

난배양성 병원체인 보렐리아와 렙토스피라 균주의 자원화를 위한 특성분석

건국대학교 의학전문대학원 미생물학교실 장원중*
질병관리본부 국립보건연구원 병원체자원관리 TF 이경민, 황규잠†

*교신저자: wjiang@kku.ac.kr / 02-2030-7816
†공동교신저자: kyuhwang@nih.go.kr / 043-719-6870

Abstract

Characterization of ‘hard-to-cultivate’ pathogens, *Borrelia* spp. and *Leptospira* spp. in Korea

Department of Microbiology, Konkuk University College of Medicine
Jang Won-Jong
Pathogen Resource TF, Center for Infectious Diseases, NIH, CDC
Lee Kyeoung Min, Hwang Kyu-Jam

Background: Securing emerging and re-emerging infectious pathogens is essential for medical vaccine development, pathogen diagnosis, and disease mechanism studies. The Nagoya Protocol in 2014 triggered a lot of attention to microorganisms, and began to acknowledge them as biological resources. In this study, we isolated, characterized, and deposited 8 *Leptospira* spp. and 5 *Borrelia* spp. which were the wild animal- and tick-derived ‘hard-to-cultivate’ pathogens in South Korea.

Methodology: We captured rodents from various locations in South Korea where uncultured pathogen species were expected. We isolated the target species and reactivated previous storing pathogen samples, specifically *Borrelia* spp., from LN₂ tanks to study their molecular characteristics. We employed the UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) clustering technique to obtain the relationship of the pathogens based on genetic distance.

Results: We traced the relationship of *Leptospira* spp. using *LipL32* where eight captured strains were included. The relationship showed that they were the most closely related to *L. interrogans* lai strain as previously known. The relationship of *Borrelia* spp. on *I6S rDNA* showed the strains captured in the same geographic location were closely related to at least three different species. We believe that the addition of our result to a depository, such as the National Culture Collection for Pathogens, would be useful for future medical studies, including vaccine development, diagnostic marker searching, and the research for disease mechanisms.

들어가는 말

신·변종질환 발생은 지난 2015년 5월 국내에서 발생한 중동호흡기증후군(Middle East Respiratory Syndrome)을 비롯하여, 2014년 2월 서아프리카 기니에서 재출현한 치사율 65%의 에볼라(Ebola virus disease), 그리고 최근에는 중남미 지역에서 범유행 수준인 지카바이러스(Zika virus) 등 국내외적으로 지속해서 일어나고 있다[1-3]. 인체에 감염을

일으키는 신·변종질환 등의 예방관리의 일환으로 진단 및 백신개발 연구 등을 위한 병원체 수집, 관리는 필수적이며, 이런 연구에 적합한 특성정보 등이 파악된 병원체의 자원화는 매우 중요한 일이다. 생물다양성협약과 이에 따른 2014년 10월 나고야의정서 발효로 세계 각 국은 미생물자원에 대한 관심이 높아지고 있다[4]. 국내에서도 병원체에 대한 자원화 필요성을 인식하여 질병관리본부에서 운영 중인 국가병원체자원은행(National Culture Collection for Pathogens, NCCP)은

병원체자원 네트워크를 구축하여 임상분리 병원체를 수집, 자원화 관리 및 분양업무 수행으로 보건의료연구개발의 활성화에 기여하고 있다.

병원체의 자원화는 병원체의 수량도 중요하지만, 그 다양성 또한 매우 중요하다. 기후와 환경의 변화에 따른 생물계의 변화는 미생물집단의 생태변화를 유발하여 신·변종의 출현을 초래한다. 또한 교통수단의 발달과 세계시장의 단일화에 따른 인적, 물적자원의 교류로 의도치 않은 외래종의 유입은 물론, 국지적으로 감염되는 병원성 미생물의 급속한 전파를 불러일으키기도 한다. 따라서 다양한 병원성 미생물의 자원화와 국제화는 필수적으로 요구되고 있다. 국내 기존의 병원체 자원은행들은 현재 고빈도 분리균주들로 대부분 구성되어 있는데, 병원체자원의 다양성 확보를 위해 일반적인 배양법으로는 분리가 불가능한 난배양성 병원체의 확보 및 자원화로 이를 연구하기 위한 기본적인 여건 조성에 노력이 필요한 시점이다. 이는 가까운 미래의 병원성 미생물 연구의 과학적, 의학적 혜택은 물론 산업적 혜택의 확보 또한 가능케 할 수 있다.

