

서울시 일부 냉각탑중 레지오넬라의 동정방법별 비교와 영향인자 연구

김기영[‡] · 김윤신 · 송재철 · 이수진 · 김성욱¹⁾ · 최태열²⁾ · 박원석³⁾ · 이철민⁴⁾

한양대학교병원 산업의학과 · 한국생명공학연구소¹⁾ · 국립환경연구원²⁾ · 한양대학교병원 진단검사의학과³⁾
한양대학교 환경 및 산업의학연구소⁴⁾

Comparison of Methods for Identification and the Effects on *Legionella pneumophila* of the Cooling Towers in Seoul

Key-Young Kim[‡] · Yoon-Shin Kim · Jae-Chul Song · Su-jin Lee · Sung-Uk Kim¹⁾
Tae-Youl Choi²⁾ · Won-Seok park³⁾ · Chul-Min Lee⁴⁾

Department of Occupational medicine, Hanyang University Medical Center
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology¹⁾
National Institute of Environmental Research²⁾

Department of Laboratory Medicine Hanyang University Medical Center³⁾
Hanyang University Institute of Environmental and Industrial Medicine⁴⁾

In order to prevent and control Legionellosis outbreaks, we determined level of contamination with Legionellae and the effects on *Legionella* spp. of the cooling towers in Seoul City. This study was carried out to compare the *Legionella* spp. for 68 samples of cooling tower by conventional culture method with there samples by Multiplex PCR(polymerase chain reaction) from July to August in 2002. Also it was analyzed the distribution of *Legionella* subtypes, and evaluated molecular typing methods discrimination function and feasibility, using a arbitrarily primed(Ap)-PCR with M13 reverse primer.

The detection positive rate of *Legionella* spp. was 22(32.3%) by conventional culture method and 33(48.5%) by multiplex PCR method of 68 samples. Multiplex PCR amplification showed 100% of positivity for 22 samples.

Out of 22 *Legionella* isolates, 19 were identified as *Legionella pneumophila* serogroup I and 3 as *Legionella pneu-*

mophila IV. Molecular analysis of 30 *Legionella pneu-* *mophila* serogroup I showed 5 subtypes (Ia in isolates 17, Ib, 2; Ic, 7; II, 2; III, 2) and *Legionella pneumophila* IV showed(VI in isolates 2

V, 1) by Ap-PCR. Most of the effectiveness except turbidity seemed not to be significant with *Legionella* species isolation and it was significant to do not disinfect in multiplex PCR result.

This results suggest that PCR method could be contributed to detection of *Legionella* spp. Also it showed that the Ap-PCR method could be used as a rapid and reproducible tool in tracking legionellosis outbreak.

Key Words: *Legionella pneumophila*; Cooling tower; legionellosis; Conventional culture; Serogroup; multiplex PCR; The effectiveness; Ap-PCR

I. 서 론

현대 산업사회로 급격히 발전함에 따라 점차 편안하고 안락한 삶을 추구하려는 욕구가 증대되고 있고 최근에 건축된 빌딩의 대부분에서는 냉난방의 효율을 증대시키기 위한 여러 종류의 방법들이 시도되고 있으나, 대부분은 중앙집중식 시스템으로 환기와 냉난방을 인위적으로 제어하고 있다.

여름철 냉각탑수는 대부분 수온이 20~30℃로 상승하며, pH는 8.0 전후이고, 원생생물이 $10^2 \sim 10^3/100\text{ml}$ 정도(Fields et al, 1993)가 되어 레지오넬라균 등이 다량으로 증식하기에 적합한 조건이다. 대부분의 냉각탑은 외부 공기에 노출되어 있으며, 냉각탑수의 온도 상승과 태양 광선 등으로 인하여, 유기물의 함량이 높아진 상태에서 호기성 그람음성간균 등의 미생물 증식조건에도 유리하다. 우리나라의 다중이용시설 등에서, 냉각수를 얻기 위해 12~24시간 동안 가동되고 있어 오염된 냉각수가 주 전염원으로 비말을 통해 호흡기계로 병원균이 침투하여, 질병을 유발시키는 다양한 사례(Lester, et al, 1980; Leoni, et al, 2001)가 보고되고 있다. 가장 대표적인 사례는 레지오넬라균 감염(*Legionellae*)으로(강명서 등, 1989). 이 세균은 자연계의 강, 호수, 토양, 오염된 환경수 등 자연환경과 냉각탑수, 기습기, 샤워꼭지, 수도꼭지, 물저장 탱크, 음용수 등에 존재하는 대표적인 그람음성간균(gram-negative bacilli)이다.

레지오넬라균의 주된 발병경로는 음용에 의해서가 아니라, 에어컨디셔너 시스템과 같은 냉방조절 장치의 aerosol 상태로 있는 이 세균을 흡입함으로써 발병된다(김민자, 1995). 레지오넬라가 일으키는 질환은 주로 15-30%의 치사율을 갖는 급성폐렴형의 재향군인병(*Legionella pneumophila* serogroup I)과 독감양상을 나타내는 비폐렴형인 폰티악 열(Pontiac fever)의 두 가지 양상으로 발생(강명서 등, 1989; 김윤신, 1995; OSHA Technical Manual, 2002)하는 경우가 대부분이며, 국내에서도 이미 집단 발생 사례(김정순 등, 1985)

가 보고되었다. 특히 이 질병은 노약자, 만성 폐질환자, 면역 기능이 저하된 환자들에게 이환되어 적절한 치료를 받지 못할 경우 치명적이 될 수 있는 질환(박경석 등, 1988)이나 독감 바이러스나 홍역 바이러스처럼 감염된 사람으로부터 직접 전파되지는 않는다고 알려졌다(김민자, 1994; 조규홍 등, 1997).

한편 물을 매개로 하는 제3종 법정 전염병인 이 세균은 수중 먼지 내의 사멸된 세균을 좋은 영양물로 이용한다고 알려졌다. 이외에도 철(Fe)이 레지오넬라균의 성장을 촉진시키며, pH, 탁도 등도 레지오넬라균의 성장 조건에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고(정현미, 1996), 엔도톡신의 존재 가능성도 높은 편이다. 또한 레지오넬라균은 염소나 그 외 다른 여러 종류의 약품 투입에도 불구하고 거의 사멸되지 않는 것으로 알려져 있으며, 현재 냉각탑의 레지오넬라균 제거 목적으로 국내에서는 염소처리, 고온살균법, 자외선 조사, 오존 처리, 구아-온 이온화법 등이 사용되고 있으나, 어느 방법도 레지오넬라균 제거에는 완벽하지 않은 것으로 인식되고 있다(국립보건원, 2002).

현재 우리나라에서 환경 오염원으로부터 레지오넬라균의 분리 및 동정에는 주로 고전적인 배양방법으로 전용 선택배지를 사용하여 배양 후 혈청학적 응집반응(sero grouping)을 이용하고 있다. 그러나 일반 배양 검출법은 배양 후 검출단계까지 최소 72시간 이상이 소요되며, 균종의 동정에 필요한 생화학 검사와 혈청학적 동정까지 포함하면 적어도 4~5일이 소요되고 있는 실정이다.

최근에는 환자와 오염원이나 발생원으로부터 빠른 시간 내에 레지오넬라균을 검출(Nele et al, 2001)하고 민감도를 높이기 위한 분자생물학적 접근방법 중 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 방법이 널리 사용되고 있다. 이 중에서도 레지오넬라균속의 검출 목적으로는 최근에 시도되고 있는 multiplex PCR과 분리된 *Legionella pneumophila* serogroup I의 subtyping을 신속하게 동정할 수 있고 역학조사 시 Ap-PCR

(arbitrarily primed polymerase chain reaction) 방법이 유전형별 분석기법으로 도입되어 응용되고 있다(Adamsson et al, 2000).

Multiplex PCR은 primer를 두 쌍 이상 사용하는 방법으로, 기존의 단일 primer를 사용하는 PCR 방법에 비해, 비특이적인 유전자의 증폭을 방지할 수 있어 레지오넬라균의 검출에 적합한 방법이라고 보고하고 있다(Miller et al, 1993). 이 방법으로는 최소 1ml 내에 존재하는 극미량의 DNA를 검출하여 10~100개의 균까지도 검출할 수 있을 정도로 민감도가 높다고 알려져 있다(Field, 1997; 김권범 등, 1998). 또한 AP-PCR은 사전에 염기서열의 정보가 없어도 DNA로부터 복수의 DNA 단편을 동시에 증폭시킬 수 있기 때문에(Welsh & McClelland et al, 1990) 사람과 환경으로부터 분리된 균주의 역학조사 시 혈청학적 동정의 신속성 보완과 유전학적 아형을 구별하기 위한 분자역학적 조사 도구의 새로운 기법으로 활발히 연구되고 있다(Grattard et al, 1996; Cynthia et al, 1997; 이해경 등, 2001).

따라서 본 연구에서는 서울시 일부 대형건물에서의 냉각탑수(cooling tower water)에서 분리된 레지오넬라균을 대상으로 동정방법별 양성 반응 및 레지오넬라균의 생육에 미치는 영향인자에 대해 12시간 가동하고 밤에는 가동하지 않는 곳과 24시간 계속하여 가동하는 곳을 각각 구분하여 조사하였다. 또한 바이오에어로졸의 특성에 따른 전파 근원 추적을 위하여 냉각탑 주변과 중앙 공조기 시스템 내부의 실내 에어컨 주변에서 실내 공기중(airborne)에서 레지오넬라균의 포집을 각각 시도하였으며, 다른 한편으로는 고전적인 일반 배양법과 PCR검출기법을 수행하여 각각의 양성률을 평가하여 PCR 방법의 신속한 검출의 유용성을 검토하고, 분리된 *Legionella pneumophila*중에서 신속 동정의 기법으로 Ap-PCR방법을 사용하여 유전학적 아형의 분포를 알아내어 돌발적인 레지오넬라균주의 감염원 규명과 초기 진단을 위한 대책의 기초 자료를 제공하고자 하였다, 또한 냉각탑수

에 내에 존재하는 *Legionella*의 검출에 영향을 미치는 오염인자 및 냉각탑의 운용 시간형태관리상태 및 소독실시 등이 레지오넬라균 양성률에 미치는 영향인자를 규명하여, 향후 국내 냉각탑수의 실태 및 레지오넬라균의 관리방안 자료로 활용하기 위한 목적으로 실시하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구대상 및 기간

레지오넬라균 배양을 위해 습도 및 기온이 높은 7월 30일에서 9월 15일까지 서울시내 성동구 주변에서, 임의 선정된 68개 대형건물에서, 냉방기 가동시 약 1.5 ℓ의 냉각탑수를 채취하였다.

2. 연구방법

1) 냉각탑 수(waterborne)

약 1.5 ℓ의 냉각탑수를 채취하여 레지오넬라균 일반배양과 PCR 분석을 위해 전처리 목적으로 채취하였으며, 일부는 오염인자와의 영향인자 분석을 위하여 50ml의 conical tube를 3개 이상 동일장소에서 채취하여 사용하였다.

2) 공기 중(airborne)

실내 공기중의 레지오넬라균의 비말 여부를 확인하기 위해 공조시스템이 가동되고 있는 실내의 중앙냉방 에어컨의 주변지점의 1.5m높이에서 공기시료를 채취하였다. 이때 사용된 공기시료 포집기는 oxoid sampler(M.A.Q.S. II)에 혈액한천배지(BAP; blood agar plate), 선택배지인 BCYE- α (buffered charcoal yeastextract- α -ketoglutarate : 이하 BCYE- α 한천배지)선택배지와 레지오넬라균의 환경수에 적합한 선택배지인 DGVP배지(Bromthymol-blue + Bromcresol purple/dye, glycine, polymixin B 등; 이하 DGVP 배지)를 이용하였으며 공기는 각각, 1000 ℓ(120 LPM)를 채취하였다.

