

## 냉각탑 물에서의 *Legionella* 분리

연세대학교 의과대학 임상병리과<sup>1</sup> · 미생물학교실<sup>2</sup>  
전국대학교 의과대학 부속 민중병원 임상병리과<sup>3</sup> · 미취간주 공중보건 실험실<sup>4</sup>

정윤섭<sup>1</sup> · 이삼열<sup>1</sup> · 윤정구<sup>2</sup> · 최영숙<sup>3</sup> · 장익진<sup>4</sup>

= Abstract =

### Isolation of *Legionella* from Cooling Tower Water Samples

Yunsop Chong,<sup>1</sup> Samuel Y. Lee,<sup>1</sup> Jung Koo Youn,<sup>2</sup> Young Sook Choe<sup>3</sup> and Ik-Chin Chang<sup>4</sup>

Departments of Clinical Pathology<sup>1</sup> and Microbiology,<sup>2</sup> Yonsei University College of Medicine,

Department of Clinical Pathology, Kon-Kuk University College of Medicine<sup>3</sup> and Michigan State Public Health Laboratory<sup>4</sup>

An outbreak of Pontiac fever was reported in Seoul in 1984, but legionnaires disease was not known in Korea yet. Our knowledge on the presence or absence of *Legionella* in cooling tower, which is the main source of the infection, is very limited. In this study an attempt was made to determine the presence of *Legionella* in cooling towers during June-September, and in the sputum specimens for routine bacteria culture, which was taken during July-August 1985. Among the 83 water samples 6 yielded *L. pneumophila* serogroup 1, while none of the 189 sputum samples yielded growth of *Legionella*. It is concluded that legionellosis can occur in Korea and if it happens it is most likely due to *L. pneumophila* serogroup 1.

#### 서 론

*Legionella*는 자연계의 물과 토양중에 있는 그람 음성 간균이다<sup>1,2</sup>. 이 세균의 감염증은 제항균인병과 Pontiac 열이다<sup>3</sup>. 우리나라에서도 Pontiac 열의 발생은 보고된 바 있으나<sup>4</sup>, 제항균인병의 보고는 아직 없다. 우리나라에서 이 세균이 분리된 것은 자연계에서의 '소수 뿐이고', 환자에서는 분리된 바가 없다. 분리된 균종도 *L. pneumophila* serogroup 1 뿐이었다.

이 세균의 감염은 냉각탑에서 생기는 비말(aerosol)에 *Legionella*가 들어있으면 이의 흡인으로 일어난다<sup>5,6,7</sup>. 감염을 일으킬 수 있는 이러한 냉각탑은 우리나라에 있어서도 그 수가 점차 늘어나고 있다. 이 감염은 집단발생 뿐만아니라<sup>8,9</sup>, 산발적인 원내감염도 알려져 있다<sup>10</sup>.

이 세균의 가장 중요한 감염원이 되는 냉각탑에 이 세균이 존재함을 확인하는 일은 이 감염에 대비하는 첫 단계의 일이 될 것이고, 또한 해당 검체에서 이 세균을 찾아 보는 일은 뜻이 있는 일이라고 하겠다. 이에 이 연구에서는 1983-84년에<sup>11</sup> 이어서 냉각탑의 물 검체와 해당 검체에서 *Legionella*의 분

리를 다시 시도하였다.

#### 재료 및 방법

*Legionella* 분리를 위해서는 1985년 7-9월 사이에 서울 시내에 있는 3곳의 건물 냉각탑 10개와 거리의 냉각탑 5개에서 81개의 물 검체를 채취하였다. 2개의 물 검체는 A지역 건물의 상수도에서 채취되었다. 해당검체는 1985년 7월과 8월에 통상세균의 검사가 의뢰된 연세의료원 환자의것을 사용하였다. 물 검체는 약 100ml씩이 채취되었고 그 전부를 원침한 후에 침사를 10배되는 산성 용액(0.2 mol HCl 3.9 ml와 0.2 mol KCl 25 ml의 혼합액, pH 2.2)로 5분간 처리한 후에<sup>12</sup> 그 한방울을 buffered charcoal yeast extract(BCYE) agar<sup>13</sup>에 접종하였다.