국내에서 발생하는 열성질환의 원인병원체 중 그 일부는 난배양성 세균이며, 대표적인 난배양성 세균 목록은 Table 1과

같다. 난배양성 균주는 영양요구성과 배양 조건이 매우 까다롭기 때문에 특수 배지 혹은 세포내 배양 등을 통해서만 증식이 가능하며, 배양 속도 또한 느린 경우가 많다[5]. 난배양성 세균들은 전 세계적으로 분포하고 있으며, 배양이 어렵기 때문에 다양한 분류 특성을 확인하기 위해 분자생물학적 분석연구가 필수적이다.

렙토스피라증(Leptospirosis)은 전 세계적으로 발생하는 인수공통질환으로 렙토스피라(genus leptospira)에 속하는 병원균에 의해 일어난다[6]. 국내에는 1984년에 렙토스피라증의 발생이 최초로 보고 되었고, 이후 원인균이 분리되었다[6]. 렙토스피라는 고전적으로 혈청학적 방법으로 분류되었으며, 국내에는 주로 Icterohemorrhageae 혈청형군에 속하는 혈청형 lai가 다수 분리되었으며, 새로운 hongchon과 yeonchon 혈청형이 결정된 바 있으며, 일부 환자에서 Canicola 혈청군에 속하는 canicol 혈청형이 분리된 바 있다[6]. 보렐리아(Borrelia)는 라임병(Lyme disease)의 원인체로서 진드기(Ixodes ticks)에 의해 전파된다[7,8]. 보렐리아는 아직 환자에서는 분리된 바 없지만, 야생 설치류, 진드기 등에서 다수의 균이 분리되었다[7-9]. 보렐리아의 특성분석은 단백질분석과 단세포균향체를 이용한 항원-항체법,

Table 1. 'Hard-to-cultivate' *Borrelia*, *Leptospira*, *Orientia tsutsugamushi* strains (reference) isolated in South Korea[8-14]

Genus	Species/Strain	Origin	Year	Area	Reference
<i>Borrelia</i>	<i>B. burgdorferi</i>	Ticks, wild rodents	1992-2002	Kangwon/Chungju Korea	8-9
	<i>B. afzelii</i>	Ticks, wild rodents	1992-2004	Kangwon/Chungju Korea	8-9
	<i>B. garinii</i>	Ticks, wild rodents	1992-2002	Kangwon/Chungju Korea	8-9
<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans</i> (serovar lai)	Human, wild rodents	1984-1989	Wonju/Kongju/Hongchon/ Kangju, Korea	10
	<i>L. interrogans</i> (serovar canicola)	Human, wild rodents	1985	Kongju, Korea	10
	<i>L. interrogans</i> (yeonchon and hongchon)	Human, wild rodents	1991	Yeonchon/Hongchon, Korea	11
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	<i>Boryong</i>	Human	1989	Boryong, Korea	12
	<i>Pajoo</i>	Human	1999	Pajoo, Korea	13
	<i>Yougworl</i>	Human	2000	Yougworl, Korea	13
	<i>Jecheon</i>	Human	2004	Jecheon, Korea	13
	<i>Yonchon</i>	Human	1997	Yonchon, Korea	14

그리고 분자생물학적인 방법으로 특성을 분석한다[7-9].