3) 냉각탑수의 영향인자

(1) 대상건물의 특성

서울시 성동구 주변을 중심으로 임의 선정된 다중이용시설의 형태를 가진 대형 건물을 중심으로 주로 낮 시간만 가동하는 사무실, 소규모 상가 등 12시간 냉방기를 가동(N=32)하는 군(group)과 24시간 계속하여 가동(N=36)하는 군(group)의 대형백화점, 병원 등을 중심으로 하였다.

(2) 냉각탑수의 일반적 오염 인자

냉각탑수의 오염인자 중에서 탁도는 탁도계(HACH 2100P Turbidimeter, USA), 잔류 염소량은 잔류염소 측정계(HACH pocket ColorimeterTM, USA), pH는 pH meter(CE, ORION 420A, Bosoton, USA)를 사용하였다. 중금속 가운데서 철(Fe), 구리(Cu), 납(pb)의 농도는 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer, Perkin-Elmer 3300, Norwalk, USA)로 분석하였다. 엔도톡신은 전용기기인(Kinetic Microplate Reader(Vmax; Molecular Devices Corp, Menlo Park, Calif. USA)로 사용하였다.

(3) 냉각탑 특성 및 시스템

본 연구의 68개 냉각탑 중 구조의 형식, 공기흐름에 의한 구분, 열전달 방식, 소독 여부 그리고 건물내의 냉각탑을 관리함에 있어, 용역 혹은 자체관리 등을 조사 후, 레지오넬라의 일반 배양 결과와 PCR 방법의 검출결과에 관한 영향을 조사하였다.

(4) 내독소(엔도톡신: endotoxin) 전처리 및 분석

그람음성(Gram negative) 세균들이 생성하는 내독소(이하 엔도톡신)는 냉각탑수의 원액인 벌크시료를 sonication 과정을 거치지 않고 1,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층을 사용하였으며, 공기 중 시료는 카셀트의 여과지를 원심분리용 튜브(50 ml, Polypropylene 재질)로 옮겨 전처리를 시작하였다. LAL(Limulus Amebocyte Lysate)water 15ml를 각각의 튜브에 넣고 4.8 KHz sonicator bath(Branson 8510)에서 1시간 동안 추출하였다. 원심분리용 튜브를 원심분리기(Hamil Union 55R)에 넣고 1,000rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 원심분리된 상등액의 일정량(약 2 ml 정도)을 취하여 엔도톡신을 분석하기 위한 시료로 사용하였다.

표준시료 및 완충액의 제조시 표준시료는 Endosafe사에서 제조한 10ng/vial의 표준품(Control Standard endotoxin, *E. coli* 055: B5, Lot #EX14032)과 LAL reagent water(Lot #99732003)을 이용하여 제조하였다. 10ng의 표준품이 들어있는 병에 LAL water를 3.6ml 첨가하여 2.7778 ng/ml 엔도톡신 분석용 표준원액(stock solution)을 제조하였으며, 표준원액의 농도는 Endotoxin Unit으로 환산시 50 EU/ml이었다. (1ng = 18EU). 표준원액을 10배씩 단계별로 희석하여 표준시료(standard solution)를 제조하였으며, 표준시료의 농도범위는 0.01 EU/ml에서 100 EU/ml였다.

한편, 모든 시료에 첨가되는 완충액 용액은 2개의 LAL(KTA² No 1197 50-test)에 각각, 5.2ml씩 든 specific buffer를 첨가하여 제조하였다. 공시료, 표준용액, 전처리된 시료의 100 μ l를 96 well(Costar 3599)에 마이크로피펫으로 옮긴 후 표준용액을 포함한 모든 시료는 교반기(vortex mixer)로 30초 동안 강하게 혼합하였으며, 시료용 초차기구와 플라스틱 용기는 멸균하거나 멸균용 재질을 사용하였다(박동욱 등, 2001).

① 엔도톡신 분석

엔도톡신 분석은 Kinetic Microplate Reader(Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, Calif.)로 행하였다. 96 well을 기기 내 incubator에서 37°C, 15분 동안 미리 엔도톡신을 활성화시킨 후 96well을 꺼낸 다음 8개의 마이크로피펫(Biohit-taker)으로 100 μ l의 완충액을 모든 시료에 첨가하고 96 well 각각을 340nm에서 75분 동안 3초마다 설정한 OD에 도달하는데 소요되는 시간을 분석하였다.

설정된 OD 값은 각각 “0.03”과 “0.05”로 구분하여 분석한 다음 검량선의 상관

계수가 큰 OD 값을 선택하여 엔도톡신 양을 정량 하였다(박동욱 등, 2001).

4) 통계처리

통계는 SAS 통계 프로그램(ver. 8.1)을 이용하였고, 영향인자 등은 Sapiro-Wilk test 및 t-test를, 변수 비교는 분산분석(ANOVA) 및 다중비교분석(multi-comparison test)을 실시하였으며, 변수간 미치는 영향은 상관분석(Correlation) 및 회귀 분석(Regression)을 실시하였다.

3. 분석방법

1) 레지오넬라균 일반배양(conventional culture)을 위한 전처리

① 냉각탑수의 일반배양

채취된 냉각탑수는 양압여과기에 여과지(0.2 μ m)를 통과시켜 균을 모은 후 여과지를 잘게 잘라 생리식염수 20ml에 부유시켰다. 레지오넬라균의 배양을 위하여, 0.1ml의 부유액을 취하여 50℃에서 30분간 열처리한 후, BCYE- α 한천배지에 각각 0.1ml 및 0.01ml를 각각 획선 도말하고 접종하여 37℃, 5% CO₂ 하에서 5~7일간 배양하였다. 배양조건은 호기성이고 습기가 많을 때 잘 증식되므로, 내부의 고습도를 유지하기 위해 별도로 오븐에 물을 넣어 고습을 유지시켰다. 3일째부터 자란 집락 중 회백색, 약간 투명감이 있고 습윤한 집락으로 특유한 신 냄새가 있으면 레지오넬라균으로 추정하였다. 독립 집락 여러 개를 BCYE- α 한천배지 및 혈액한천배지(BCP)에 계대 배양하고 그람염색을 하였다(박석기 등, 1999). BCYE- α 한천배지에서 발육하고 혈액한천배지(BAP)에서 발육하지 않는 그람 음성간균을 레지오넬라균으로 추정하고, 그람 염색성, BCYE 발육성, oxidase, catalase, urease 등을 생화학적 성상으로 이용하였다.

② 생화학적 검사 및 판정

BCYE- α 한천배지에 접종된 배지상에 형성된 집락을 떼어 내어 그람염색 실시 후, 전형적인 그람음성간균인 것을 1차로

혈액한천배지에 배양하여 증식되지 않은 균주를 대상으로 동정을 위한 간단한 생화학적 감별 실험을 실시하였다.

oxidase test: 0.5% tetramethyl paraphenylenediamine dihydrochloride의 수용액을 묻히고 여기에 시험균 집락을 습식도말하여 10초 이내에 청색이 되는 것을 양성으로 하였다.

catalase test : 시험균 집락을 멸균된 슬라이드에 습식도말한 후 3%의 과산화수소를 떨어뜨리고 기포가 생기는 것을 양성으로 하였다.

Indole test : tryptone broth에 시험균을 식균하고 24~48시간 배양후 Kovac's reagent (amyl alcohol 150ml, P-dimethylaminobenzaldehyde 10g, concentrated hydrochloric acid 50ml) 0.5ml을 넣고 분홍빛이나 적색의 환을 나타내는 것을 양성으로 하였다.

urease test : urea배지(urea를 가수분해하여 ammonia와 CO₂가 형성되어 배지가 알칼리화 되어 phenol red 지시약에 의해 분홍색 변색됨)니들(needle)로 균을 따서 24시간 배양 후, 분홍색깔을 나타내는 것을 양성으로 판정하였다(Chemical Microbiology, 1995).

③혈청형 분석(Sero Grouping)

분리된 레지오넬라 균주를 순수분리하여 배양한 후, serotyping kit(Seiken, Japan)를 이용하여 혈청형을 구분하였다. 세균학적 특성과 생화학적 특성에 의해 레지오넬라균으로 분리된 시험 균주의 그룹형별 분류는 다음과 같이 실시하였다. 생리식염수에 시험균을 고농도가 되도록 현탁시키고 100℃에서 1시간 또는 120℃에서 15분간 가열처리한 후 각 칸에 항혈청을 한 방울씩 떨어뜨리고 마지막 칸에는 생리식염수를 떨어뜨렸다. 각 칸에 항원 부유액을 한 방울씩 떨어뜨린 다음 항원액과 항혈청을 잘 혼합하고, 슬라이드 글라스를 앞뒤로 기울여 응집 유무를 관찰하였으며, 이때 대조균의 응집 유무도 동시에 관찰하여 생리식염수와 항원액 반응에서 자가응집이 일어나지 않고 항혈청-항원액 반응에서 1분 이내에

강한 응집반응을 일으키는 혈청형을 혈청그룹(typing group)으로 확인하였다(박석기 등, 1999).

④ 중합효소 연쇄반응(PCR) 분석

일반배양과 동일하게 전처리된 시료를 이용하여, Multiplex PCR기기는(BIO-RAD Gene cyclerTM, USA)제품으로 분석하였으며, AP-PCR은 (Perkin-Elmer 9600, USA)을 각각, 사용하였다.

2) PCR 분석을 위한 전처리

① 냉각탑수 분석

PCR 분석을 위해 상기방법으로 전처리된 냉각수 원액 1ml를 취하여 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액은 제거하고, 침전된 100 μ l를 취하여 사용하였다.

② 공기 중 시료 분석

선택배지인 BCYE- α 한천배지, DGVP 배지를 사용하여, 실내의 공조 시스템의 에어컨 주변에서 포집한 시료를 이용하여 *Legionella*균의 검출 가능성 여부를 조사하였다.

③ 다중 중합효소 연쇄반응(Multiplex PCR)

Primer는 모든 레지오넬라 균종에 공통적으로 존재하는 5S-rRNA 유전자에서 유래한 5S-1(5'TCT-TGG-CGA-CTA-TAG-CGA-TTT 3'), 5S-2(5'ATC-CTG-GCC-ATG-ACC-TAC-TTT 3')한 쌍과 *Legionella pneumophila* 혈청균에 특이한 mip 유전자에서 유래한 mip-X(5' GAT- GTT-ATT-CCG-GAA-GCA-ATG 3')와, mip-Y(5'TTG-CAA-AGC-TTC-TGT-CCA-TCC 3')한 쌍을 부분 합성하였고, 두 쌍을 동시에 사용하는 Multiplex PCR을 시행하여 118bp와 383bp의 증폭물이 생성되도록 하였다. Template는 50 μ l의 환경수 침전물을 prote-nase-K를 함유한 완충액으로 처리하여 직접 사용하였는 데 침전물에 50 μ l의 Tris-HCl(pH 8.0)을 가하여 재부유시키고 lysozyme(100mg/ml)5 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응하였다. 여기에 100 μ l의 K-완충액(100mM Tris-HCl

(pH8.0), 1mM EDTA(pH 8.0), 1% Tween 20(wt/vol)]와 2 μ l의 proteinase K(20mg/ml)를 가하고 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 10분간 끓여 proteinase K를 불활성화하였으며, 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 뒤 상층액 10 μ l를 취해 template로 사용하였다.

