

유전자증폭을 이용하여 일개 지역보건소에서 여성 성매매자들의 클라미디아 트라코마티스 유병률 조사

Cryptic Plasmid Amplification of *Chlamydia trachomatis* at a Korean Health Center for Female Commercial Sex Workers

Gilho Lee, Inho Sohng

From the Department of Urology, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Purpose: *Chlamydia trachomatis* infection is the most common bacterial sexually transmitted disease. It is generally accepted that female commercial sex workers (FCSWs) are at an increased risk of incurring sexually transmitted disease (STD) because of their high numbers of sexual partners. Even though chlamydial infections in FCSWs have been linked with serious public health problems, there are very few reports about the prevalence of chlamydial infection in FCSWs in Korea. The purpose of this study was to determine the prevalence of chlamydial infection in FCSWs by performing cryptic plasmid gene amplification.

Materials and Methods: Genomic DNAs were extracted from the endo-cervical cotton swabs taken from 410 FCSWs in one Korean health center from April 2004 to August 2004; these FCSWs had visited there for periodic STD check ups. The human beta-globin and cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* from the genomic DNA were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: Four hundred and ten FCSWs (mean age: 25±6 years) were enrolled. A total of 410 endo-cervical samples from the FCSWs showed beta-globin bands in 1.5% agarose gel, and all the samples were included in this study. The cryptic plasmid was identified in 82 of the 410 FCSWs (20%).

Conclusions: We confirmed the FCSWs were a core group that spread *Chlamydia*. To promote public health and for cost effectiveness, massive screenings with gene amplification methods for the FCSWs to detect chlamydial infection are needed. (**Korean J Urol 2006;47:37-41**)

Key Words: *Chlamydia trachomatis*, Polymerase chain reaction, Prevalence, Sex, Workers

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 1 호 2006

단국대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이길호 · 송인호

접수일자 : 2005년 5월 18일
채택일자 : 2005년 8월 3일

교신저자: 이길호
단국대학교병원 비뇨기과
충남 천안시 안서동 산 29
☎ 330-715
TEL: 041-550-6630
FAX: 041-550-3905
E-mail: gilho@dankook.ac.kr

이 연구는 2004학년도 단국대학교 대학 연구비의 지원으로 연구되었음.

서 론

클라미디아 트라코마티스에 의한 남녀 생식기 감염은 가장 흔한 성병 중 하나이며, 미국의 경우 매년 약 300만 명의 환자에서 발병되고 있다.¹ 또한 클라미디아에 관련된 치료비로 일년에 24억 불 정도를 지출하고 이 돈의 대부분을 클라미디아의 합병증 즉 골반염이나, 이차적인 불임 등의 치

료에 쓰여, 정확한 검사로 질병을 조기에 발견하여 그 합병증을 예방하는 것이 매우 중요하다.²

감염된 약 80% 여성에서는 질 분비물 증가나 형태의 변화 등 전형적인 증상이 없고, 남성의 경우에도 약 50% 정도가 요도 자극증상이나 분비물 등의 증상이 없어 많은 환자들이 치료를 받지 않거나 받을 필요성을 느끼지 못하고 성상대자와 지속적인 성관계를 가짐으로써 성병 전염에 중요한 역할을 한다.³ 이와 같이 클라미디아 감염 후 모호한 증

상으로 특이도와 민감도가 높고, 경제적인 검사방법이 요구되고 있으며, 지금까지 클라미디아 배양검사, 순간검사법 (rapid test), enzyme immunoassay (EIA), nucleic acid amplification test (NAAT) 등이 개발되었다.² 하지만 제한된 의료비 등을 고려하면 모든 사람을 대상으로 상기 검사를 시행할 수가 없으며, 성병의 전염될 가능성이 높고 또한 타인에게 쉽게 감염시킬 수 있는 사람을 대상으로 선택적으로 시행하는 것이 좋다.⁴ 지금까지 세계적으로 알려진 성병핵심군 (core group)은 15-20세의 여자, 감옥에 수용된 범죄자, 노숙자, 성매매자 등을 생각할 수가 있으며, 이들을 대상으로 선별검사를 시행하면 비교적 적은 돈으로 비교적 쉽게 성병관리를 할 수 있다.² 이들 중 여성 성매매자는 성매매로 생계를 유지하는 군으로 미국이나 유럽에서 클라미디아의 고위험군으로 알려진 15-20세의 여자들과 다른 특징을 보일 것으로 추정된다. 하지만 우리나라에서는 아직까지 이러한 성병핵심군에서의 클라미디아 감염률에 대한 논문은 소수에 그치고 있으며, 특히 성매매자를 대상으로 유병률 조사는 전무한 실정이다.^{5,6} 보건소에서 성매매자들을 대상으로 시행되고 있는 표준 클라미디아 검사법은 EIA의 일종인 신속검사법으로 이는 낮은 민감도로 많은 나라에서 이미 폐기된 검사법이며, 세계보건기구나 미국의 질병관리본부에서는 유전자 증폭법으로 대체할 것을 권유하고 있다.⁷ 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR) 방법은 클라미디아의 유전자 염기서열을 증폭하는 것으로 PCR 방법 도입으로 기존의 진단방법과 비교하여 진단율을 20-30% 증가시킬 수가 있었다.⁸