본 글에서는 1994년에 분리하여 보관 중이던 보렐리아 *Borrelia* spp.균주와 2014년부터 2015년에 걸쳐 분리한 보렐리아 *Borrelia* spp.와 렙토스피라 *Leptospira* spp. 균주에 대한 유전적 특성을 분석하여, 자원화 및 관련 연구의 방향을 제시하고자 한다.

몸 말

2014년에 경기도 파주, 강원도 평창에서 3종의 146마리 야생 설치류를 채집하였다(Table 2). 잡힌 야생 설치류의 장기와 혈액 검체를 채취하여 렙토스피라 병원체의 분리를 시도하였다. 잡은 야생 설치류 중 85마리를 다시 6개 그룹(6M-11M)으로 분류하였으며, 총 294개의 장기와 혈액 검체를 채취하였다. 렙토스피라 병원체의 유무를 파악하기 위해 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 실험을 실시하였고, 양성인 검체를 배양하여 렙토스피라균 8주를 분리하였다(Table 3). 또한, 1994년 해남에서 채집한 야생설치류와 진드기에서 분리된 보렐리아균 5주는 액체질소 안에서 장기보관으로 인해 생존한 균수가 매우 적었으나, 고유의 특성을 확인하기 위해 반복 계대배양하여 활성을 되찾았다(Table 3). 렙토스피라의

배양은 Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) 배지를 사용하여 32°C에서 배양하였으며, 보렐리아의 배양은 Barbour-Stoenner-Kelly (BSK)-2 배지와 BSK-H 배지를 1:1로 섞은 배지를 사용하여 32°C에서 배양하였다. Table 4에 제시된 프라이머를 사용하여 해당 균주들의 핵산을 특이적으로 증폭하고, 분자생물학적으로 특성을 분석하여 이들 정보와 함께 국가병원체자원은행에 13주를 기탁하였다.

사전에 시행한 렙토스피라 16S rDNA를 토대로 한 염기서열 계통수 분석에서, 본 연구에 사용된 8개의 균주는 *Leptospira interrogans* strain lai와 가장 유연관계가 있는 것으로 나타났다(data not shown). 본 연구에서는 8개의 기탁균주를 대상으로 보다 정확한 분석을 위해 렙토스피라의 *LipL32* 유전정보를 토대로 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) dendrogram 분석결과, 16S rDNA 분석 결과와 같이 *L. interrogans* strain lai와 가장 유연관계인 것으로 나타났다(Figure 1). 이 결과는 박 등[7]의 보고에 의한, 국내에서 분리된 균주를 16S rDNA와 *LipL32*를 이용해 분자생물학적으로 분석한 결과, 15개 중 14개 균주(KH-1, KH-2, WH-20, M07, M06, 18R, HM3, HK-12, CH88-19, CH-88-12, AP-33, A-19, A-15, 30R)가 *L. interrogans* strain lai에 매우 가까운 균주였음을 밝힌 결과와 거의 일치한 결과이다. 렙토스피라의 경우 단일 유전자

Table 2. Collected areas for wild rodents in this study, 2014

Pool	Survey area	<i>Apodemus agrarius</i>		<i>Crocidura lasiura</i>			<i>Microtus fortis</i>		Total 146
		Female	Male	Female	Male	Dead	Female	Male	
KR-1	Paju-si, Gyeonggi-do, Korea	11	14	0	0	0	1	0	26
KR-2	Cheorwon-gun, Gangwon-do, Korea	1	2	0	0	0	0	0	3
KR-3	Gimpo-si, Gyeonggi-do, Korea	8	8	0	0	0	1	0	17
KR-4	Chuncheon-si, Gangwon-do, Korea	16	3	0	0	0	0	0	19
KR-5	Gapyeong-gun, Gyeonggi-do, Korea	10	14	3	0	10	0	0	37
KR-6	Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea	4	7	1	0	0	0	0	12
KR-7	Pyeongchang-gun, Gangwon-do, Korea	10	21	0	0	0	0	1	32
KR-8	Paju-si, Gyeonggi-do, Korea	4	7	1	0	0	0	0	12
KR-9	Pyeongtaek-si, Gyeonggi-do, Korea	10	21	0	0	0	0	1	32