PCR 반응액은 template 10 μ l에 10 \times PCR 완충액 5 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, 20 μ M primers(5R-1, 5R-2, mip-X, mip-Y) 각 1 μ l, 0.5U의 Taq polymerase(Boehringer Mannheim, Germany)와 적당량의 증류수를 가하여 전체가 50 μ l되게 제조한 후 DNA Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)를 사용하여 PCR을 행하였다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분 동안 denaturation시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 56 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension을 35회 반복한 후, 최종 extension을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 시행하였다. 반응 종료 후 10 μ l를 취하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator 하에서 Polaroid 667 film으로 촬영하였다. PCR의 오염을 최소화하기 위하여 검체의 조작과 시약준비는 각각 분리된 방에서 시행하였고 각 반응마다 레지오넬라 균주의 DNA가 제외된 음성대조를 같이 포함시켰다.

polymerase(Boehringer Mannheim, Germany)와 적당량의 증류수를 가하여 전체 50 μ l로 만든 후 DNA Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 초회 denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 56 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension을 35회 반복한 후, 최종 extension을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 시행하였다. 반응 종료 후 10 μ l를 취하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator 하에서 Polaroid 667 film으로 촬영하였다. PCR의 오염을 최소화하기 위하여 검체의 조작과 시약준비는 각각 분리된 방에서 시행하였고 각 반응마다 레지오넬라균의 DNA가 제외된 음성대조를 같이 포함시켰다(김권범, 1998; 서울시보건환경연구

원, 2000)

④ Ap-PCR (Arbitrarily primed - PCR)

Ap-PCR은 비특이적인 primer를 DNA 내 임의의 염기서열에 결합시켜 증폭시키는 방법으로 신속하고 간편하다는 점과 분석하고자 하는 균주의 DNA 염기서열에 대한 정보가 없더라도 시행할 수 있어 비교적 그 사용이 확산되고 있다. Welsh 등이 제시한 방법(Welsh et al, 1990)을 다소 변형하여 AP-PCR을 시행하였고, Primer는 M13 reverse primer(5'CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC 3')를 사용하였다. BCYE- α 한천배지에서 72시간 이상 배양하여 자란 균 집락을 취하여 McFarland Nephelometer Standard I에 맞추어 세포 부유액이 3×10^8 CFU/ml되도록 조절하였다. 균액 1ml을 Eppendorf tube로 옮겨 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 50 μ l 침전물에 Tris-HCl(pH 8.0) 50 μ l를 가하여 재부유시키고 lysozyme (100mg/ml) 2 μ l를 가하여 잘 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 위에서 사용된 K-완충액 100 μ l와 proteinase K(20mg/ml) 2 μ l를 가하여 잘 혼합하고 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후 앞에 기술한 바와 같이 proteinase K를 불활성화시키고 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 얻은 상층액 10 μ l를 template로 사용하였다.

PCR 반응액의 준비는 template DNA 10 μ l, 10 \times PCR 완충액 5 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, 20 μ M M13 reverse primer 2.5 μ l, 1 unit의 Taq polymerase(Boehringer Mannheim, Germany), 25mM의 MgCl₂ 8 μ l를 섞고 적당량의 증류수를 가하여 전체가 50 μ l가 되게 조절하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 4초간 초회 denaturation 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 35회 반복 시행하고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 최종 extension을 시행하였다. 종료 후 반응액 10 μ l를 취하여 1.5% agarose gel에서 150V로 1시간 30분동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV illuminator하에서 관찰하였다.

재현성을 관찰하기 위하여 Ap-PCR은

동일 균주에서 각각, 3회 이상 반복 시행하였다(Welsh et al, 1990; Cynthia et al, 1997; 김권범 등, 1998).

III. 연구 결과

1. 냉각탑수의 일반배양 결과

1) 레지오넬라균의 집락수 (colony count) 분포

시료를 채취한 대상 냉각탑수 68개 중 32.35%(22/68)에서 레지오넬라균주가 분리되었으며 집락수의 분포는 1,000 CFU/ml 이하는 5.88%(4/68), 1,000-9,999 CFU/ml인 곳은 17.60%(12/68), 10,000 CFU/ml 이상은 8.82%(6/68)이었다.

사무실에서는 13.33%(2/15)에서 레지오넬라균이 검출되었으며 100-999 CFU/ml 및 10,000 CFU/ml에서 각각, 1개의 집락수 (6.67%(1/15))가 검출되었다. 소규모 상가는 63.63%(7/11)에서 검출되었으며, 1,000-9,999 CFU/ml에서 45.45%(5/11)로 가장 많이 검출되었다. 제조 공장의 대상 결과는 1,000-9,999 CFU/ml가 20%(1/5)이었고, 나머지 4군데에서는 검출되지 않았다. 기타 극장 1곳에서는 분리되지 않았다. 또한 대형호텔에서는 총 11곳 중 9.09%(1/11)에서 검출되었으며, 집락수는 1,000-9,999 CFU/ml이었으며, 병원은 총 16곳 중 25.00%(4/16)에서 검출되었으며, 집락수는 1,000-9,999 CFU/ml와 10,000 CFU/ml 이상에서 각각, 12.5%(2/16) 검출되었다. 이외에 대형백화점의 경우에는 총 25.00%(9/36)에서 레지오넬라균이 검출되었고 집락수는 1,000-9,999 CFU/ml가 33.33%(3/9)으로 가장 검출율이 높았으며, 100-999 CFU/ml가 22.22%(2/9), 10,000 CFU/ml 이상이 1곳으로 조사되었다(Table 1).

2) 생화학적 검사 및 판정

냉각탑수에서 레지오넬라균종으로 분리된 균주는 BCYE- α 한천배지에서 3~5일 배양 후 집락을 형성하였다. 그림 1은 buffered charcoal yeast agar 등 cystine과 철(Fe)화합물이 들어 있는 검은색을 띤

Table 1. Incidence of *Legionella* spp. isolated from 68 Cooling towers in Seoul.

Cooling tower		No. of samples	Distribution of positive for Colony count (CFU/ml)				
			NG*	10-99	100-999	1,000-9,999	> 10,000
12 hrs operation	office	15	13	-	1	-	1
	small market	11	3	-	1	5	2
	factory	5	4	-	-	1	-
	Theatre	1	1	-	-	-	-
	sub total	32	21	-	2	6	3
24 hrs operation	Big Hotel	11	10	-	-	1	-
	Hospital	16	12	-	-	2	2
	Department store	9	3	-	2	3	1
	sub total	36	25	-	2	6	3

* : No Growth

배지(BCYE)에서 배양된 레지오넬라균의 형태(morphology)를 나타낸 것이다.

일반적인 균종의 생화학적 동정의 성상으로는 레지오넬라균의 감별을 위한 시험종목 중 그람염색을 실시한 결과, 그람음성 간균의 전형적인 형태를 띠고 있었으나, 형태는 일반 대장균 등의 그람음성 간균(Figure. 2 B)과는 다소 차이가 있는 가늘고 끝이 긴 특징적인 형태를 나타내고 있었다(Figure 2 A).

일부 시도한 검사종목(정윤섭 등, 1986) 중, oxidase 및 catalase 시험에서는 모두 양성을 나타낸 반면, urease와 Indole 시험에서는 모두가 음성을 나타내었다(Table 2). 이는 전형적인 레지오넬라균의 성상을 나타내고 있으나, 일반 그람음성 간균과의 식별에 대한 것이라기 보다는 동시에 사

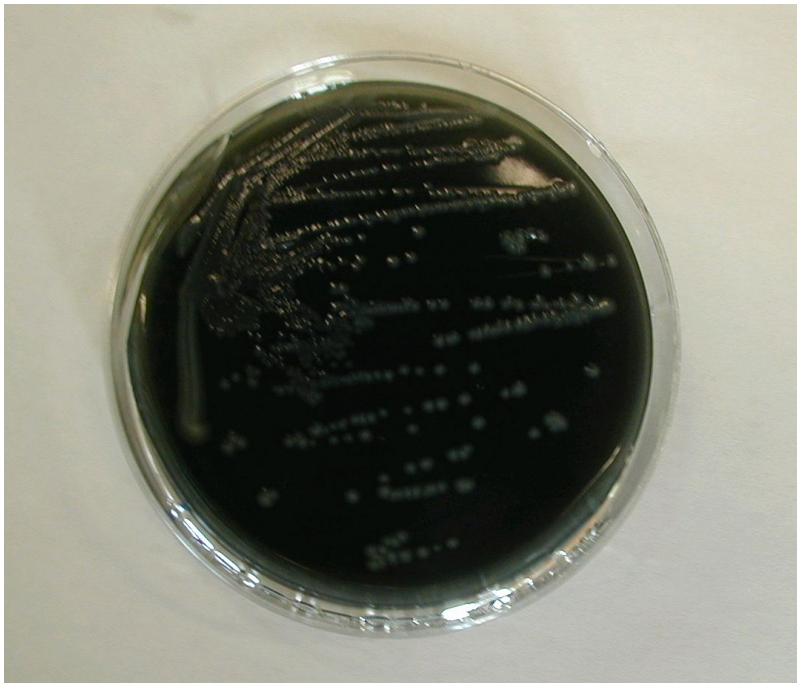
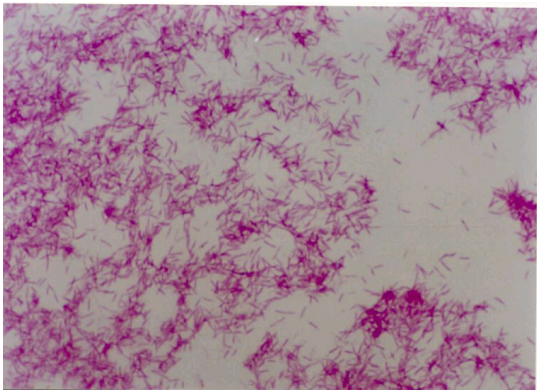
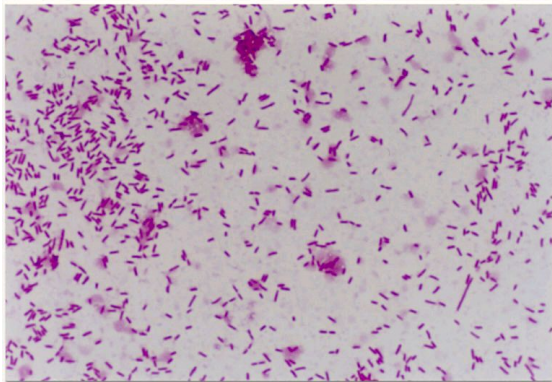


Fig 1. Growth pattern of *Legionella pneumophila* on BCYE- α medium



(A)



(B)

Fig 2. Light micrographs of Gram stained *Legionella pneumophila* : (A) and *E. coli* (B).

Table 2. Biological and biochemical properties of *Legionella* strain isolated from the water of cooling tower in Seoul.

Isolated no.	Characteristics	BCYE- α	BAP	Gram stain	Oxidase	Catalase	Urease	Indole
Standard strain (ATCC#33155, SG/3)		+	-	-	\pm	+	-	-
1		+	-	-	+	+	-	-
2		+	-	-	+	+	-	-
3		+	-	-	+	+	-	-
4		+	-	-	+	+	-	-
5		+	-	-	+	+	-	-
6		+	-	-	+	+	-	-
7		+	-	-	+	+	-	-
8		+	-	-	+	+	-	-
9		+	-	-	+	+	-	-
10		+	-	-	+	+	-	-
11		+	-	-	+	+	-	-
12		+	-	-	+	+	-	-
13		+	-	-	+	+	-	-
14		+	-	-	+	+	-	-
15		+	-	-	+	+	-	-
16		+	-	-	+	+	-	-
17		+	-	-	+	+	-	-
18		+	-	-	+	+	-	-
19		+	-	-	+	+	-	-
20		+	-	-	+	+	-	-
21		+	-	-	+	+	-	-
22		+	-	-	+	+	-	-



Fig 3. Scanning electron micrograph of *Legionella pneumophila* (ATCC 33155 S/G 3)

용된 표준균주를 사용함에 있어 감별목적
으로 실시하였다. 또한 배양된 표준균주
집락중에서, 현적표본법의 형태(morpho-
logy)관찰목적으로 전자현미경을 실시하
여 촬영하였으며, 표준 대상균주는 flage-
lla가 없는 균종이었다(Figure 3). 이때 사
용한 표준균주는 *Legionella pneumophila*
ATCC 33155(S/G 3), ATCC 27853을 고려
대학교 부설 생명과학연구소 및 국립보건
원에서 각각 분양 받아 사용하였다.

2. 공기 중 결과

68개의 건물 내 중앙냉방 에어컨의 주
변지점 실내에서, 공기시료 포집기인
oxid air sampler(M.A.Q.S. II)에 BCYE- α
한천배지, DGVP배지를 사용하여 측정한
공기중의 결과에서, 레지오넬라균은 전혀
분리되지 않았다.