이에 저자는 우리나라에서 클라미디아 유병률이 가장 높은 것으로 추정되는 여성 성매매자를 대상으로 유전자 증폭법을 이용하여, 그 감염실태를 조사하고 향후 보건 정책에 참고자료로 쓰기 위해 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2004년 4월부터 8월까지 약 5개월에 걸쳐 경기도에 있는 일개 보건소에서 주기적인 건강검진을 받기 위해 모인 여성 성매매자 410명을 대상으로 하였으며, 검사과정을 설명하고 동의를 받았다. 대상군의 평균연령은 25±6세였다.

2. DNA 추출

PBS (phosphate-buffered saline, 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, pH 7.4)를 적신 면봉을 자궁경부 안쪽에 넣어 상피세포를 얻어 미리 냉장 보관된 1ml의 PBS

Table 1. Primers used for human beta-globin and the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis*

Sequence name	Primer sequences (5'-3')	Product length
Globin 1	ggt gaa cgt gga tga agt tg	270bp
Globin 2	caa ctt cat cca cgt tca c	
KL1	tcc gga gcg agt tac gaa ga	241bp
KL2	tgg tta ggg ccc gta act aa	

용액이 들어 있는 소독된 1.5ml 관에 보관하였다. 여러 번 vortexing을 시행한 후 면봉은 버리고 13,000xg로 원심분리한 후 상층액은 버린 다음 다시 PBS 용액으로 다시 한 번 반복하여 수세, 원심분리 후 상층액을 버리고 남아 있는 PBS 용액으로 침전물을 부유시켰다. Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후, TE buffer (DNA rehydration buffer)로 용해시킨 후 -20°C에 냉장 보관하였다.⁹

3. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction)

시동염기서열 KL1, KL2는 바이오니아 (대전, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였으며 그 순도는 MALDI-TOF로 확인하였다. Housekeeping 유전자로 beta-globin으로 하였으며 이를 바이오니아에 제작 의뢰하였다 (Table 1). 모든 증폭 혼합물은 master 혼합물을 만들어 24μl씩 분주하였으며 위에 추출한 주형 1μl를 혼합하여 증폭하였다. Master 혼합물 24μl 안에는 Taq polymerase 1 unit (Promega, USA), 10배 Solution B (20mM Tris-HCl 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet-P40) 2.5μl를 사용하였다. dNTP 혼합물 (Promega) 200μM, MgCl₂ (1.5 mM), 시동염기서열 앞 (KL1), 뒤 방향 (KL2)으로 각각 25 pmole로 총 25μl로 만들었다 (Table 1). 유전자증폭기는 GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, USA)를 사용하였으며 첫 회 증폭 조건은 94°C에 4분, 94°C에 30초, 53°C 30초, 72°C에 30초로 25회 증폭하였으며 72°C에 4분 연장하였다. House keeping 유전자인 beta-globin의 증폭은 상기 같은 조건의 master 혼합물을 만들고, 증폭조건은 94°C에 4분, 94°C에 30초, 53°C 30초, 72°C에 1분 50초로 30회 증폭하였으며 72°C에 4분 연장하였다. 증폭한 DNA 5μl를 1.5% agarose gel (Promega, USA)에 0.5배 희석 TBE buffer (1M Tris, 1M boric acid, 20mM EDTA, pH 8.3)를 이용하여 100V 전압으로 45분 동안 이동시켰다. Ethidium bromide (Sigma, USA)로 1시간 염색한 후 30분간 증류수로 수세를 시키고 사진을 얻었다. 양성표준주형은 클라미디아 serovar G 형으로 대한민국 국립보건원에서 받았다.