Table 3. Collection of *Borrelia* and *Leptospira* strains from wild animals and ticks isolated in 1994 and 2014 in various regions of South Korea that are used in the analysis of this study

Species/strain	Strain name	Reservoir	Origin	Year
<i>Leptospira interrogans</i>	7M-12			
	8M-6			
	11M-5			
	11M-12	<i>Apodemus agrarius</i> (organs and blood samples)	Pyongchang, Gangwon-do Pajoo, Kyunggi-do	2014
	11M-17			
	11M-19			
	11M-20			
11M-24				
<i>Borrelia</i> Hae Nam strains	HN7	<i>Ixodes granulatus</i>		
	HN9	<i>I. granulatus</i>		
	HN13	<i>A. agrarius</i>	Hae Nam, South Jeolla-do	1994
	HN17	<i>A. agrarius</i>		
	HN19	<i>A. agrarius</i>		

Table 4. Primers used in nucleotide sequence analysis for *Borrelia* spp. and *Leptospira* spp

Genus	Target gene	Primer (WJ series)	Positions	Nucleotide sequence (5' → 3')
<i>Borrelia</i>	<i>16S rDNA</i>	771OF	-89 ~ -70	AGAGTTTGATCCTGGCTTAG
		738OR	1,539 ~ 1,522	TMAAGGAGGTGATCCAGC
<i>Leptospira</i>	<i>LipL32</i>	131OF	1 ~ 21	ATGAAAAAACTTTCGATTTTG
		132OR	819 ~ 799	TTACTTAGTCGCGTCAGAAGC

정보의 분석으로 분류 및 특성분석이 쉽지 않기 때문에 좀 더 명확한 결과를 얻기 위해서는 위에 사용된 유전정보에 *LipL41* 유전정보를 추가 분석하여 역시 같은 결과를 얻었다(data not shown). 본 연구에서 분석한 8개 분리균주는 BLAST 검색 (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 혈청형 lai와 99% 일치하였지만, 특정부위가 다른 균주임이 확인되어 기존에 알려진 국외 균주와 구분되는 양상을 보였다(Figure 1).

라임병의 원인균인 보렐리아균은 종별로 다양한 유전적 변이양상을 지니고 있으므로, 5개 균주의 *16S rDNA* 유전자를 분석하여 그 유전적 특성을 확인하였다. 본 글에서의 보렐리아

염기서열은 박 등[8]에서 발표된 자료를 재분석하여, 추가적인 자료를 제공 할 수 있었다. 보렐리아 *16S rDNA*를 분석한 결과, 5개의 기탁균주(Hae Nam strain; HN) 중 HN13는 *Borrelia garinii* DK27주와 99.9%로 유연관계가 높았고, HN19는 *Borrelia* sp. B31과 99.9%의 상동성을 보였다. HN7, HN9, HN17주는 *B. afzelii*와 상동성이 각각 99.9%, 99.9%, 99.8%로 유연관계가 높게 나타났다(Figure 2). 모든 기탁균주가 같은 지리적 위치(전라남도 해남)에서 채집한 진드기에서 분리된 점을 감안하면, 이 같은 다양성은 매우 흥미로운 결과로 볼 수 있다. 본 연구에서는 기탁균주들이 근연관계가 있는 참조균주의 염기서열과 일부 차이를 보이는 것이 확인되었다(Figure 2).