Table 3. Comparison of *Legionella* spp detected by conventional culture and multi-PCR methods from water samples of 68 cooling towers.

Cooling tower		No.of samples	No. of Total positivity (%)		Legionellae, Sero-Group	
			Conventional - culture	multiplex PCR	Group I	GroupVI
12 hrs operation	office	15	2 (13.33)	4(26.67)	1	1
	small market	11	8 (72.73)	9(81.82)	8	-
	factory	5	1 (20.00)	2(40.00)	1	-
	Theatre	1	-	-	-	-
	sub total	32	11 (34.38)	15 (46.88)	10	1
24 hrs operation	Hotel	11	1(9.09)	3(27.27)	1	-
	Hospital	16	4(25.00)	8(50.00)	4	-
	Department store	9	6(66.67)	7(77.78)	4	2
	sub total	36	11(30.56)	18(50.00)	10	1
	Total	68	22 (32.35)	33(48.53)	19	3

3. 혈청형 분석(Sero typing) 결과

총 68개 냉각탑수의 시료의 배양검사에서 레지오넬라균은 22주(32.35%)가 분리되어 혈청형에 따른 레지오넬라 군주를 분석한 결과 분리된 군주중 *Legionella* Serogroup I 이 86.4%(19/22), Serogroup VI 가 13.6%(3/22)로 검출되어, *Legionella* serogroup I 인 *Legionella pneumophila*가 대다수를 차지하고 있었다(Table 3).

4. 일반배양(Conventional culture) 및 Multiplex PCR 분석결과.

전체 검사 대상 68곳 중 레지오넬라균이 일반 배양된 곳은 32.35%(22/68)이며, PCR 결과가 양성으로 검출된 곳은 48.53%(33/68)이었다. 이 중 사무실인 경우 일반배양은 13.33%(2/15), PCR 결과 양성인 곳은 26.67%(4/15)였으며 소규모 상가는 72.73%(8/11)에서 일반배양이 되었으나 PCR 결과 양성으로 나타난 곳은 81.82%(9/11)이었다. 공장에서는 일반배양에서 20.00%(1/5)의 양성을 보였으며, PCR 결과는 40.00%(2/5)이었으나, 극장에서는 일반배양과 PCR 결과 모두 음성을 나타냈다. 또한 호텔에서는 총 11곳 중 9.09%(1/11)에서 레지오넬라균이 일반배양에서 검출된 반면 PCR 결과는 27.27%(3/11)에서 양성으로 나타났다. 병

원에서는 25.00%(4/16)에서 일반배양에서 검출되었고, PCR 결과 양성인 곳은 50.00%(8/16)이었다. 이외에 백화점은 일반배양 결과 66.67%(6/9)에서 양성을 나타낸 반면 PCR 반응 결과 양성인 곳은 77.78%(7/9)으로 조사되었다.

냉각수 탑의 시간 가동군에 따른 *Legionella* 균의 분리 결과는 일반배양 결과 12시간 가동군과 24시간 가동군 각각, 16.18%(각각, 11/32, 11/36)에서 *Legionella* 균이 분리되었으며, PCR 결과에서는 12시간 가동군 22.06%(15/32)과 24시간 가동군 26.47%(18/36)에서 양성반응을 나타내었다(Table 3). 또한 레지오넬라균이 분리되었던 22장소에서의 PCR 결과는 모두 양성을 보였으며, 다른 11곳은 PCR 결과 역시 양성이었으나, 일반배양에서는 음성을 나타냈다. 한편, 레지오넬라균의 분리를 위해 사용된 multi-PCR 방법을 이용한 결과 *Legionella pneumophila*(mip-X, mip-Y)와 *Legionella species*(5R-1, 5R-2)이 각각 383bp와 118bp에서 각각 증폭산물로 관찰되었다.

5. Ap-PCR 분석 결과.

1) Ap-PCR 형별 분석

Multiplex PCR에서 양성 반응을 나타낸 33주를 대상으로 분석한 Ap-PCR에 의한 형별 분석에서 Ia, Ib, Ic, II, III, IV, V형

의 7개 형별로 구분하였다. 판독기준은 Welsh 등이 분류한 참고 기준법을 인용(Welsh 등, 1990; 김권범 등 1998; 이해경 등 2001)하였으며, 유전자적 동일 군주나 연관성이 있는 군주에 대한 기준이 아직 확립되어 있지 않기 때문에, 전반적으로 주요 절편들의 양상이 일치할 경우 부분적으로 연관성이 있는 것으로 구분(Ia-Ic)하였고, 양상이 다른 경우는 연관성이 없는 군주(II-V)로 구분하였다. *Legionella pneumophila* serogroup I의 30주 절편양상은 Ia형 17주, Ib형 2주, Ic형 7주, II형 2주, III형 2주 등 5개의 아형으로 구분되었고, *Legionella* serogroup VI의 3주는 IV형이 2주, V형 1주로 절편 양상을 나타내었다(Figure 5, Table 4).

Ap-PCR pattern은 DNA fragment의 수와 전기영동상의 위치에 따라 400 ~ 3000bp 사이에서 3개 ~ 11개에 걸친 band를 각기 나타내었다. 이 band의 분석을 보다 용이하고 객관성을 띠기 위해 Molecular analysis system (BioID Version 99 software, BIO-PROFIL[®], USA)을 이용하여 분류하였다. (Figure 6 - 7)

6. 냉각탑수의 영향인자

1) 냉각탑수의 일반적 오염인자

냉각탑수의 오염인자 중 레지오넬라의 검출에 영향을 미칠 것으로 판단되는 요

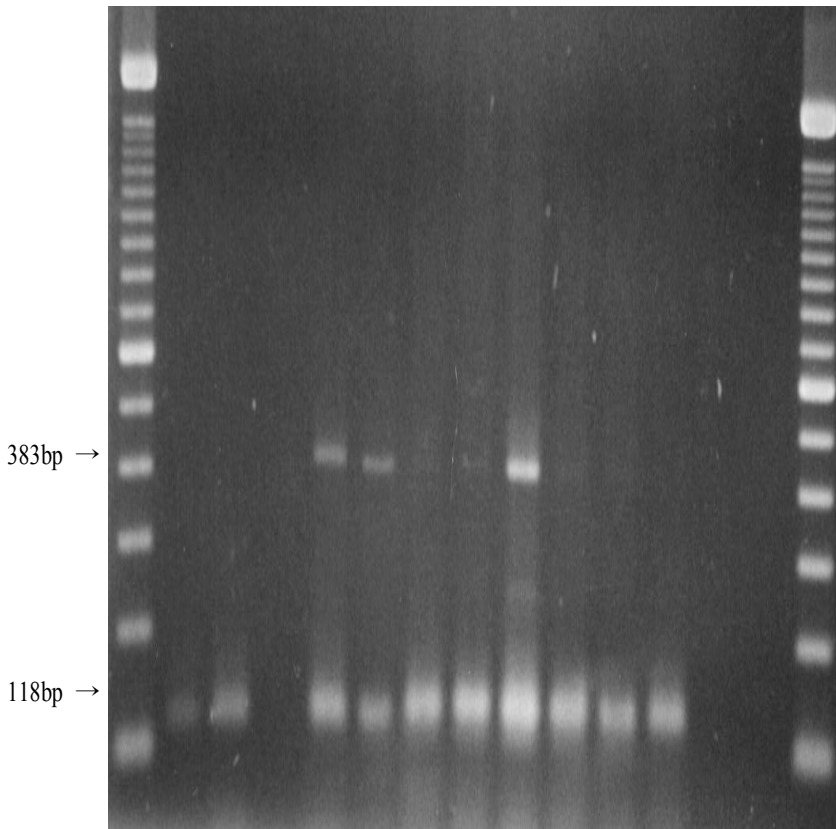


Fig 4. Gel electrophoresis patterns of *Legionella* spp. by Multiplex PCR (1.5% agarose gel electrophoresis showing 2 amplified products of mip of *Legionella pneumophila* of 383 bp and *Legionella* species 118 bp, respectively).

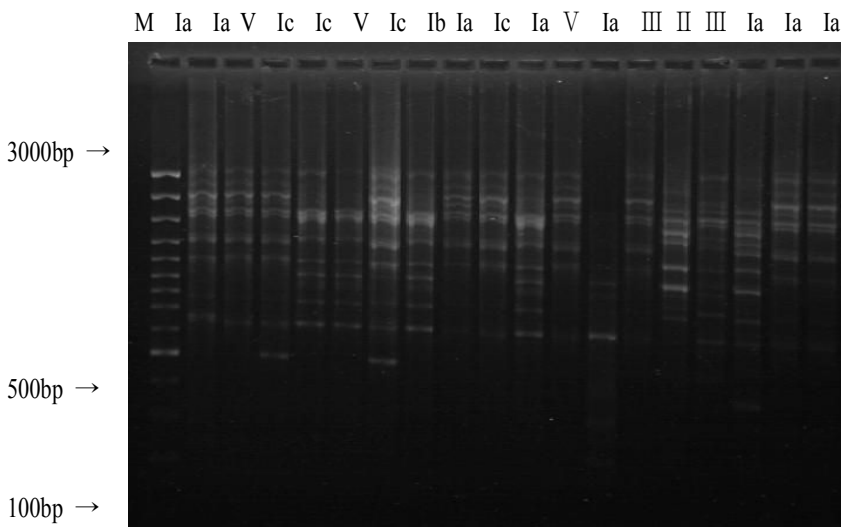


Fig 5. Gel electrophoresis patterns of *Legionella* spp. by Ap-PCR (1.5% agarose gel electrophoresis showing 4 ~11 amplified products of M13 reverse primer between 400 bp~3000 bp).

인(agents)중에서 탁도인 경우 12시간과 24시간 가동 군에서의 기하평균은 각각, 1.02 ± 2.20 , 0.69 ± 1.87 로 통계적으로 유의한 차이를 보였으며($p < 0.05$), 구리농도 역시 12시간 가동 군과 24시간 가동 군에서 각각 0.10 ± 2.14 , 0.06 ± 2.20 으로 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 5).

2) 냉각탑 특성 및 시스템

연구대상의 냉각탑의 특성의 종류에 따른 레지오넬라균의 분리 양성률에 미치는 결과 및 특성은 다음과 같았다 (Table 6). 탑의 형체가 사각형 25% (17/68), 원형66.2%(45/68), 연결형은 8.8% (6/68)로서 원형(라운드)이 주류를 이루고 있었으며, 일반배양 결과와 PCR결과에서 각각 45.5%(14/68), 30.8% (21/68)의 양성률을 나타내고 있었으며, 냉각탑의 형식에 따른 차이는 일반배양 결과와 PCR 결과 모두 통계적으로 유의하지 않았다.

공기흐름의 구분에 따른 것으로, 냉각탑의 물과 하부에서 올라오는 공기가 수직으로 이동하는 형태의 대향류형(Counter flow type; Figure 8)은 45개(66.2%), 냉각탑의 물과 측면에서 들어오는 공기가 90°로 교차하는 형태인 직교류형(Cross flow type; Figure 9)은 23개(33.8%)로, 일반배양 결과와 PCR결과에서 각각 20.5%(14/68), 30.8%(21/68)의 양성률을 나타내고 있었으며, 2개 구분에 따른 차이는 역시 유의하지 않았다. 열전달 방식의 개방형과 밀폐형에서 동일한 양상을 나타내고 있었다.

건물의 냉각탑수의 관리상태를 자체관리하는 곳은 76.4%(52/68), 용역관리 하는 곳은 23.5%(16/68)으로 나타났으며, 일반배양 결과와 PCR결과에서 각각, 25% (17/68), 39.7%(27/68)의 양성률을 나타내고 있었으며, 관리 형태에 따른 차이는 유의하지 않았다.

냉각수의 소독상태는 미실시 하는 곳은 44.1%(30/68), 실시하는 곳은 55.9% (38/68)으로 나타났으며, 소독을 미실시 하는 경우 일반배양 결과와 PCR결과에서 각각, 16.1%(11/68), 27.9%(19/68)의 양

Table 4. Detection of *Legionella* spp. isolated from the water samples of cooling tower in Seoul by sero-grouping and Ap-PCR methods.

