

스웨덴에서 발견된 돌연변이형 클라미디아 트라코마티스

김재경, 이길호¹단국대학교병원 특수검사실, ¹단국대학교 의과대학 비뇨기과학교실Swedish Variant of *Chlamydia trachomatis* in KoreaJae Kyung Kim, Gilho Lee¹Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital, ¹Department of Urology, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Purpose: Today, many urologists use nucleic acid amplification tests (NAAT) in diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in Korea. A new variant of *C. trachomatis* with a deletion in the cryptic plasmid, which cannot be detected using commercial tests targeting the deleted DNA sequences, has been found in Sweden. Therefore, the partial deletion of cryptic plasmid DNA means that the diagnostic standards cannot detect chlamydial infection any more in cases of new mutants. The mutant type has been prevalent in Sweden, however, its incidence was not high in other countries such as France, Holland, and Denmark. In order to study the existence of this mutant *C. trachomatis* in Korea, we developed new primer sets for detection of this mutation.

Materials and Methods: We collected the first voided urine from male urethritis patient from April 2012 to August 2013 (Dankook University Hospital, Cheonan, Korea). We used the 25 confirmed *C. trachomatis*-positive specimens by using KL1 and KL2 primers for *C. trachomatis* and tested the existence of mutant chlamydial infection with the newly developed primer sets.

Results: We could not detect any new variant in the samples.

Conclusions: Although this mutant *C. trachomatis* is not seen in Korea, we should watch for the occurrence of the type in the future. I would like to briefly report on implications of the surging mutant forms and how we might attain an understanding of this phenomenon.

Keywords: Cryptic plasmid; *Chlamydia trachomatis*; Variant

Received: 9 October, 2013**Revised:** 15 October, 2013**Accepted:** 15 October, 2013**Correspondence to:** Gilho LeeDepartment of Urology, Dankook University Hospital,
201, Manghyang-ro, Dongnam-gu, Cheonan 330-715,
Korea

Tel: +82-41-550-6630, Fax: +82-41-550-3905

E-mail: multiorigins@yahoo.com

No potential conflict of interest relevant to this
article was reported.

Copyright © 2013, Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation. All rights reserved.
© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution
Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted
non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)에 의한
남녀 생식기 감염은 가장 흔한 성병(성매개감염 질환) 중

하나이며, 증상이 없는 경우가 많아 장기간 방치하면 여성에서
는 만성골반염, 나팔관 협착으로 인한 자궁 외 임신 및 불임,
남성에서는 부고환염으로 인한 불임 등을 초래한다.^{1,2}

최근 *C. trachomatis*는 핵산유전자 증폭법의 일종인 핵산증

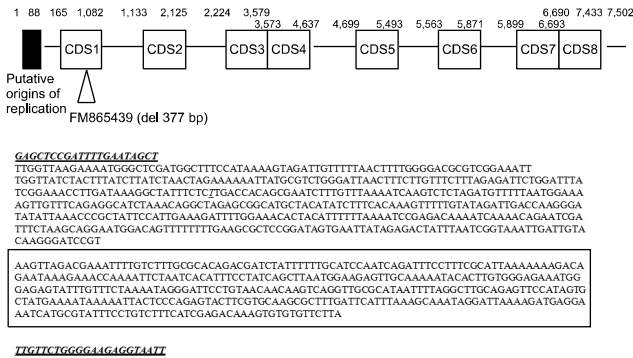


Fig. 1. Schematic view of the partial *Chlamydia trachomatis* cryptic plasmid DNA sequences (reference sequence: HE603233.1). *Chlamydia trachomatis* plasmid pSW2, strain Sweden2, serovar E (reference sequence; FM8654) revealed 1 377-bp deletion in CDS1 region (box). CDS; coding sequence.

폭법(nucleic acid amplification test, NAAT)을 이용해 진단하고 있으며, 많은 환자들이 조기에 진단되어 합병증 없이 완치되고 있다.³

스웨덴 도시 Orebro에서 지난 1997년부터 2005년 동안 *C. trachomatis* 유병률은 타 지방과 같이 조금씩 증가하였다. 그러나 2005년의 *C. trachomatis* 유병률은 인구 10만 명당 336명이었지만 2006년에는 인구 10만 명당 311명으로 감소하였다. 또한 2005년도에는 McCoy 세포를 이용한 *C. trachomatis* 배양검사에서는 5.4%에서 양성으로, Cobas Amplicor (Roche, Pleasanton, CA, USA)를 응용한 NAAT법에서는 7.1%에서 양성으로 진단되었지만, 2006년도에는 배양검사에서는 5.6%로 소폭 증가하였으나 NAAT법으로는 6.5%로 감소하였다. 스웨덴 연구자들은 이러한 *C. trachomatis*의 유병률 감소의 원인으로 Cobas Amplicor가 사용하고 있는 목표유전자의 돌연변이로 인한 Cobas Amplicor의 위음성 가능성을 조사하였고, 그들의 가설에 일치하는 *C. trachomatis*의 cryptic plasmid CDS1 (coding sequence 1)에서 377 bp가 결손된 FM865439 염기서열을 증명하여 발표하였다(Fig. 1).^{4,5} 많은 NAAT법을 기반으로 하는 자동진단검사 기기가 결손된 DNA 염기서열을 목표 유전자로 하고 있었고, 이러한 목표유전자 결손은 기존의 진단 기기로는 *C. trachomatis*를 진단할 수 없다는 데 그 중요한 임상적인 의미가 있다. 스웨덴 이외 국가에서 이러한 돌연변이 *C. trachomatis*의 유병률은 국가에 따라 다양하게 보고되고 있다. 노르웨이에서는 2007년도 1사분기에는 1.0%에서 2008년도 2사분기에는 3.2%로 증가하였으며, 덴마크, 프랑스에서는 각각 1예에서만 발견되었으며, 네덜란드에서는 아직 발견되지 않고 있다.⁶⁻⁹