BCYE agar에는 선택제로서 ml 당 anisomycin 80 µg, vancomycin 0.5 µg, polymixin B 40 u를 첨가한 것<sup>14</sup>을 사용하였다. 접종된 배지는 35°C에 5일 이상 배양하였다. 형성된 집락은 혈액한천과 cysteine 과 charcoal이 제외된 BCYE agar 처방의 배지인 yeast extract(YE) agar에 계대배양하여 증식이 안 되는 것만을 동정시험의 대상으로 하였다. 생화

Table 1. *Legionella* culture from water and sputum specimens

Month	No. (%) of water specimen		No. of sputum specimen	
	Cultured	Positive	Cultured	Positive
June	4	0	NT*	
July	34	2 (5.9)	227	0
August	25	4 (16.0)	62	0
September	20	0	NT	
Total	83*	6 (7.2)	289	0

\*NT, not tested.

\*2 from faucets.

Table 2. *Legionella* isolation from various sampling sites

Area and sampling site		No. of specimen	
		Cultured	Positive
A Building	(7)*	42	4*
B Building	(2)	2	1
C Building	(1)	1	0
D Street	(3)	15	1
E Street	(3)	16	0
A Tap Water	(1)	2	0
Total		83	6

\*No. of cooling tower or faucet.

\*3 strains were isolated from the same cooling tower on July 31, August 9 and August 13.

학적 시험은 이미 보고한 방법에 따랐다<sup>3)</sup>.

배양 특성과 생화학적 성상이 *Legionella*의 반응과 같은 균주는 직접형광항체법 (direct fluorescent antibody test, DFA)<sup>4)</sup>으로 염색하였다. 즉 2일간 배양한 세균으로 1% neutral formalin 부유액을 만들고, 그 탁도는 McFarland의 제 1관 보다 더 연하게 하였다. 염색은 권장되는 방법<sup>5)</sup>으로 하였다. DFA 시험에 사용한 conjugate는 Michigan Department of Public Health에서 제공한 것을 사용하였다. 염색표본은 Fluorestar 20 현미경 (American Optical Co., Buffalo, N.Y.)와 BG 12 exciter filter 및 OG 1 barrier filter를 사용하여 관찰하였다.

### 성 적

시험기간중에 냉각탑의 물 검체 81개와 수도물검체 2개, 그리고 객담 검체 289개에서 *Legionella*의 분리가 시도되었다 (Table 1). 6월과 9월에 채취한 냉각탑 물 검체에서는 *Legionella*가 분리되지

않았으나, 7월에 채취한 검체 34개 중 2개에서, 8월에 채취한 검체 25개 중 4개에서는 분리가 되었다. 객담에서는 이 세균이 분리되지 않았다.

물 검체의 채취장소는 지역이 다른 곳에 위치한 3개의 건물의 냉각탑과 거리의 냉각탑을 대상으로 하였는데 A지역에 있는 한 건물의 냉각탑 1개에서는 3회, 다른 1개에서는 1회 *Legionella*가 분리되었고, B지역 건물의 1개, 냉각탑 1개에서는 1회 분리되었다. D지역에 있는 거리의 냉각탑에서는 15 검체 중 1개에서 분리가 되었으나, E지역의 거리 냉각탑에서 16검체가 모두 분리 음성이었다. 수도물 2개 검체에서는 분리되지 않았다 (Table 2).

분리된 균주의 성상은 Table 3과 같았다. *Legionella*로 동정된 세균은 BCYE agar에 2-3일 배양후에 집락이 형성되었다. 그러나 blood agar 나 cysteine이 안들은 BCYE agar에 계대배양하면 증식되지 않았다. BCYE agar에 2-3일 배양한 집락의 그람염색에서는 가늘고 연하게 염색되는 그람음성 간균이었다. Nitrate reduction과 urease는 음성이었고, catalase는 약한 양성반응을 보였다. YE agar에 tyrosine을 첨가한 배지에서 이 세균들은 갈색을 나타내었다. Gelatine 액화는 양성이었다고, hippurate hydrolysis는 모든 균주가 양성을 보였으나 균주에 따라서는 그 반응이 약하였다. 운동성은 2일간 배양한 집락을 현직표본법으로 관찰할 때 운동성인 세균이 드물기는 하였으나 운동성은 모든 균주가 양성이었다. Oxidase와 beta-lactamase가 양성이었다고 Wood lamp로 비출매 형광을 발하지 않았다.

DFA 결과는 polyvalent A conjugate로는 강한 양성반응을 보였으나, polyvalent B나 C와는 반응음성이었고, *L. pneumophila* serogroup 1 conjugate에 강한 양성으로 관찰되었다. 이러한 시험 결과를 근거로 분리된 6주는 *L. pneumophila* serogroup 1으로 동정하였다.