Isolate no.	Area of isolation	Serogroup	Ap-PCR	
			Molecular type	
1	Daeho plaza	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
2	Poongsung Elec,	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
3	Kangnam Center	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 6	V	
4	H Hospital (Seo)	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ic	
5	HY dongmoon	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ic	
6	H hospital (bon)	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 6	V	
7	Shin Se (food))	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ic	
8	Kangnam hospital	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ib	
9	Ilsan Dep, #1	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
10	Ilsan Dep #3	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ic	
11	Kyoung Dep, #1	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
12	Kyoung Dep, #2	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 6	V	
13	Kyoung Deo, #3	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
14	Min J hospital	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	III	
15	Sam hospital	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	II	
16	Hae plaza	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	III	
17	Shi town	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
18	Victor Hotel	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
19	Acade house	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
20	Meo tower	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	II	
21	Bumse BLD	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ia	
22	Lo Dep,	<i>L. pneumophila</i> SG [*] 1	Ib	
23	Miji plaza	No Growth in BCYE- α	Ia	
24	CMC Institute	No Growth in BCYE- α	Ia	
25	Hankook Cap,	No Growth in BCYE- α	Ia	
26	HY Lib #2	No Growth in BCYE- α	Ia	
27	Kang hospital #1	No Growth in BCYE- α	Ic	
28	Walker (duty free)	No Growth in BCYE- α	Ia	
29	Dong hospital	No Growth in BCYE- α	Ia	
30	IL san Lo #2	No Growth in BCYE- α	Ic	
31	Hy guri hospital	No Growth in BCYE- α	Ic	
32	Kyoung hospital #1	No Growth in BCYE- α	Ia	
33	Kyoung hospital #2	No Growth in BCYE- α	Ia	

성물을 나타내고 있었으며, 관리 형태에 따른 차이는 일반배양결과에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않은 반면 PCR 결과에서는 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$)

레지오넬라균의 일반배양검사결과에서의 양성률을 나타낸 결과와 대상 사업장의 오염물질 비교에서 통계적으로 유의한 차이를 보인 영향인자는 없었다(Table 7).

또한, PCR결과에서 양성을 보인 사업장 별 각 오염인자에서는 탁도 결과에서 각 장소별 유의한 차이를 보였으며 ($p<0.05$), 나머지 오염인자에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 8).

3) 엔도톡신 결과

그람음성 간균의 간접 오염지표가 되는 엔도톡신은 전체 68곳 중에서는 300-500 EU/ml이 23곳(33.82%)에서 검출되었다. 12시간 가동중인 사무실인 경우 300-500 EU/ml이 전체 15곳 중 6곳(40%)에서 검출되었으며, 소규모 상가는 100-500 EU/ml이 6곳(54.54%), 공장은 5곳 중 <100, 300-500 EU/ml 이 각각, 2곳 (40.00%), 극장은 100-300 EU/ml 이 한 곳에서 검출되었다. 12시간 가동 군에서는 300-500 EU/ml이 전체 32곳 중 11곳 (34.38%)로 가장 많았다. 24시간 가동군인 호텔인 경우 전체 11곳 중 4곳에서

300-500 EU/ml(36.36%)이 가장 많은 곳에서 검출되었으며, 병원은 전체 16곳 중 6곳(37.50%)에서 100-300 EU/ml이, 백화점은 전체 9곳 중 병원과 마찬가지로 4곳 (44.44%)에서 300-500 EU/ml이 가장 많이 검출되었다 (Table 9).

측정장소별 사업장별 엔도톡신 농도를 살펴본 결과, 소규모 상가에서의 기하평균이 409.53 ± 2.18 으로 12시간 가동 군에서 가장 높게 나왔으며, 24시간 가동 군에서는 호텔은 기하평균 903.31 ± 4.03 으로 가장 높게 나왔다. 12시간 가동 군에서는 사업장별 엔도톡신 농도 차이가 없었지만, 24시간 가동 군에서는 사업장별

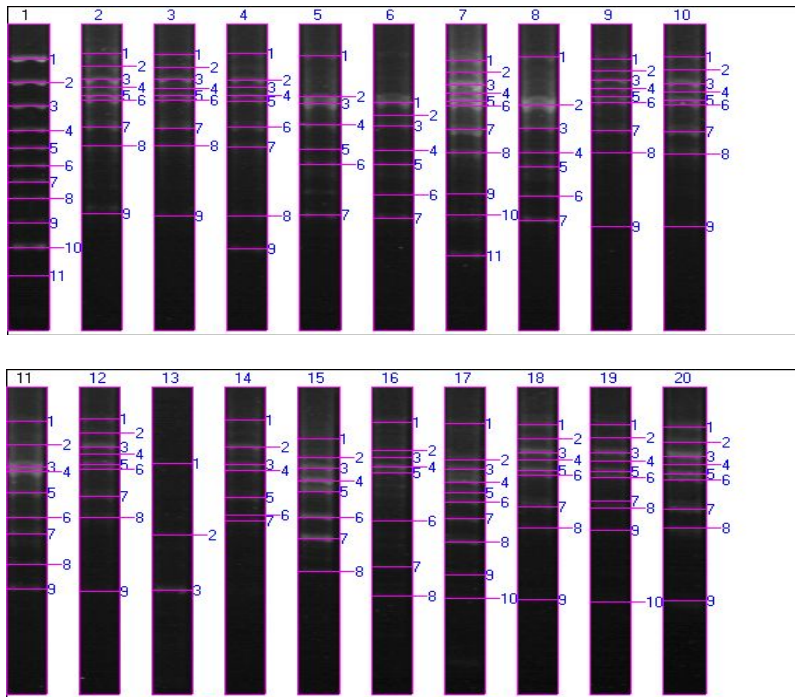


Fig 6. AP-PCR pattern of Auto-detection analysis system. (Bio1D Version 99 software, BIO-PROFIL[®], USA). lane 1, 100bp ladder Plus (MBI, USA) ; lane 2, Isolate no.1; lane 3, Isolate no.2; lane 4, Isolate no.3; lane 5, Isolate no.4; lane 6, Isolate no.5; lane 7, Isolate no.6; lane 8, Isolate no.7; lane 9, Isolate no.8; lane 10, Isolate no.9; lane 11, Isolate no.10; lane 12, Isolate no.11; lane 13, Isolate no.12; lane 14, Isolate no.13; lane 15, Isolate no.12; lane 16, Isolate no.13; lane 17, Isolate no.16; lane 18, Isolate no.17; lane 19, Isolate no.18; lane 20, Isolate no.19

엔도톡신 농도간에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p<0.05$) (Table 10).

또한 엔도톡신농도와 오염인자와의 관련성을 조사한 결과 잔류염소농도($r=0.41$), 구리($r=0.39$), 탁도($r=0.28$)에서 양의

상관성을 나타냈으며($p<0.05$), pH, pb, Fe의 경우 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 11).

IV. 고 찰

레지오넬라증의 검출 및 진단은 크게 두 가지로, 검체로 부터 균을 직접 분리하거나 환자의 혈청에서 특이 항체를 검출하는 것이다(조규홍 등, 1997). 냉각탑 수로부터 일반 배양법에 의한 결과는 양성률이 32.3%(22/68)이며, 그 동안 국내에서 발표된 대다수의 자료(정운섭 등, 1986; 정중학 등 1988; 박석기 등, 1999)들이 20%이내의 검출 율에 비해 높고, 외국의 연구자들이 발표한(Barbaree 등, 1987)의 40%에 비하면 낮은 편이었다.

본 조사에서 비교적 양성률이 높을 수 있었던 요인 중의 하나는, 레지오넬라균은 습도 조건을 거의 포화상태를 쾌적조건으로 좋아하는 습성 때문에 배양시 인큐베이터의 내부 습도도 별도의 포화습도 조건을 유지하고 있다. 따라서 본 연구기간 동안도 집중 장마철이어서 채취 기간동안 비교 습도가 높은 기간이었고, 또 하나는 국가기관 혹은 구청에서 채수할 경우는 사전에 염소 등으로 집중 소독

Table 5. Characteristics of water samples obtained after the operation of cooling tower for 12 and 24 hrs: Turbidity, pH, residual chlorine and heavy metals.

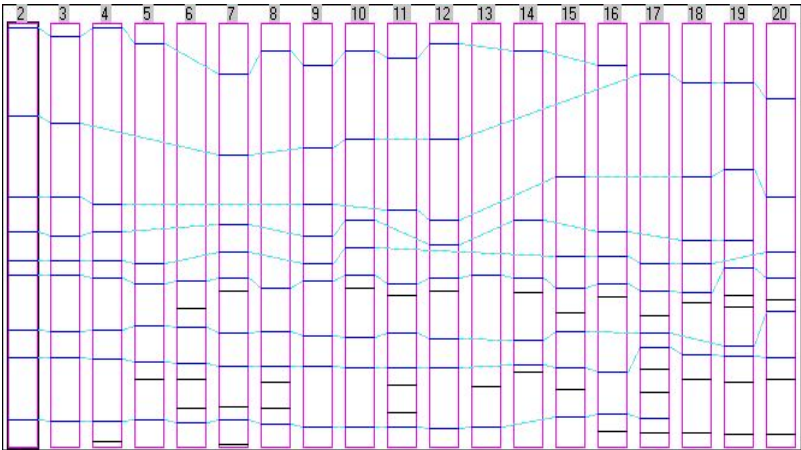
Cooling tower	factors	Turbidity (NTU)			PH		
		N ^a	GM	GSD ^b	Na	GM	GSD
12 hrs operation		32	1.02	2.20	32	8.24	1.04
24 hrs operation		36	0.69	1.87	36	8.36	1.03
Total		68	0.92	2.07	68	8.30	1.03

Cooling tower	factors	Cl ₂			Pb			Cu			Fe		
		N ^a	GM	GSD ^b	N ^a	GM	GSD ^b	N ^a	GM	GSD ^b	N ^a	GM	GSD ^b
12 hrs Op		27	0.04	2.35	31	0.03	2.35	32	0.10*	2.14	21	0.02	2.20
24 hrs Op		30	0.04	4.26	27	0.03	2.10	32	0.06	2.20	22	0.02	2.01
Total		57	0.04	3.32	58	0.03	2.02	64	0.08	2.27	43	0.02	2.08

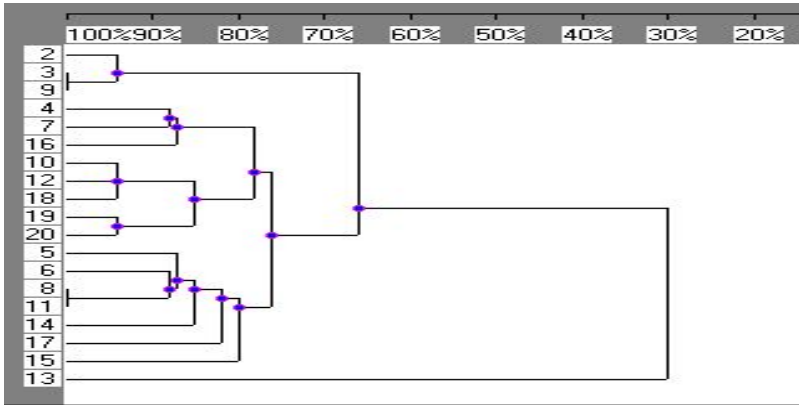
a : Number of sampling

b : Geometric standard deviation

* : $p<0.05$ compared with 24 hrs operating system by t-test



(A)



(B)

Fig 7. Dendrogram of configuration lane of (A) and (B) by Ap-PCR.(Bio1D Version 99 software, BIO-PROFIL®,USA).