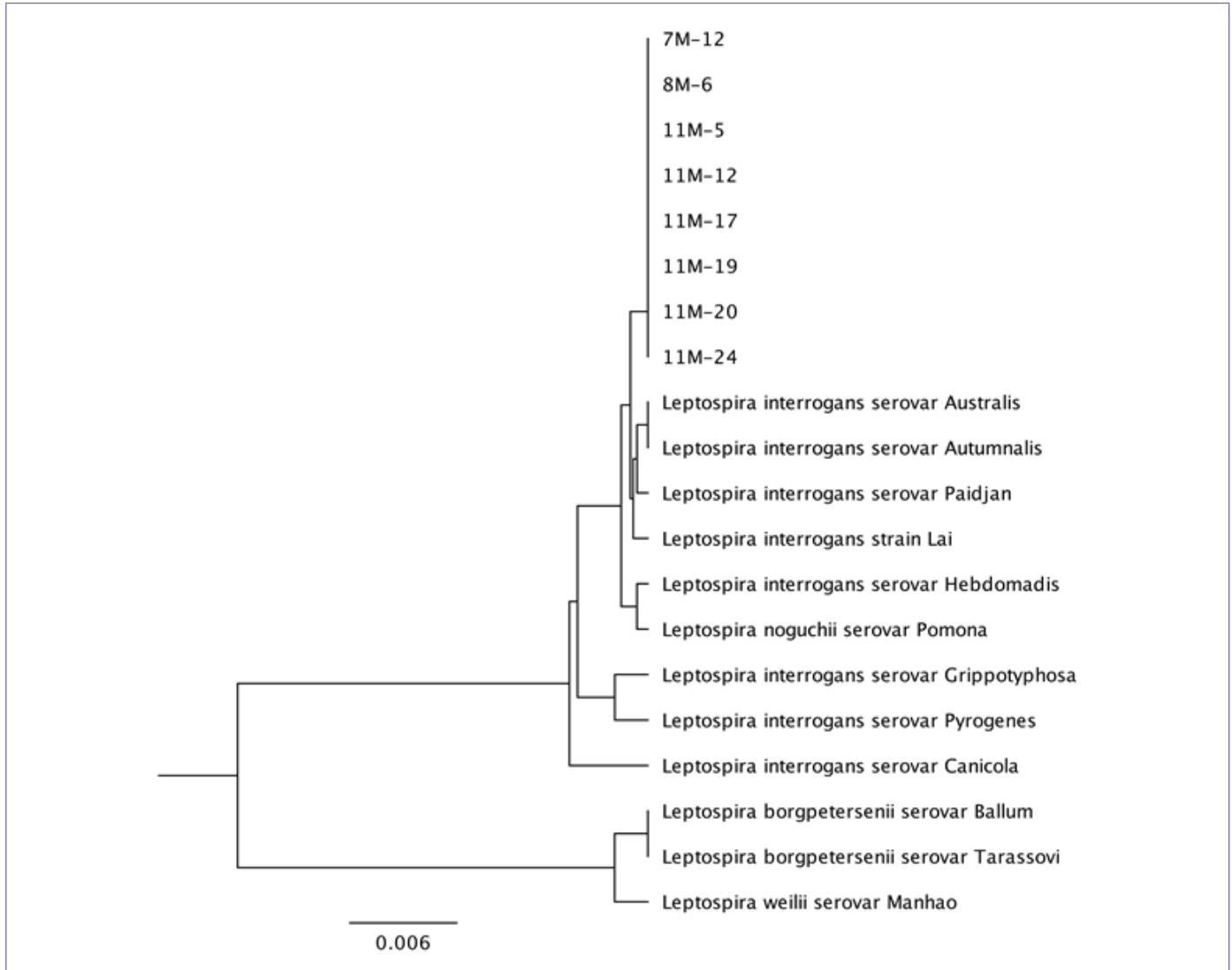


Figure 1. UPGMA dendrogram including 8 isolated *Leptospira* strains (7M-12, 8M-6, 11M-5, 11M-12, 11M-17, 11M-19, 11M-20, 11M-24) based on *LipL32* from with an incorporation of available reference sequences of the genus *Leptospira*. The scale bar represents distance (i.e., substitution per sequence position). Outgroup was not used. This analysis was accomplished by using Geneious Pro 9.1.5 Software (Biomatters Ltd.). [Gene bank accession numbers; *L. interrogans* serovar Australis AY609325, Autumnalis JN210551, Canicola AY609321, Grippotyphosa EU871723, Hebdomadis GU220823, Lai AY568679, Paidjan AY609329, Pomona AY461910, Pyrogenes HM449749, *L. borgpetersenii* serovar Ballum CP012029, *L. weilii* serovar Manhao AY609331]