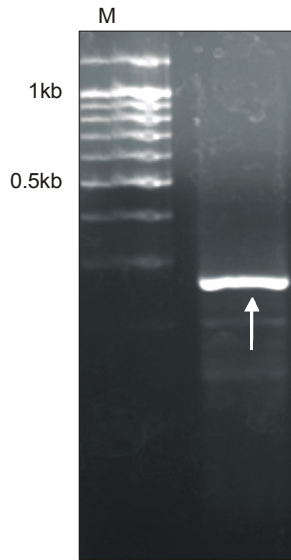


Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) results of human beta-globin (arrow). All the samples show a band of human beta-globin, which is a housekeeper gene. M: 100bp DNA ladder marker (Promega).

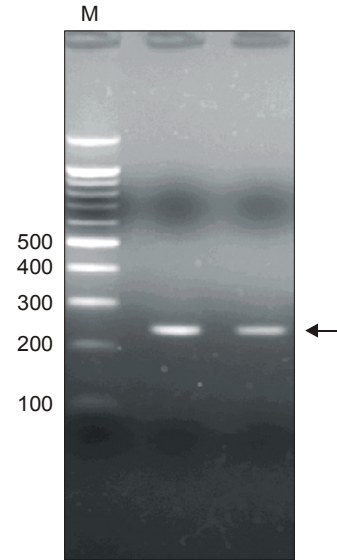


Fig. 2. PCR results of testing for the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* (arrow). The cryptic plasmid is identified in 82 of the 410 female commercial sex workers. M: 100bp DNA ladder marker (Promega).

결 과

410례의 모든 검체에서 housekeeper 유전자의 일종인 beta-globin이 검출되어 클라미디아 증폭에 적당한 검체임을 알 수 있다 (Fig. 1). 410례 중 82례 (20%)에서 클라미디아 cryptic plasmid가 증폭되어, 클라미디아에 감염되었음을 알 수 있다 (Fig. 2).

고 찰

클라미디아 트라코마티스는 숙주세포 내에 기생하는 세균의 일종으로 핵산 구조가 단순하고, 균이 생존하기에 필수적인 ATP (adenosine triphosphate)의 대부분을 자체 합성을 하지 못한다.¹⁰ 클라미디아는 생존, 복제에 필요한 에너지를 감염된 숙주에서 얻어야 하므로, 감염된 숙주세포의 죽음 등과 같은 급격한 숙주의 변화를 초래하지 않고, 장시간에 걸쳐 숙주세포의 주요 기능을 억제하거나 혹은 숙주의 영양분을 고갈시켜 숙주의 성장 등을 억제하기도 한다.¹⁰ 이러한 이유로 클라미디아에 감염된 대부분의 환자에서 다량의 요도분비물이나 심한 배뇨통, 질분비물 등과 같은 감염의 전형적인 증상이 관찰되지 않는다.

클라미디아의 감염으로 발생하는 심각한 합병증을 예방하기 위해서는 무증상의 환자를 증상에 의존하지 않고, 민

감도가 높은 다양한 진단기법을 이용하여 조기에 진단하는 것이 중요하다.¹¹ 배양은 진단검사 중에 가장 높은 특이도를 보이지만 장기간의 검체 이동 시 균의 죽음과 동반된 위음성, 낮은 inclusion forming unit (IFU)로 인한 낮은 민감도, 각 검사실에 따라 배양방법이 표준화되지 않는 점, 배양검사에 오랜 시간이 걸리고 다른 세균에 의한 오염, 고비용 등으로 일반 검사실에서 시행하기에는 많은 어려움이 있다.^{11,12} EIA법 또한 숙련된 검사자가 있어야 하고, 형광현미경 등의 고가 장비가 필요하며, 일회용 검사장비 또한 수입품으로 고가이다. 현재 국내 보건소에 표준 검사법의 일종인 클라미디아 순간법은 매우 낮은 민감도와 확진을 위해 배양검사가 필요한 점, 고가인 일회용 검사장비 등을 고려하면 많은 환자를 대상으로 한 선별검사에 사용되기에는 부적절하다.⁷ NAAT법 즉 유전자 증폭법은 클라미디아의 유전자를 증폭시켜 진단하는 방법으로 현재 세계보건기구 및 많은 나라에서 클라미디아 표준 진단법으로 권장하고 있다.^{13,14} 방법상으로 클라미디아 외막의 omp1 유전자를 증폭하는 방법과 클라미디아에 내재한 잠복플라스미드 (cryptic plasmid)를 증폭하는 방법이 있다.¹⁵ 플라스미드 잠복유전자는 유전자 염기서열 분석 때 사용되는 omp1 유전자에 비해 양적으로 많아 매우 적은 양이라도 쉽게 증폭할 수 있는 장점이 있어, 여러 회사의 제품에서나 in house PCR 법에서 목표 유전자로 많이 사용되고 있다. 상업적으로 Roche사 (Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland)의 Ampli-

cor kit와, ligase chain reaction (LCR)를 이용한 Abbott사 (Abbott laboratories, Abbott Park, Illinois) kit 등이 잠복 플라스미드를 증폭하여 클라미디아를 진단하고 그 민감도를 99%까지 보고하고 있다.^{13,14} 저자의 경우에도 진단 유전자로 클라미디아 잠복유전자를 목표로 하였다.