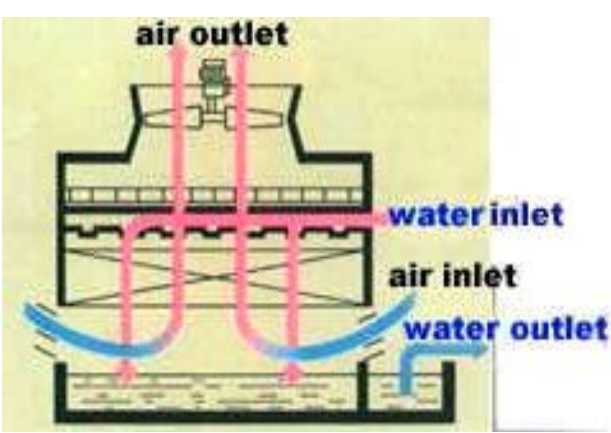


Fig 8. Counter flow type of Cooling tower

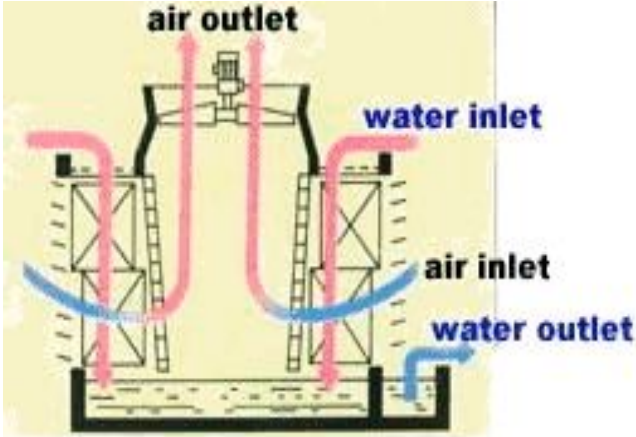


Fig.9. Cross flow type of Cooling tower

Table 6. Comparison of *Legionella* spp detected by characteristics of the cooling tower system

Cooling Tower	Method	N	conventional culture method			multiplex PCR method		
			positive	negative	P-value	positive	negative	P-value
Type	rectangular	17 (25.0)	6 (8.8)	11 (16.1)	0.95	10 (14.7)	7 (10.2)	0.51
	round	45 (66.2)	14 (20.5)	31 (45.5)		21 (30.8)	24 (35.2)	
	connect	6 (8.8)	2 (2.9)	4 (5.8)		2 (2.9)	4 (5.8)	
Air Flow	counter-flow	45 (66.2)	14 (20.5)	31 (45.5)	0.75	21 (30.8)	24 (35.2)	0.66
	cross flow	23 (33.8)	8 (11.7)	15 (22.0)		12 (17.1)	11 (16.1)	
Thermal type	open	45 (66.2)	14 (20.5)	31 (45.5)	0.75	21 (30.8)	24 (35.2)	0.66
	closed	23 (33.8)	8 (11.7)	15 (22.0)		12 (17.6)	11 (16.1)	
Manage-ment	self	52 (76.4)	17 (25.0)	35 (51.4)	0.91	27 (39.7)	25 (36.7)	0.31
	service	16 (23.5)	5 (7.3)	11 (16.1)		6 (8.8)	10 (14.7)	
Disinfection	non- execution	30 (44.1)	11 (16.1)	19 (27.9)	0.49	19 (27.9)	11 (16.1)	0.03
	execution	38 (55.9)	11 (16.1)	27 (39.7)		14 (20.5)	24 (35.2)	

() : %

Table 7. Comparison of conventional culture with the influenced on *Legionellae* positivity by the effectives from water samples of 68 cooling towers.

Effectives	Site	Conventional culture method						P-value
	office	small market	factory	Hotel	Hospital	Department store	Theatre	
	2(13.3)	8(72.7)	1(20.0)	1(9.1)	4(25.0)	6(66.7)	-	
turbidity	0.86	1.34	0.65	1.44	0.66	0.56	-	0.095
pH	8.11	8.23	8.15	7.56	8.29	8.40	-	0.338
Cl ₂	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	-	0.760
Pb	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	-	0.434
Cu	0.20	0.14	0.04	0.11	0.07	0.05	-	0.150
Fe	0.02	0.03	0.10	0.05	0.03	0.02	-	0.573
endotoxin	1136.3	411.8	366.0	801.5	371.8	331.5	-	0.522

Table 8. Comparison of Multiplex PCR method with the influenced on *Legionellae* positivity by the effectives from water samples of 68 cooling towers.

Effectives	Site	Multiplex PCR method						P-value
	office	small market	factory	Hotel	Hospital	Department store	Theatre	
	4(26.7)	9(81.8)	2(40.0)	3(27.3)	8(50.0)	7(77.8)	-	
turbidity	0.73	1.48	0.46	0.75	0.67	0.57	-	0.006
pH	8.26	8.26	8.25	7.99	8.31	8.38	-	0.601
Cl ₂	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	-	0.814
Pb	0.02	0.03	0.07	0.03	0.02	0.03	-	0.720
Cu	0.13	0.14	0.10	0.10	0.06	0.04	-	0.059
Fe	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	-	0.849
endotoxin	433.49	392.11	370.97	625.93	306.55	345.89	-	0.885

Table 9. Comparison of endotoxin detected from water samples obtained after the operation of cooling towers for 12 and 24 hrs.

Cooling tower		No. of sample	Concentration of Endotoxine (EU/ml)									
			<100	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1100	1100-1300	1300-1500	1500-1700	>1700
12 hrs operation	noffice	15	3	1	6	1	1	-	-	-	1	2
	small market	11	1	3	3	1	1	-	2	-	-	-
	factory	5	2	-	2	-	1	-	-	-	-	-
	theatre	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	sub- total	32	6	5	11	2	3	-	2	-	1	2
24 hrs operation	Hotel	11	-	1	4	1	2	-	-	-	1	2
	Hospital	16	2	6	4	1	2	-	-	1	-	-
	Department store	9	-	2	4	1	-	1	-	-	-	-
	sub- total	36	2	9	12	3	4	1	-	1	1	2

Table 10. Comparison of endotoxin detected from various sampling sites.

		unit : Eu/ml			
cooling tower	sampling site	N	GM	GSD	P-value
12 hrs operation	office	15	352.67	3.98	0.6929
	small market	11	409.53	2.18	
	factory	5	190.17	4.16	
	theatre	1	265.10	265.10	
	sub total	32	334.20	3.25	
24 hrs operation	hotel*	11	903.31	4.03	0.0237
	hospital	16	299.30	2.17	
	department store	9	455.36	1.82	
	sub total	36	465.87	2.88	

Table 11. Correlation matrix of selected to the effectiveness.

	endotoxin	Cl ₂	Turbidity	pH	pb	Cu	Fe
endotoxin	1.00	0.41*	0.28*	0.01	-0.01	0.39*	0.00
Cl ₂		1.00	0.37*	-0.00	0.18	0.07	0.05
Turbidity			1.00	-0.06	0.07	0.23	0.17
pH				1.00	-0.04	-0.06	-0.15
pb					1.00	-0.20	0.32
Cu						1.00	0.48*
Fe							1.00

을 하거나 수돗물을 반반 섞어 채수하는 사례가 레지오넬라균의 국가기관의 결과에 낮은 분리율의 원인이 아닌가 사료되어진다. 레지오넬라균의 일반적인 생화학적 성상으로는 buffered charcoal yeast agar 등의 cystine과 철(Fe)화합물 등에 의해 검은색을 띤 배지(BCYE)에서만 증식이 되는 독특한 특성을 갖고 있으며, 이들이 들어있지 않은 혈액천천배지 등에서는

증식하지 않는 세균은 레지오넬라균을 의심할 수 있고, oxidase 및 catalase 시험에서 양성을 나타내며, urease에 음성을 나타내 기도하며, 일부 균종은 hippurate를 가수분해하며, 대부분의 균종이 β -lactamas를 생성한다(레지오넬라 워크샵, 1994; Chemical Microbiology procedure Handbook, 1995). 본 연구에서는 실험실 여건상 hippurate분해능과 β -lactamase는

실시하지 못하였으나, oxidase 및 catalase 시험의 양성, urease와 indole 시험에서는 모두가 음성을 나타낸 결과는 정중학 등의 연구 결과와 일치하고 있었다(정중학 등, 1988).

그러나 이 세균은 배양절차가 까다롭고, 여러가지 행태적 성상이 다르기 때문에 일반적 생화학적 시험만으로 균속(genus) 혹은 균종(species)의 확실한 동정

이 되지 않기 때문에(정운섭 등, 1986), 레지오넬라속 균의 성상에 의한 특성으로 신속정확한 동정방법에 대한 감별적인 목적을 위한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다(황광호 등, 1999). 세균학적 특성과 생화학적 특성에 의해 레지오넬라균으로 분리된 시험 균종은 혈청군에 대한 항혈청으로, 응집반응을 이용하여, 혈청군을 동정하게 되며(박석기 등, 1999). 본 연구결과에서 순수분리된 22주(32.35%)의 레지오넬라균주 대상으로 혈청형 결과는 *Legionella* Serogroup I 이 86.4% (19/22), Serogroup VI가 13.6%(3/22)로 검출되어, *Legionella* serogroup I 인 *Legionella pneumophila*가 대부분을 차지하고 있었으며, 이는 group I 의 77.3%과 group VI 의 18.2%(김권범 등, 1998)와 비슷한 결과와 87.4%(박석기 등, 1999)와 일치하는 것으로 나타나, 우리나라의 레지오넬라균의 분포는 거의 *Legionella* serogroup I 분리 빈도가 높은 것으로 사료되어진다. 레지오넬라증의 거의 85~90%는 *L. Pneumophila*가 원인이라고 보고되고 있으며, 그중 65~70%는 *L. Pneumophila* serogroup I에 의한며, 레지오넬라균은 적어도 41종(sero-group)과 60가지 이상의 혈청군이 확인되고 있고, 일부 혈청형에는 여러 아형(subtype)이 있으며 특히 *L. Pneumophila* serogroup I에는 적어도 50개의 아형이 존재하여 매우 이질적인 혈청군으로 알려져 있으나, 레지오넬라균의 배양조건에 따라 때로는 monoclonal antibody 반응양상이 다르게 나타날 수 있다(김권범 등, 1998). 또한 *L. Pneumophila* serogroup I 이외의 혈청군의 아형들에 대한 monoclonal antibody들은 잘 확립되지 않았다. 그러므로 레지오넬라증 유행의 역학조사에서 환경분리 균주와 레지오넬라증 환자에서 분리된 균 사이의 연계를 확인하기 위해서는 혈청형의 구분만으로는 불충분하며, 레지오넬라균의 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

(김민자, 1995; Cynthia et al, 1997).

본 연구에서 시도된 기존의 일반 배양법과 매우 민감한 방법(조규홍 등, 1997; 조소현, 1998)으로 알려지고 있는 PCR 방법을 동시에 시도하였는데, 이때 PCR 조건을 신속성과 정확도 향상을 위해 primer를 두 쌍으로 실시하는 multiplex PCR을 사용하였으며, 이때 이용된 primer는 mip-X와 mip-Y, 5R-1과 5R-2를 사용하였다. 일반 배양검사에서 음성인 11 (16.2%) 개의 시료에서 PCR에 의해 레지오넬라균주가 검출되므로 실제로 PCR은 일반 배양법에 비해 양성률이 높음을 입증할 수 있었다. non-pneumophila *Legionella* species와 *Legionella pneumophila*를 검출함과 동시에 구별하기 위한 목적으로 사용하였던, multiplex PCR방법은 일반 배양시 배지소모, 까다로운 조건 등에 비하면 훨씬 간편하였고, 신속함 등의 장점이 우수성이 있는 것으로 판단되어 진다.

또한 multiplex PCR법은 48.5%(33/60)에서 양성반응을 나타내어 이러한 결과는 앞서 보고된(손장욱 등, 1998)의 결과(45%)와는 유사하였으나 박 등 59.8%의 결과(박경석 등, 1988)보다는 다소 낮은 것이었다.