따라서 병원체자원에 대한 세부적인 특성 정보가 추가되어야 할 것이고, 이를 통한 재분류는 물론 신종병원체자원의 가능성도 확인해 볼 필요가 있다. 보렐리아균은 렙토스피라균주와 마찬가지로 유전자 단편의 분석으로 분류 및 특성분석이 어렵기 때문에 *flaB*, *gyrB*, *glpQ*, *5S-23S* intergenic spacer 등 주요 부분의 염기서열 또는 유전자 전체의 분석이 큰 도움이 될 것이다.

맺음 말

본 연구에 사용된 렙토스피라와 보렐리아를 비롯한 난배양성 병원체들은 배양과 유지 보존에 많은 어려움이 따르고 있다. 이들 병원체들의 배양조건이 매우 까다로우며, 일반적인 동결건조나 초저온 냉동보존 등의 방법으로 장기간 보존이 어렵기 때문에 정기적으로 계대를 해야만 하는 실정이다[7]. 표준화된 병원체자원의 확보는 해당 자원의 활용 연구 및 진단,

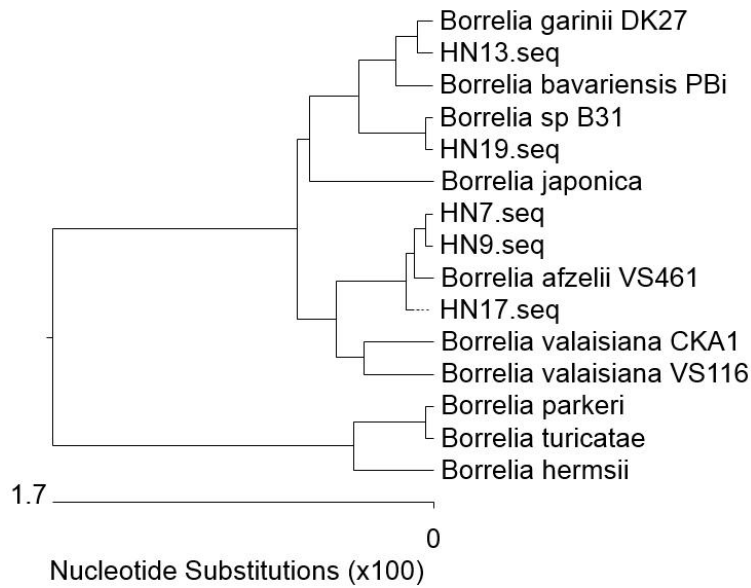


Figure 2. Dendrogram including 5 isolated *Borrelia* strains (HN7, HN9, HN13, HN17, HN19) based on *16S rDNA* from with an incorporation of available reference sequences of the species that belong to Family *Spirochaetaceae*. The scale bar represents distance (i.e., substitution per sequence position). Outgroup was not used. This analysis was accomplished by using MegAlign software package (DNASTAR, Lasergene 7.1, WI, USA). [Gene bank accession numbers; *Borrelia afzelii* VS461 NR104748, *B. bavariensis* strain PBI NR074854, *B. garinii* DK27 X85193, *B. hermsii* BHU42292, *B. japonica* L40598, *B. parkeri* AF210137, *Borrelia* sp. B31 AF467957, *B. turicatae* U42299, *B. valaisiana* CKA1 AB022141, VS116 NR036807].

치료 및 백신개발 등 보건산업 발전에 매우 중요한 부분이다. 이 가운데 난배양성 병원체는 미래 보건의료연구 활용 가능성이 높음에도 불구하고, 그 기술적 어려움으로 많은 노력과 비용이 필요하기 때문에 균주확보가 어려운 실정이다. 그러므로 난배양성 병원체의 분리 및 배양이 가능한 연구기관을 국가 차원에서 발굴하고, 지원하여 난배양성 병원체균주를 지속적으로 확보하고 자원화할 수 있는 기반을 마련하는 것이 필요할 것이다.

