대형건물의 냉각탑수에서 분리되었고, ST1087은 병원의 화장실수도 냉수에서 분리되었다. GG1은 사우나 욕조수 온수에서 분리되었고, GG2는 대형건물 냉각탑수에서 분리되었다.

7개 유전자의 서열을 조합해서 phylogenetic tree를 구축한 결과 분리된 32주가 94.8~100%로 유전적인 상동성이 높게 나타났으며(Fig. 1), PFGE pattern을 바탕으로 한 dendrogram과 마찬가지로 97% 이상 상동성을 기준으로 3개의 group으로 분류되었다. ST1과 ST304로 판정된 20주가 99.6%의 상동성을 보이며 PFGE의 group 1과 일치하였고, ST150, ST159, ST607로 판정된 7주와 GG2가 97.5%의 상동성을 보이며 PFGE의 group 2와 일치하였다. ST62와 ST1087로 판정된 3주와 GG1은 97.8%의 상동성을 나타내며 PFGE의 group 3와 일치하여, PFGE와 SBT의 분석결과가 매우 유사함을 알 수 있었다. 또한, Lee 등(2010)의 연구결과에서 SBT profile을 바탕으로 정의하였던 3개의 clonal groups (CGs)의 구성원들을 본 연구에서도 확인할 수 있었다. CG1은 본 연구의 group 1과 CG2는 group 3와 CG3은 group 2와 일치하였다.

본 연구를 통해 *L. pneumophila* sg 1에 다양한 유전자형이 존재함을 확인할 수 있었고, PFGE 뿐 아니라 SBT도 역시 국내에서 분리된 레지오넬라균의 유연관계를 분석하는 분자유전학적 분석에 좋은 방법임을 확인할 수 있었다. 특히 SBT는 데이터베이스가 잘 구축되어 있어 다른 지역에 분리된 균주들과도 비교분석 할 수 있고, 지역특이적인 새로운 균주도 찾을 수 있다는 점에서 강점이 있다고 생각된다. 향후 SBT 방법을 통한 레지오넬라균들의 연도별, 시설별, 수계환경별 데이터를 계속적으로 축적한다면 집단적 또는 산발적 환자발생이 신속, 정확하게 그 감염원을 추적할 수 있을 것이라 여겨진다.

적 요

레지오넬라증은 인공수계환경이 레지오넬라균에 오염되었을 때 에어로졸의 전파에 의하여 집단 발생되는 심각한 폐

렴과 높은 치명률을 일으키는 호흡기질환이다. 본 연구에서는 경기도내 수계시설로부터 147주의 레지오넬라균을 검출하였고, 시설별, 수계환경별 분포현황을 조사하였다. 분리된 레지오넬라균 중에서 *Legionella pneumophila*의 검출률은 85.7%로 높게 나타났으며, 혈청군을 분석한 결과 *L. pneumophila* serogroup (sg) 1이 주로 검출되었다. Non-*L. pneumophila* 중에서는 *L. wadsworthii*가 가장 많이 검출되었다. *L. pneumophila* sg 1의 유전학적 다양성을 분석하기 위해 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)와 sequence-based typing (SBT) 방법을 사용하여 비교 분석하였다. 32주에 대해 PFGE 분석 결과 22개의 PFGE pattern을 보였고, SBT 분석 결과 9개의 유형으로 나누어졌다. PFGE와 SBT 분석에서 모두 크게 3개 group으로 분류되어 매우 유사한 결과를 나타냈다. SBT 유형 중 ST1이 가장 우점하였고, 2개의 새로운 유형도 찾아낼 수 있었다. SBT는 데이터베이스가 잘 구축되어 있어 균주 간의 유전학적 유형분석을 쉽고, 간단하게 할 수 있기 때문에 레지오넬라증의 분자역학적 연구에 유용한 방법임을 확인할 수 있었다.

References

- Amemura-Mackawa, J., Kikukawa, K., Helbig, J.H., Kaneko, S., Suzuki-Hashimoto, A., Furuhashi, K., Chang, B., Murai, M., Ichinose, M., Ohnishi, M., *et al.* 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4263-4270.
- Backer, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., and von Eiff, C. 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4988-4995.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J.V., Pond, K., and Surman, S. 2007. *Legionella* and prevention of legionellosis world health organization, Geneva, WHO.
- Choe, K.W., Kim, S.M., Kim, Y.S., Kim, H.J., and Woo, J.H. 1990. A case of Legionnaires' disease, Korean. *J. Inf. Dis.* **22**, 93-96.
- Enrhard, J., Alabi, A.S., Kuczus, T., Tsombeng, F.F., Becker, K., Kreamer, P.G., Schaumburg, F., and Esen, M. 2015. Population structure of *Legionella* spp. from environmental samples in Gabon, 2013. *Infect. Genet. Evol.* **33**, 299-303.
- Essig, A., Baum, H., Gonser, T., Haerter, G., and Luck, C. 2016. Microbiological diagnosis and molecular typing of *Legionella* strains during an outbreak of legionellosis in Southern Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* **306**, 109-114.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., *et al.* 1977. Legionnaires' disease : Description of an

- epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1189–1197.
- Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R., and Harrison, T.G.** 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2047–2052.
- Guo, J., Liang, T., Hu, C., Lv, R., Yang, X., Cui, Y., and Song, Y.** 2015. Sequence types diversity of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water source in Guangzhou and Jiangmen, China. *Infect. Genet. Evol.* **29**, 35–41.
- Hwang, I.Y., Park, E.H., Park, Y.K., Park, S.H., Sung, K.H., and Jo, H.C.** 2014. Distribution of *Legionella pneumophila* from environmental water systems of public facilities in Busan. *Rep. Busan Inst. Health Environ.* **241**, 40–46.
- Jeon, S.J., Lee, S.D., Jung, J.H., Jin, Y.H., Jeong, H.W., Kim, Y.E., Kim, K.S., Oh, Y.H., and Jung, K.** 2014. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* isolated from water supply systems in Seoul, Korea, from 2012 to 2014. *Rep. Seoul Inst. Health & Environ.* **50**, 287–300.
- Kang, S.J., Kang, Y.H., Kwon, D.H., Kim, K.C., Kim, K.S., Kim, D.S., Kim, B.S., Kim, S.H., Kim, S.S., Kim, S.H., et al.** 2005. Laboratory diagnosis of infectious diseases, pp. 202–220. National institute of health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, 3rd ed.
- Kim, J.S., Lee, S.O., Shim, H.S., Oh, T.K., Cho, M.K., and Oh, H.B.** 1985. An outbreak of Legionellosis in ICU of K Hospital, Korea. *Korean J. Epidemiol.* **7**, 44–58.
- Kozak-Muiznieks, N.A., Lucas, C.E., Brown, E., Pondo, T., Taylor, T.H., Frace, M., Miskowski, D., and Winchell, J.M.** 2014. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 201–211.
- Kubota, M., Tomii, T., Tachikawa, Harada, R., Seo, Y.R., Kaji, R., Takeshima, Y., Hayashi, M., Nishimura, T., and Ishihara, K.** 2007. *Legionella longbeachae* pneumonia infection from home garden soil. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* **45**, 698–703.
- Kwon, Y.O., Kwon, S.M., Hong, H.G., Bang, S.J., Kim, J.K., Lim, Y.S., Nam, S.J., Kim, G.H., and Lee, J.B.** 2012. Surveillance of *Legionella* species contamination on water supply systems of public facilities in Northern Gyeonggi-do. *Rep. Gyeonggi Inst. Health & Environ.* **25**, 239–248.
- Lee, M.H., Lauri, A.H., and George, E.N.** 2012. Legionellosis-Untied States, 2000–2009. *Am. J. Transplant* **12**, 250–253.
- Lee, H.K., Shim, J.I., Kim, H.E., Yu, J.Y., and Kang, Y.H.** 2010. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6547–6554.
- Mentasti, M. and Fry, N.K.** 2012. Sequence-based typing protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* version 5.0. ESGLI. 1–11.
- Miyamoto, H.** 2003. Prevention measures against *Legionella* infection in a circulating hot water bath. *J. UOEH* **25**, 61–77.
- Qin, T., Zhou, H., Ren, H., Guan, H., Li, M., Zhu, B., and Shao, Z.** 2014. Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup I strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2150–2157.
- Seung, H.J., Jung, J.H., Kim, S.J., Jin, Y.H., Lee, S.M., Kim, M.S., and Kim, J.G.** 2007. Molecular epidemiology study of *Legionella pneumophila* isolated from water systems in Seoul. *Rep. Seoul Inst. Health & Environ.* **43**, 283–293.
- Steele, T.W., Moore, C.V., and Sangster, N.** 1990. Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionella* in potting soils in Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2984–2988.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Tijet, N., Tang, P., Romilowych, M., Duncan, C., Ng, V., Fisman, D.N., Jamieson, F., Low, D.E., and Guyard, C.** 2010. New endemic *Legionella pneumophila* serogroup 1 clones, Ontario, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 447–454.