PCR에서 양성을 보인다고 해서 모두 감염 위험이 있는 생균에 의한 오염인지 여부는 아직 불확실하며, 냉각탑수의 PCR 검출결과는 보다 신중히 판단되어야 한다고 제시되고 있다(Field et al, 1997). 이에 대해 PCR방법을 통한 검출법이 증식 및 감염능력과 대사능력이 있는 생균과, 소독제 처리 후 증식력이 없어진 생균의 감별이 가능한지 여부와, 임상적으로 의의가 없는 죽은 균까지도 검출되는지 여부를 확인하는 실험적 연구에서 PCR-gene probe 법으로 증폭산물이 관찰될 경우 생균이 존재한다는 것을 의미한다고 보고한 바 있다(Bej et al, 1991). 최근에는 사용되는 Ap-PCR(Arbitrarily primed Polymerase Chain reaction)이란 단일 primer로 genome내의 복수영역을 동시에 증폭하는 기술로 1990년에 Welsh와 McClelland가 개발한 것이다. 국내에서는 아직 도입단계에 있지만, 이 방법의 가장

큰 특징은 주형인 genome DNA가 복잡하고 특히 서열정보가 없어도 PCR 증폭산물을 얻을 수 있다는 점이다. 최근 신속하면서도 분별력이 높은 새로운 분자역학적 방법으로 각광을 받고 있다. 레지오넬라균에 대한 분자역학적 조사도구로서 DNA finger printing 분석을 근거로 하는 ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), random amplified fragment length polymorphism(AFLP) 등 여러 방법들이 시도되고 있으나, 각각 고가의 장비, 숙련된 기술 소요시간, 오염 등의 면에 있어서 장단점을 지니고 있다. *Escherichia coli*의 M13 reverse primer와 T7 promoter primer를 각각 시험적으로 사용하여 Ap-PCR을 시도하였을 때, M13 reverse primer를 사용한 경우 증폭된 절편들의 크기와 수에 있어서 결과 해석에 비교적 용이하여 M13 reverse primer가 선택되었다. 본 연구에서 분리된 레지오넬라 균주들 중에서 가장 분리 빈도가 높은 *L. pneumophila* sero-group 1의 30주를 대상으로 실시한 AP-PCR결과에서 7개의 아형으로 구분되므로 우리나라 냉각탑수에서는 비교적 여러 형태의 아형이 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 아직까지 국내에 발표된 자료가 제한적이기는 하지만, 김권범 등의 결과와 유사한 양상을 나타내고 있었다(김권범 등, 1998). 향후 다양한 아형의 분류 결과를 체계적이고, 세부적으로 축적하여, 레지오넬라균종의 역학적 정보자료로 활용하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 시도된 Ap-PCR은 5~6시간 이내에 결과의 확인이 가능하였고 3회 이상 반복 시행하였을 때도 본 실험에서는 재현성은 비교적 양호하였다. 따라서 본 실험에서 시도된 m13 reverse primer를 사용한 Ap-PCR법은 레지오넬라증의 유행적 발생시에 감염원의 확인에 사용될 수 있는 효율적인 선별검사로 사료되었다. 그러나 분자 형별 분석에서 아직 동일 균주나 역학적 연관성이 있는 균주를 몇 개의 절편 차이까지로 인정할 것인지에 대한 기준이 확립되지 않았으므로(김권범 등, 1998; Cynthia, 1997), 추후 더

많은 수의 레지오넬라 균주 및 기타 미생물의 검출목적에 적용을 시도하므로써 이에 대한 분석기준의 확립을 통한 재평가 필요할 것(이혜경 등, 2001)이며, 아직까지는 국내외에서 시도된 사례가 적으므로 이 분야에 대한 연구 검토가 계속 진행되어야 할 것이며, 신속한 장점은 있으나, band pattern의 일치성에 대한 재현성이 문제가 있고, 아형으로 존재하는 수많은 분자형별에 대한 기준설정이 시급하여, 좀더 깊은 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다. 이러한 단점 등을 최소화하기 위해 Ap-PCR 반응은 각종 시약의 질, 농도 등에 영향을 크게 받기 때문에 장기간의 연구결과의 축적과 특히 반복실험을 자주 하는 경우에는 PCR에 사용하는 시약류를 한번에 대량으로 조제한 후 분주하여 freezer에 보존해 두는 재현성을 유지하기 위해 유리하다.

본 연구에서는 레지오넬라균의 성장에 영향을 미칠 가능성이 있는 일반적인 오염인자를 파악하였으며, 그 중에서 잔류 소독제의 부재는 무기물의 존재나 cross-connection 등에 의한 오염 등을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다(EPA: 1989) 가장 많이 쓰이고 있는 소독제인 염소 소독 방법은 레지오넬라균이 상대적으로 내성이 있으므로 안정된 항균 효과의 염소 농도를 유지하기 어렵고, 특히 전자부품회사, 반도체 회사 등은 생산품의 손상, 연 공관 시스템의 부식 등의 영향으로 염소의 사용을 기피하고 있었다. 레지오넬라균의 검출결과에 영향을 줄 가능성이 높은 오염 인자중에서 철(mgFe/L), 구리(mgCu/L), 잔류염소량 측정(mgCl/L) 등 외에 납(mgPb/L)종목을 추가하였고, 철(Fe)은 레지오넬라균의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 산화된 철은 번식하는데 도움이 된다(정현미, 1996), 구리(Cu)와 염소는 잔류 소독제를 정량할 목적으로 측정하였고, 납(pb)은 일반적 오염 농도를 판단하기 위한 기본 자료로 활용하고자 측정하였다. 레지오넬라균이 검출된 탁도의 기하평균은 0.87 ± 1.85 로 비교적 낮은 결과였으며, PCR결과가 양성으로 나온 곳의 탁도 기하평균은 $0.80 \pm$

1.83으로 레지오넬라균이 검출되었을 경우의 탁도와 비슷한 결과를 나타내었다. 탁도와 *L. pneumophila*의 상관관계를 통계적으로 살펴보면 상관도가 0.2811 ($p < 0.05$)로 통계적으로 유의한 결과를 보였다. 이용우 등의 보고에서 유기물질의 오염농도가 높아질수록, 레지오넬라균 증식을 촉진시킨다는 결과와 유사한 결과를 나타내고 있어 탁도 역시 레지오넬라균의 증식에 중요한 환경인자로 생각되며, 냉각탑 자체 내에 있는 부패 철가루 및 청결 상태불량 등으로 냉각탑수의 유기물질 오염이 레지오넬라균의 증식을 촉진시키고 있는 것으로 여겨지므로, 이에 대한 다중이용시설 등의 냉각탑에 대한 관리대책이 필요하다고 생각된다. 일반배양 양성에서 염소농도의 기하평균은 0.02 ± 1.54 , PCR양성에서는 0.03 ± 2.05 , 구리농도의 기하평균은 배양양성에서 0.08 ± 2.53 , PCR양성에서 0.09 ± 2.31 이었다.

한편 일본 등 외국의 경우 냉각탑수에 대한 기준은 법적으로 철저히 관리하고 있지만, 아직 우리나라에서는 아직 냉각탑수 관리 등의 기준이 미 제정상태이며, 순환보급수의 부식 예방으로, 스케일 방지 기준조차 일본 기준을 사용하고 있는 상태이므로, 냉각탑수를 대상으로 하는 중금속에 대한 평가는 향후 좀더 관리 차원에서 연구되어야 하는 부분으로 사료된다.

건물내의 냉각탑의 특성에 따른 레지오넬라균의 검출 결과에 미치는지 여부에 대하여 시도되었던 결과에서는, 구조 및 모양에 따라 평면상 탑의 형체가 사각인 사각형 25%(17/68), 평면상 탑의 형체가 둥글거나 8각형 이상의 다면체 형태의 원형 66.2%(45/68), 셀을 계속 이어 붙여 갈 수 있는 연결형 8.8%(6) 형태로 분류되어, 원형(round type)이 주류를 이루고 있었다. 또한 공기흐름에 따른 구분으로는 충전부에서 공기의 흐름이 수직 상방향으로 움직여 냉각수와 미주 교차하며 열 교환되는 형태 대향류형(counter flow type)은 66.2%(45/68), 충전부에서 공기의 흐름이 수평방향으로 움직여 냉각수와 공기가 직

각으로 교차하며 열 교환되는 형태의 직교류형(Cross flow type)은 33.8%(23/68)의 형태를 띄고 있으며, 열 전달 방식에 의한 개방형은 66.2% (45/68), 밀폐형은 33.8% (23/68)으로 분류 되고 있었다. 또한 관리 상태에 있어서는 자체관리가 76.4% (52/68), 용역관리가 23.5% (16/68)으로 관리되고 있었으나, 양성률에 미치는 영향은 유의하지 않았다. 소독의 실시 여부를 미시시하는 하는 곳은 44.1%(30/68), 실시하는 곳은 55.9%(38/68)였으며, 소독을 미 실시 할 경우 일반배양에서는 레지오넬라균 양성률이 16.1%(11)로 동물로 나타났으나, PCR방법에서는 27.9%(19), 소독을 실시 할 경우에는 20.5%(14/68)로 나타나서, 소독을 하지 않을 경우에 PCR방법의 양성 반응율이 높았으며, 이는 소독을 하는 것이 레지오넬라균의 억제에 도움이 된다는 간접적인 자료로 사료되어 진다. 소독에 관련된 정보는 질문으로 얻은 자료였고, 신뢰성 여부에 대한 것은 검증되지 않았으며, 소독방법에 대한 자료는 본 연구에서는 확실히 규명하지 못하였으므로, 앞으로 다량의 냉각탑수를 연구자료로 확보하여 시도한다면, 더욱 나은 결과가 기대된다고 사료되어진다.

본 연구중 oxoid의 공기시료채취기인 M.A.Q.S. II를 사용하여, 중앙 공조시스템의 에어컨 주변에서 시도한 공기중의 레지오넬라균 검출을 목적으로 측정하였으나 전혀 균을 검출해 낼 수가 없었다, 또한, 동일장소에서 혈액천배지(BAP; blood agar plate)를 사용하여, 공기 중 오염상태를 측정하여 보았으나, 의미 있는 세균의 집락수는 나타나지 않았다. 공기중에서 레지오넬라균의 분리된 사례가 보고(Robert et al, 1990) 사례도 있으므로 향후 좀더 면밀한 공조 시스템의 파악과 함께 전파경로 추적을 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

그람음성 간균의 간접 오염지표가 되며, 또한 조사대상의 냉각탑수 중 절반 이상이 그람음성간균인 레지오넬라균에 오염되어 있어, 주요한 생태계 오염인자로 여겨지는 엔도독신(bacterial endotoxin)을 오염지수 파악 및 레지오넬라균의 양성

결과에 영향을 줄 것인가에 대한 목적으로 측정하였다. 일반적으로 엔도톡신은 그람음성 간균의 박테리아의 세포외벽에 존재하는 물질로 박테리아가 살아있는 동안에는 발현되지 않지만 박테리아가 증식하거나 사멸할 때 세포의 벽이 깨지면서 외부로 방출되는 내독소(Heine, 2001)로서, 만성적 기관지염, 발열, 급성 폐렴, 천식 등 호흡기 장애가 발생하는 것으로 알려져 있다(Liu AH, 2002; Barun et al, 2002; Gehring U et al, 2002; ju-Hyeong park et al, 2000).

본 조사에서 시도된 엔도톡신의 농도는 냉각탑수 68곳 중에서는 300-500 EU/ml이 23곳(33.82%)에서 검출되었으며, 전체 냉각수 내 endotoxin 농도의 기하평균(기하 표준편차) 398.46(3.07) EU/ml으로 나타나, 국제적인 기준이 종목별로 미 제정되어 있어, 비교하기 어려우나, 절삭유에서의 기하평균 6,791 EU/ml(Donguk park, 2000)에 비하면 낮은 것이 이었다. 정상상태에서는 불검출(Not detected)로 측정되어야 하므로, 향후 냉각탑수에서 엔도톡신의 농도 및 생태적 특성이 레지오넬라와의 관련성(Donato, 1980)과 함께 깊게 연구되어야 할 것으로 사료되어진다.