Table 3. Characteristics of *L. pneumophila* isolates

Characteristics	Reaction of isolate no.:					
	22	27	37	43	44	54
Growth on						
Blood agar	-	-	-	-	-	-
BCYE agar	+	+	+	+	+	+
Growth requirement						
Cysteine	+	+	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Browning of YE						
containing tyrosine	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+
Hippurate hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Beta-lactamase	+	+	+	+	+	+
Autofluorescence	-	-	-	-	-	-
DFA						
Polyvalent A*	+	+	+	+	+	+
Polyvalent B*	-	-	-	-	-	-
Polyvalent C*	-	-	-	-	-	-
<i>L. pneumophila</i> 1	+	+	+	+	+	+

\*A, *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 3 and 4; B, *L. pneumophila* serogroup 5, 6, *L. bozemanii*, *L. micdadei*; C, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae* serogroup 1, 2 and *L. jordanis*.

## 고 찰

*Legionella*는 현재까지 22종이 명명되었고 그 혈청형은 32가지가 된다<sup>6</sup>. 이들 중에서 감염을 흔히 일으키는 균종은 *L. pneumophila*이지만 *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. jordanis*, *L. wadsworthii*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*가 감염에서 분리된 바 있고<sup>1,11</sup> 최근에는 *L. maceachernii*가 감염을 일으킨 세균으로서 추가되었다<sup>12</sup>. 우리나라에서 발생했던 Pontiac열<sup>13</sup>은 혈청학적 검사를 근거로 그 병원균이 *L. gormanii*로 보고된 바 있다. 국내에서는 제함균인병의 발생이 아직 보고된 바 없으며, 따라서 환자에서의 *Legionella*분리는 아직 없었다.

*Legionella* 중의 감염원은 수도물<sup>14</sup> 등 여러 가지가 알려져 있으나, 가장 중요한 것은 냉각 탭의 물

이고 그 감염 방법은 비말의 흡인이다<sup>15,16</sup>. 실내의 공기의 조절을 위한 냉방 방식이 *Legionella* 전파의 위험이 전혀 없는 창틀형 냉방기에서 전파의 가능성이 있는 냉각탑이 있는 냉방기로 차츰 바뀌어 가고 있다. 국내의 자연 환경에서의 *Legionella* 분리에 관한 연구는 극히 초보단계에 있다<sup>17</sup>. 즉 1983-84년에 *L. pneumophila* 6주가 냉각탑의 물에서 분리되었을 뿐이고, 또한 이 기간중에 분리되었으나 미동정이었던 균주중의 1주가 *L. pneumophila* 임이 Michigan State Public Health Laboratory에 의해 동정되었는데 이 균주들은 모두가 serogroup 1뿐이었다. 이 연구에서 분리된 균주도 6주 모두가 같은 serogroup 1뿐이어서 아직까지 국내에서 분리된 것은 이 한가지 뿐이다.

따라서 우리나라에서 *Legionella*증이 발생한다면 미국에서와 마찬가지로<sup>18</sup> *L. pneumophila* serogroup 1에 의한 것이 많을 것으로 생각된다. Guinea pig에 대한 독성시험 결과에 의하면<sup>19</sup>, *L. pneumophila* serogroup 1 중에는 병독성이 강한 것과 약한 것이 있다고 하며, *Legionella*가 자연체에 많음에도 불구하고 환자 발생이 적은 이유가 될 것이라고 하였다. 저자들이 분리한 균주들의 병독성에 관해서는 시험된 바 없으며 앞으로 이러한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

이 세균이 분리된 시기는 7월과 8월이었고, 6월이나 9월에는 분리된 바가 없다. 또한 1983-84년에도 6월이나 9월에는 분리가 되지 않았다. 이러한 결과는 냉각탑 물 속의 *Legionella*는 7월과 8월에 그 수가 많음을 나타낸 것이라고 하겠고 따라서 *Legionella*증이 발생한다면 그 시기는 7월이나 8월이 될 것으로 생각된다. 국내에서 보고된 Pontiac열은 7월에 발생하였었다<sup>13</sup>.

*Legionella*의 분리 양성율은 물 검체를 원침하는 양이 많을수록 높아질 것으로 생각된다. 이 연구에서는 1검체당 약 100 ml를 원침하여 배양에 사용하였는데 그 양성율은 7.2%이었다. 한편 1983-84년에는 30-50 ml의 검체를 원침하여 배양하였는데 4.2%의 검체가 양성이었다<sup>20</sup>.