참고문헌

1. Park Y.S., Lee C., Kim K.M., Kim S.W., Lee K.J., Ahn J., Ki M. (2015) The first case of the 2015 Korean Middle East Respiratory Syndrome outbreak. *Epidemiol Health* 37: 1-5.
2. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., Magassouba N., Soropogui B., Sow M.S., Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. (2016) Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med* 371: 1418-25. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pahlmann%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24738640)
3. Carlson C.J., Dougherty E.R., Getz W. (2016) An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10: 1-18.
4. Greiber T., Moreno S.P., Ahrén M., Carrasco J.N., Kamau E.C., Medaglia J.C., Oliva M.J., Perron-Welch F., Ali N., Williams C. (2012) An explanatory guide to the Nagoya Protocol on access and benefit-sharing. ICUN. Gland, Switzerland, xvii + 372 pp.
5. Ramamurthy T., Ghosh A., Pazhani G.P., Shinoda S. (2014) Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Public Health* 2: Article 103: 1-9.

6. Park K.H., Choi Y.J., Shin S.H., Choi M.K., Kim Y.W., Jang W.J. (2014) Identification of *Leptospira* species of Korean isolates using phylogenetic analysis of polymerase chain reaction-amplified *16s rDNA* and *LipL32* genes, *J Bacteriol Virol* 44: 59–66.
7. Park K.H., Hahn M.J., Lee S.H., Kim J.H., Shim J.C., Jang W.J., Chang W.H. (1994) Isolation and antigenic identification of *Borrelia burgdorferi* from ticks in Korea, *J Korean Soc Microbiol* 29: 607–617.
8. Park K.H., Lee S.H., Won W.J., Jang W.J., Chang W.H. (1992) Isolation of *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease, from Ixodes ticks in Korea, *J Korean Soc Microbiol* 27: 307–12.
9. Lee S.H., Kim J.H., Jung K.D., Lee J.H., Kim S.C., Kim J.E., Hong S.J., Jang W.J., Park K.H. (2002) Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated in Chungju, Korea, by *ospC* gene sequence analysis, *J Bacteriol Virol* 32: 159–164.
10. Cho M.K., Lee J.H., Yoon C.S., Kim Y.W., Min C.H., Kim Y.S., Park K.S., Oh H.B. (1989) Serological analysis of *Leptospira interrogans* isolated in Korea using monoclonal antibodies and cross-agglutinin absorption test, *J Korean Soc Microbiol* 24: 539–548.
11. Oh H.B., Chang W.H., Cho M.K., Seong W.K., Park K.S. (1991) Identification of new serovar yeonchon and hongchon belonging to *Leptospira interrogans* lcterohaemorrhagiae serogroup, *J Korean Soc Microbiol* 26: 253–262.
12. Lee Y.M., Kim D.M., Lee S.H., Jang M.S., Neupane G.P. (2011) Phylogenetic analysis of the 56 kDa protein genes of *Orientia tsutsugamushi* in southwest area of Korea, *Am J Trop Med Hyg* 84: 250–254.
13. Shim S.K., Shin Y.K., Choi E.N., Han B.G., Lee H.K., Choi Y.S., Lee B.C., Yoon K.S., Park M.Y. (2005) Analysis of cellular fatty acids in *Orientia tsutsugamushi* as taxonomic markers, *Microbiol Immunol* 49: 343–347.
14. Seong S.Y., Park S.G., Kim H.R., Han T.H., Kang J.S., Choi M.S., Kim I.S., Chang W.H. (1997) Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype, *Microbiol Immunol* 41: 437–443.

※ 이 글은 2015 질병관리본부 학술연구개발용역과제인 “신·변종 병원체 및 인체유래 검체자원 은행” 결과보고서를 일부 요약 정리한 내용입니다.