냉각탑수 내 endotoxin 농도에 영향을 주는 인자로 탁도($p<0.05$), 염소($p<0.01$) 및 구리농도($p<0.01$)였다. 12시간 가동중인 사무실인 경우 300-500 EU/ml이 전체 15곳 중 6곳(40%)에서 검출되었으며, 24시간 가동중인 호텔인 경우 전체 11곳 중 4곳에서 300-500 EU/ml(36.36%)이 가장 많은 곳에서 검출되었다. 레지오넬라균의 양성결과와 엔도톡신과는 통계적으로 유의한 결과를 찾을 수 없었고, 또한 본 연구의 제한점의 하나인 레지오넬라균의 단일 엔도톡신에 대한 분석이 현재의 분석기법으로는 어렵기 때문에 향후 엔도톡신에 대한 좀더 깊은 발전적인 연구가 되어야 할 것으로 사료되어진다.

V. 결 론

서울시 일반 대형건물에 설치되어 임

의 선정된 68개 대형건물의 냉각탑수(cooling tower)에서 7월 30일에서 9월 15일까지 측정된 레지오넬라균을 대상으로 동정방법별 검출을 비교와 레지오넬라 검출율에 미치는 영향인자를 조사하였으며, 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 냉각탑수의 레지오넬라균 검출율에 있어서 일반 배양법 및 PCR방법에 따른 검출결과는 각각, 32.5%(22/68)과 48.5%(33/68)의 양성률을 나타냈으며, 분석 소요시간은 72시간 이상과 12시간 이내로 측정되었다.

2. 일반 배양법 및 Multiplex PCR방법의 양성결과는 각각, 32.4%(22/68)와 48.5%(33/68)였으며, 일반 배양법에서 양성률을 보인 시료는 모두 PCR방법에서 양성반응을 나타냈다.

3. 일반배양으로 분리된 레지오넬라균 22주(32.35%)중에서 혈청형 분석(serogrouping)그룹결과는 *Legionella* Serogroup I 이 86.4%(19/22), Serogroup VI가 13.6%(3/22)로 검출되어, *Legionella* serogroup I 인 *Legionella pneumophila*가 대다수 균종을 차지하고 있었다.

4. 일반배양에서 양성반응을 보인 22균주와 Multiplex PCR에서 양성 반응을 나타낸 11균주를 합한 33주의 결과를 대상으로 실시한 Ap-PCR 결과는 Ia, Ib, Ic, II, III, VI, V형의 7개 형별로 구분하였다. 소요시간은 5~6시간 이내이었으며, 혈청형 분석결과는 *Legionella pneumophila* serogroup I 의 30주 절편양상은 Ia형 17주, Ib형 2주, Ic형 7주, II형 2주, III형 2주 등 5개의 아형으로 구분되었고, *Legionella* serogroup VI의 3주는 VI형이 2주, V형 1주로 비교적 다양한 절편 양상을 나타내고 있었다.

이상의 결과를 요약하면

레지오넬라균의 검출 양성률과 신속성에서 일반배양법에 비해 PCR방법이 우수하였으므로, 향후 레지오넬라균 등의 동정방법으로 PCR방법도 적합한 것으로 사료된다.

Ap-PCR을 이용한 molecular type은 비교적 다양하였으며, 신속 간편하였고, 변별력이 비교적 양호하였으므로, 향후

분자역학적 도구로 사용이 매우 유용할 것으로 사료되어진다.

존재하는 영향물질의 오염도 분포 등과 레지오넬라균의 양성률간의 관련성 연구 중 PCR 방법의 결과에서 탁도 및 소독실시 여부가 영향을 주는 것($p<0.01$)으로 나타나서, 향후 냉각탑수의 레지오넬라균 관리에는 탁도 및 소독실시 여부가 중요한 영향인자임을 시사하고 있다.

REFERENCES

- 강명서, 최영숙, 정운섭, 이삼열. 냉각탑물에서 분리된 *Legionella pneumophila* 균주에 대한 혈청 살균성 시험 및 항균제 감수성 시험. 대한 임상병리학 회지, 1989; 9(1): 137-144
- 김권범, 김우주, 김민자, 박승철, 유세화, 심희선, 함희진, 박석기. 서울시내 대형건물 냉각탑수의 레지오넬라균의 오염도 조사와 분자형별 분석에 관한 연구. 감염, 1998; 30: 207-217
- 김민자. 레지오넬라증. 감염, 1994; 26: 401-407
- 김민자. 신종감염질환 레지오넬라증. 의학신문, 1995; 1/12, 제2437-2439
- 김윤신. 실내환경과학. 민음사 1995; 67-68
- 김정순, 이성우, 심한섭, 도대규, 조민기, 오희복, 우재홍, 정운섭. 1984년 7월 K병원 중환자실을 중심으로 집단발생한 비폐렴성 legionellosis (Pontiac Fever)에 관한 역학적 연구. 한국역학회지, 1985; 7: 44-58
- 레지오넬라 워크샵 자료, 대한임상검사정도관리 협회, 임상미생물학 분과 위원회 1994; 2-10
- 국립보건원, 세균부 방역과 자료실, 2002; 레지오넬라증 예방관리
- 박경석, 오희복, 성원근, 박미연, 황규찬, 김도경. 국내에서 분리된 *Legionella* 균의 생물학적 특성에 관한 연구 1988, 국립보건원보, 25: 319-329
- 박동욱, 윤충식, 박두용, 한인영. 금속가공유 시료에서 일부 Optical Density 설정

- 값에 따른 엔도톡신의 정량. 한국방
송 통신대학교논문, 2001; 1-15
- 박석기, 황영옥, 정지현, 정운태. 서울시내
다중이용시설 냉각탑수의 레지오넬
라균 분포 및 혈청학적특성. 서울시
보건환경연구원보, 1999; 35: 21-26
- 서울시보건환경연구원. PCR 응용기법,
교육교재. 2000
- 손장욱, 정희진, 우홍정, 김우주, 김민자,
유세화. 삼차의료기관에서 발생한 레
지오넬라 폐렴 유행의 분자역학적 연
구. 감염, 1998; 30: 218-226
- 이혜경, 양현성, 홍세라, 박만석, 심수경,
이병철, 박미연. 1985년부터 2001년
까지 분리한 레지오넬라 분리 균주에
대한 molecular typing. 국립보건원보,
2001;38: 18-30
- 정운섭, 이삼열, 윤정구, 최영숙, 장익진.
냉각탑물에서의 *Legionella* 분리.
대한미생물학회지, 1986; 21(1): 107-111
- 조규홍, 용금찬, 박호현, 윤기복, 정일형,
고광춘, 심수연. 중합효소연쇄반응을
이용한
레지오넬라균조사에 관한 연구. 경기도
보건환경연구원보, 1997; 10; 9-27
- 조소현. 병원감염 세균의 특성 및 그에 관
한 신속동정과 대책. 부산대학교 박
사논문, 1998
- 정종학, 강복수, 김석범, 사공준. 환경수로
부터 *Legionella*속 균의 분리. 영남의
대학술지, 1988; 5(1): 77-82
- 정현미. 먹는 물의 수처리 및 수질관리에
관련한 미생물 규제의 국내외 동향
및 개선방안. 국립환경연구원 기초전
문화 과제보고서, 1996; 27-40
- 황광호, 황영옥, 김은정, 정지현, 조남준.
서울시내 다중이용시설의 냉각탑수
의 레지오넬라균 분포 및 혈청학적
특징. 서울특별시보건환경연구원
1999; 25(4): 20-23
- Adamsson, I, C.Edulund, R.Seensalu. The
Use of AP-PCR and fla-RELP typing
to investigate treatment in *Helicobacter*
pylori infection. Clinical Microbiology.
Infect 2000; 6(5): 265-267
- Anonymous. *Legionellosis*. Commun. Dis.
Intell. 1997 ; 21: 37
- Barbaree J.M, Gorman. G.W, Martin. W.T.,
Protocol for sampling Environmental
sites for *Legionella*. App and Environ-
mental Microbiology July 1987;
1451-1458
- Barun-Fahrlander, Riedler J. Exposure to
endotoxin and its relation to asthma in
school age children. N Engl J Med
2002; 19;347(12)930-931
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM.
Detection of viable *Legionella* Pneumo-
phila in water by polymerase chain
reaction and gene probe methods. Appl
Environ Microbiology 1991; 57;
597-600
- Chemical Microbiology procedure Hand-
book. Washinton DC, ASM ,1995;
19-58
- Cynthia G.Whitney Jo Hofmann, Janet
M.Prucker. The Role of Arbitrarily
Primed PCR in Identifying the source
for an Outbreak of Legionnaire's Dis-
ease, Journal of Clinical Microbiology
1997 ; 1800-1804
- Donato Fumarola, MD. Pathogenesis of
Legionnaires` Disease Pneumonia,
Letters to the Editor, Institute of Med
Microbiology Univ of Bari. 1980 ; 127
- Donguk Park. A model for predicting
endotoxin concentrations in metal-
working fluid sumps in small machine
shops. Korea National Open Univ,
2000; 11.
- England AC, Fraser DW, Mallison GF,
Mackel DC, Skaliy P, Gorman GW.
Failure to predict culture results from
disinfectant-treated air conditioning
cooling towers. Appl Environ Mic-
robiology 1982; 43; 240-244
- EPA: National Primary Drinking Water
Regulations, part III: Total Coliforms,
(including Fecal Coliforms and *E. coli*).
Final Rule, 40 CFR parts 141 and 142.
Fed. Reg 1989;54, 124; 27544-27568,
- Fields BS, Barbee JM, Brieman RF, Dufour
AP(ed). *Legionella* and protozoa: Inter-
action of a pathogen and its natural
host. Washington, DC, Am Soc
Microbiology 1993; 129
- Field BS. *Legionella* and *Legionnaires`*
disease. In: Hurst C, Kundsens GR,
McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter
MV. eds. Manual of environmental
microbiology 1997; 666-675
- Gehring U, Bischof W, Fahlbusch B. House
dust endotoxin and allergic sensitization
in Children. Am J Respir Crit care Med
2002; Oct 1;166(7): 939-944.
- Grattard, F.P, berthelot, M.Reyrolle,
J.Etienne and B.Pozzetto. Molecular
typing of nosocomial strains of
Legionella pneumophila by arbitrarily
primed PCR. 1996; J. clinical Micro-
biology. 34(6) 1595-1598
- Heine.H, Rietschel, and A.J Ulmer. The
Biology of Endotoxin, Molecular Biolo-
gy 2001; V 19; 279-291
- Ju-Hyeong park, Donna L Spieman, Harrier
A Burge. Logitudinal Study of Dust
and Air borne Endotoxin in the home.
Environmental Health perspectives,
2000; 108(11), 1023-1028.
- Leoni, E, P.P Legani, M.A.Bucci Sabatti-
nini, F. Righi. Prevalence of
Legionella spp. in swimming pool Envir-
onment. Wat, Res 2001;35(15);
3749-3753.
- Lester G. Cordes, David W.Fraser, Peyers-
kaly, Carla,Pernin. *Legionnaire`*
Disease outbreak at an Atlanta, Georgia,
Country Club. Evidence For spread
from an Evaporative condenser.
American Journal of Epidemiology
1980; 111(4); 425-431
- Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and
asthma ; reconciling paradox. J All-
ergy Clinical Immunol 2002; 109(3),
379-392
- Miller LA, Beebe JL, Burtler JC, Martin
WT, BensenR, Hoffman RE et al. Use
of Polymerase chain reaction in an

- epidemic investigation of pontiac fever. Journal Infectious Disease 1993;168: 769-772
- Nele Wellinghausten, Cathrin Froest, Reinhard Marre. Detection of *Legionellae* in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time Light Cycler PCR. Applied and Environment Microbiology 2001; 3985-3993
- http://www.osha-slc.gov/dts/osta/otm/otm_iii/otm_iii_7.html(Technical Links > OSHA Technical Manual,2002)
- Robert F. Breiman, Wendy Cozen. Role of Air sampling in Investigation of an Outbreak of *Legionnaire's* Disease Associated with Exposure to aerosols from an evaporative Condensers. The Journal of Infectious Disease 1990 ; 161: 1257-1261
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-7218