*Legionella*가 분리된 지역을 보면, A지역과 B지역에 있는 건물의 냉각탑에서 분리되었다. C지역의 건물 냉각탑에서는 분리가 되지 않았으나 이곳에서는 1개의 검체만이 검사되었다. 거리에 있는 냉각탑에서는 D지역에 있는 것에서는 분리가 되었으나 E지역에 있는 것에서는 분리가 되지 않았다. 그러나 1983-84년에는 E지역의 거리 냉각탑 물에서도 분리가 된 바 있다<sup>21</sup>. 따라서 아직까지 조사 규모는 적었지만 서울의 여러지역에 이 세균

이 존재함이 밝혀졌다. A 지역 건물의 냉각탑 1개에서는 7월 31일, 8월 9일, 8월 13일의 3회에 이 세균이 분리되었으며 이 결과는 이 세균이 장기간 지속적으로 존재함을 보인 것이라고 하겠다.

7월과 8월에 일반세균배양 의뢰된 객담검체를 이용해서 *Legionella*의 분리를 시도했으나 분리되지 않았다. 이러한 시도는 1982-84년에도 하였으나 역시 분리하지 못하였었다. 일반세균 배양의 의뢰되는 객담의 대부분이 폐렴환자의 것이 아니므로 이러한 검체에서 *Legionella*를 분리할 수 있을 가능성은 극히 적다고 하겠다. 그러나 *Legionella*증이 집단적으로만 발생하는 것이 아니고, 원내에서도 산발적으로 발생할 수 있으므로<sup>10)</sup> 이러한 분리시도를 하였으나 분리하지 못하였다. 현재 *Legionella* 분리를 위해 사용하는 BCYE agar에서는<sup>11)</sup> 다른 세균이 완전히 억제되지 않으므로 오염균의 증식을 억제하기 위하여 산처리를 한다<sup>12)</sup>. 이 산처리는 *Legionella*의 생존수도 감소시키므로<sup>13)</sup> 물이나 객담 검체중의 *Legionella*수가 적을 때는 분리를 어렵게 할 수도 있을 것으로 생각된다.

BCYE agar에 증식된 세균중에서 oxidase와 catalase 양성인 그람음성 간균을 blood agar에 접종했을 때 그 증식이 분명한 것은 *Legionella* 이외의 세균임에 불림없음으로 더 이상의 감별시험을 필요로 하지 않는다. 그러나 일부 균주는 blood agar에서의 증식이 불분명하여 생화학적 시험을 한바 *Legionella*에 유사하여 일단 Legionella-like organism으로 생각하였으나 이러한 균주중에 *Legionella*는 없음이 Michigan State Public Health Laboratory에 의해 밝혀졌다. 1985년에 분리한 균주중에도 blood agar에서의 증식이 불분명한 것들이 있었으나 이 세균들은 cysteine이 안들은 BCYE agar인 YE agar에서는 그 증식이 분명하였다. 즉 BCYE agar에 증식된 세균중에서 *Legionella* 이외의 세균을 우선 선별하기 위해서는 blood agar에서의 증식을 보는 것 보다는 YE agar에서의 증식을 보는 것이 분명한 결과를 얻을 수 있었다. Hippurate hydrolysis 시험은 *L. pneumophila*로 동정된 균주 모두가 양성 반응을 보였으나 이 시험의 판독시간인 10분 항은 과 20분 실온 방치 후에는 양성반응의 정도가 대단히 약한 것도 있어서 판정이 어려움을 경험하였다.

DFA 염색은 serogroup간에 교차반응이 있으므로<sup>14)</sup> *Legionella* 균종이나 serogroup의 동정이 잘못되기 쉬우며, 따라서 미국 Centers for Disease Control에서는 DFA 방법 대신에 슬라이드 응집반응을 *Legionella*의 동정방법으로 쓸 계획임을 발표 한바 있다<sup>15)</sup>. 그러나 이 연구에서 분리한 균주의 DFA

시험은 polyvalent A와 *L. pneumophila* serogroup 1 conjugate와는 분리균주 6주가 모두 강하게 염색되었으나, polyvalent B나 C와는 염색되지 않았다.