성병 중 가장 많이 관찰되고, 심각한 합병증을 초래하는 클라미디아를 조기 진단하기 위해 모든 국민을 대상으로 클라미디아 선별검사를 시행한다면 그 경제적인 부담을 무시할 수 없다. 예를 들면 우리나라에서 일개 병원의 산부인과에 절반비율, 동통, 산전진찰 등으로 내원한 환자를 대상으로 유전자증폭법을 이용한 클라미디아 유병률은 약 5% 정도로 추정되었으며,⁹ 무작위로 모든 국민들을 대상으로 클라미디아 검사를 시행한다면 그 유병률은 더욱 낮을 것으로 추정된다. 경제적인 측면으로 본다면 무작위 검사는 매우 비효율적임을 알 수 있다. 하지만 성병전파에 가장 중요한 역할을 하는 성병핵심군을 파악하고 있다면 그 핵심군에 집중적인 투자로 그 핵심군뿐만 아니라 그 군에 연결된 다른 고리도 적은 비용으로 효과적으로 조절이 가능하고 궁극적으로 적은 비용으로 클라미디아 전파를 억제할 수가 있다.¹⁶

Lee 등⁵은 18-25세의 여자 대학생에서 클라미디아 유병률은 10.6%, 남자 대학생은 8.4%로 보고하였다. 또한 그는 10-19세의 노숙자는 12.6%에서 클라미디아가 검출된다고 보고하였다.⁶ 하지만 아직까지 우리나라에서는 누가 이러한 성병전파에 중요한 핵심적인 고리역할을 하는가에 대한 연구는 아직까지 체계적으로 이루어지지 않았는데, 특히 여성 성매매자를 대상으로 한 연구는 거의 없다. 외국의 경우 15-20세의 여성, 노숙자, 여성 성매매자 등이 중요한 역할을 한다고 알려지고 있으며,² 이러한 이유로 여성 성매매자는 우리나라에서도 성병전파에 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정 가능하다.

여성 성매매자들은 다른 성병핵심군에서 볼 수 없는 여러 가지 특징을 보여주고 있다. 그들은 보통 20세 이전에 성매매를 시작하고 있으며, 한 달에 20일 정도 일을 하고 있으며, 많은 여성들이 피임을 위해 성병의 유병률을 높일 수 있는 여성호르몬제를 복용하기도 한다.¹⁷ 또한 그들과 성관계를 가지는 성매수자 역시 성병핵심군으로 추정된다. 성매매자들은 성매수자들로부터 성병이 전염되기도 하고, 혹은 자신의 성병을 전파시켜 성매수자가 성병전파의 가교 역할을 하여 성병감염의 확률이 낮은 여성을 이차 감염을 시키기도 한다.

유전자증폭법과 같은 매우 민감도와 특이도가 높은 검사법을 이용하여 여성 성매매자와 같은 성병핵심군을 대상으로 대규모 선별검사를 시행한다면, 적은 비용으로 클라미

디아 합병증의 감소와 성병전파를 억제할 수 있는 매우 효율적인 방법이라고 생각한다. 그러나 지금까지 국내 보건소에서는 여성 성매매자를 대상으로 한 클라미디아 검사법은 신속검사법이나 증상에 의존한 진단방법으로, 그 유병률이 5% 이하로 추정될 정도로 매우 낮아 저자의 결론을 비추어 보면 빠른 시간에 유전자 증폭법으로 검사방법을 바꾸어야 할 것으로 생각한다.¹⁸

저자들은 2004년 4월부터 8월까지 5개월에 걸쳐 검체를 채취하였으며, 이때까지는 여성 성매매자들이 자발적으로 검사에 많이 참석하였다. 하지만 2004년 9월에 시행된 강력한 성매매 방지법 이후로는 성매매자들의 자발적인 검사가 매우 저조하고, 또한 성매매 장소 역시 다양화되고, 음성화되어 저자의 실험과 같은 대규모의 실험을 할 수 없는 실정이다.