## 결 론

서울시에 있는 일부 건물과 거리의 냉각탑에서 1985년 6월부터 9월 사이에 채취한 물 검체와 1985년 7월과 8월에 일반세균배양의뢰된 객담 검체에서 *Legionella*의 분리를 시도하였다. 83개 물 검체중 6개에서 *L. pneumophila* serogroup 1이 7월과 8월에 3개 지역에서 분리되었다. 객담에서는 분리가 되지 않았다. 우리나라에서 *Legionella*증이 발생한다면 *L. pneumophila* serogroup 1에 의한 것일 가능성이 크다고 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) 김정순, 이성우, 심한섭, 오대규, 조민기, 오희복, 우재홍, 정윤섭: 1984년 7월 K병원 중환자실을 중심으로 집단발생한 비페렴성 legionellosis (Pontiac fever)에 관한 역학적 연구. 한국역학회지 7: 44, 1985.
- 2) 최영숙, 정윤섭, 이삼열: *Legionella pneumophila*의 배양과 항체 보유율에 관한 연구. 연세의대논문집 17: 590, 1984.
- 3) Beaty HN: Clinical features of legionellosis. in Legionella. edited by Thornsberry C, Balows A, Feeley JC, Jakubowski W. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 1984, p. 3.
- 4) Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Prior RB: Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 21:674, 1985.
- 5) Brenner DJ, Steigerwalt AG, Gorman GW, Wilkinson HW, Bibb WF, Hackel M, Tyndal RL, Campbell J, Feeley JC, Thacker WL, Skaliy P, Martin WT, Brake BJ, Fields BS, McEachern HV, Cororan LK: Ten new species of *Legionella*. Intern. J. System. Bacteriol. 35:50, 1985.
- 6) CDC: Legionella direct fluorescent antibody reagents. Centers for Disease Control, Atlanta, 1982.
- 7) Dondero TJ, Jr, Rendtorff RC, Mallison GF, Weeks RM, Levy JS, Wong EW, Schaffner W: An outbreak of legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. N. Engl. J. Med. 302:365, 1980.

- 8) Edelstein PH: Laboratory diagnosis of legionnaires disease. in *Legionella*. edited by Thornsberry C, Balows A, Feeley JC, Jakubowski W. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C., 1984, p. 3.
- 9) Fliermans CB: Philosophical ecology: Legionella in historical perspective. in *Legionella*. edited by Thornsberry C, Balows A, Feeley JC, Jakubowski W. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C., 1984, p. 285.
- 10) Fraser DW: Legionellosis: Evidence of airborne transmission. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **353**:61, 1980.
- 11) Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Hallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS, The field Investigatin Team: Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**:1189, 1977.
- 12) Haley CE, Cohen ML, Halter J, Meyer RD: Nosocomial legionnaires' disease. A continuing common-source epidemic at Wadsworth Medical Center. *Ann. Intern. Med.* **90**:583, 1979.
- 13) Herwaldt LA, Gorman GW, McGrath T, Toma S, Brake B, Hightower AW, Jones J, Reindold AL, Boxer PA, Tang PW, Moss CW, Hazel W, Brenner DJ, Steigwalt AG, Broome CV: A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant. *Ann. Intern. Med.* **100**:333, 1984.
- 14) Mallison GF: Legionellosis: Environmental aspects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **353**:67, 1980.
- 15) Meenhorst PL, Reigold AL, Gorman GW, Feeley JC, Van Cronenburg BJ, Meyer CLM, Van Furth R: *Legionella* pneumonia in guinea pigs exposed to aerosols of concentrated potable water from a hospital with nosocomial legionnaires' disease. *J. Infect. Dis.* **147**:129, 1983.
- 16) Meyer RD: *Legionella* infections: A review of five years of research. *Rev. Infect. Dis.* **5**:258, 1983.
- 17) Politi BD, Fraser DW, Mallison GF, Mohatt JV, Morris GK, Patton CM, Feeley JC, Telf RD, Bennett JV: A major focus of legionnaires' disease in Bloomington, Indiana. *Ann. Intern. Med.* **90**:587, 1979.
- 18) Reingold AL, Thomason BM, Brake BJ, Thacker L, Wilkinson HW, Kuritsky JN: *Legionella* pneumonia in the United States: The distribution of serogroups and species causing human illness. *J. Infect. Dis.* **149**:819, 1984.
- 19) Saito A: Tests for Legionnaires' disease. *Clin. Lab. Summer* (no. 24) 925, 1981.
- 20) Thacker WL, Plikaytis, BB, Wilkinson HW: Identification of 22 *Legionella* species and 33 serogroups with the slide agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **21**:779, 1985.
- 21) Wilkinson HW, Reingold AL, Brake BJ, McGiboney DL, Gorman GW, Broome CV: Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of Legionellaceae and Legionella-like organisms by indirect immunofluorescence assay. *J. Infect. Dis.* **147**:23, 1983.
- 22) Wilkinson HW, Thcker WL, Brenner DJ, Ryan KJ. Fatal *Legionella maccachernii* pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **22**:1055, 1985.