저자의 논문의 의의로는 클라미디아 진단에 가장 효율성이 높은 검사법인 유전자 증폭법을 이용하여 성병핵심군인 여성 성매매자의 클라미디아 유병률을 조사하였으며, 그 결과로 그 유병률이 기존에 보고된 것과 다르게 매우 높은 것을 알 수 있다. 또한 향후 여성 성매매자를 대상으로 대규모 클라미디아 선별검사가 시행될 때 본 자료는 성매매방지법이 여성 성매매자들의 클라미디아 유병률에 어떠한 영향을 미쳤는가를 평가할 때 기본적인 자료로 활용될 것으로 생각한다.

결 론

상기 결과로 일개지역의 여성 성매매자들의 클라미디아 유병률은 20% 정도로 추산되어 그들이 우리나라에서 성병핵심군임을 알 수 있다. 앞으로 국민 보건 향상과 그들의 자궁의 임신, 골반염 등의 합병증 방지를 위해 이들을 대상으로 유전자 증폭법을 이용한 조직적이고 광범위한 선별검사가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Groseclose SL, Zaidi AA, DeLisle SJ, Levine WC, St Louis ME. Estimated incidence and prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infections in the United States, 1996. *Sex Transm Dis* 1999;26:339-44
2. Stamm WE. *Chlamydia trachomatis* infections of the adult. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh P, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, editors. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1999;407-22
3. National guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical So-

- ciety for the Study of Venereal Diseases). Sex Transm Infect 1999;75(Suppl 1):S4-8
4. Humblet O, Paul C, Dickson N. Core group evolution over time: high-risk sexual behavior in a birth cohort between sexual debut and age 26. Sex Transm Dis 2003;30:818-24
5. Lee SJ, Cho YH, Ha US, Kim SW, Yoon MS, Bae K. Sexual behavior survey and screening for chlamydia and gonorrhea in University students in South Korea. Int J Urol 2005;12:187-93
6. Lee SJ, Cho YH, Kim CS, Shim BS, Cho IR, Chung JI, et al. Screening for *Chlamydia* and *gonorrhea* by strand displacement amplification in homeless adolescents attending youth shelters in Korea. J Korean Med Sci 2004;19:495-500
7. Widjaja S, Cohen S, Brady WE, O'reilly K, Susanto, Wibowo A, et al. Evaluation of a rapid assay for detection of *Chlamydia trachomatis* infections in outpatient clinics in South Kalimantan, Indonesia. J Clin Microbiol 1999;37:4183-5
8. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997;10:160-84
9. Kim BR, Lee GH. A semi-nested polymerase chain reaction for amplification of *Chlamydia trachomatis* omp1 gene. Korean J Urol 2003;44:812-8
10. Moulder JW. Characteristics of *Chlamydia*. In: Barron AL, editor. Microbiology of *Chlamydia*. Boca Raton: CRC Press; 1988;4-19
11. Johnson RE, Green TA, Schachter J, Jones RB, Hook EW 3rd, Black CM, et al. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men. J Clin Microbiol 2000;38:4382-6
12. Pate MS, Hook EW 3rd. Laboratory to laboratory variation in *Chlamydia trachomatis* culture practices. Sex Transm Dis 1995;22:322-6
13. Pasternack R, Vuorinen P, Pitkajarvi T, Koskela M, Miettinen A. Comparison of manual Amplicor PCR, Cobas Amplicor PCR, and LCx assays for detection of *Chlamydia trachomatis* infection in women by using urine specimens. J Clin Microbiol 1997;35:402-5
14. Davis JD, Riley PK, Peters CW, Rand KH. A comparison of ligase chain reaction to polymerase chain reaction in the detection of *Chlamydia trachomatis* endocervical infections. Infect Dis Obstet Gynecol 1998;6:57-60
15. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. J Clin Microbiol 1993;31:1753-8
16. Poulin C, Alary M, Bernier F, Carbonneau D, Boily MC, Joly JR. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among at-risk women, young sex workers, and street youth attending community organizations in Quebec City, Canada. Sex Transm Dis 2001;28:437-43
17. Gertig DM, Kapiga SH, Shao JF, Hunter DJ. Risk factors for sexually transmitted diseases among women attending family planning clinics in Dar-es-Salaam, Tanzania. Genitourin Med 1997;73:39-43
18. Lee G, Kim B, Byun OM, Yoon WY, Song IH. Evaluation of a rapid test for detection of *Chlamydia trachomatis* infection to female commercial sex workers in Korea. Korean J Urol 2004;45(Suppl 2):S138