우리나라를 포함한 동양권에서는 이러한 스웨덴형 돌연변이 *C. trachomatis*의 유병률을 조사한 보고가 없어, 저자는 *C. trachomatis*에 의한 요도염 환자를 대상으로 상기 돌연변이형을 조사하였고 이를 보고하고자 한다.

Table 1. Primer pairs used for polymerase chain reaction of *Chlamydia trachomatis*

Primer name	Sequences (5'→3')
Forward	GAGCTCCGATTTTGAATAGCT
Reverse 1	AATTACCTCTTCCCCAGAACA
Reverse 2	TTACCTCTTCCCCAGAACA
Reverse 3	AA(C)TTACCTCTTCCCCAGAACA
KL1	TCCGGAGCGAGTTACGAAGA
KL2	ACCAATCCCGGGCATTTGATT

대상 및 방법

1. 대상

2012년 4월부터 2013년 8월까지 비임균성요도염으로 단국대병원 비뇨기과에 내원한 환자 중 KL1, KL2 시동염기서열(primer)을 이용한 in house polymerase chain reaction (PCR) 법으로 *C. trachomatis*가 검출된 25명을 대상으로 하였다 (Table 1).

2. 검체에서 DNA 추출 및 중합효소반응(Polymerase Chain Reaction)

요도염 환자의 첫 소변을 15 ml Falcon tube에 옮겨 받아 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 3차 증류수로 부유한 후 1.5 ml tube에 옮겨 담고 13,200 rpm으로 2분간 원심분리한 후 침전물을 -70°C에 보관하였다.

PCR을 위한 시동염기서열은 primer3 프로그램(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)을 사용하여 설계하였으며, Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다 (Table 1). 모든 증폭 혼합물은 master 혼합물을 만들어 24 µl씩 분주하였으며 위에 추출한 주형 1 µl를 혼합하여 증폭하였다. Master 혼합물 24 µl 안에는 Taq polymerase 1 unit (Promega, Madison, WI, USA), 10배 Solution B (20 mM Tris-HCl 100 mM KCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol, 50% glycerol, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet-P40) 2.5 µl를 사용하였다. dNTP 혼합물 (Promega) 200 M, MgCl₂ (1.5 mM), 시동염기서열 앞, 뒤 방향으로 각각 25 pmole로 총 25 µl로 만들었다. 유전자증폭기는 GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 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. 증폭한 DNA 5 µl를 1.5% agarose gel (Promega)에 0.5배 희석 TBE buffer (1M Tris, 1M boric acid, 20 mM EDTA, pH 8.3)를 이용하여 100 V 전압으로 45분 동안 이동시켰다. Ethidium bromide로 1시간 염색한 후 30분간 증류수로 수세를 시키고 사진을 얻었다. 양성표준주형은 클라미디아 serovar G형으로 국립보건원(Osong, Korea)에서 받았다.

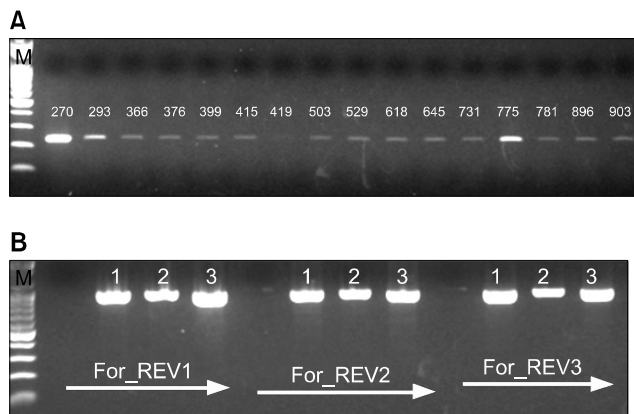


Fig. 2. (A) Polymerase chain reaction (PCR) results of testing for the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* by using a primer set KL1 and KL2. (B) PCR results of testing for the Swedish mutant cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* by various primer sets. M: 100 bp DNA ladder marker.

결 과

모든 25예 *C. trachomatis* 양성검체(Fig. 2A)에서 스웨덴 돌연변이형은 검출되지 않았다(Fig. 2B).

고 찰

*C. trachomatis*에 의한 감염은 미국의 경우 매년 약 300만 명의 환자에서 발견되고 있다.¹ 또한 *C. trachomatis*에 관련된 치료비로 일년에 24억불 정도가 지출되며 이 비용의 대부분을 *C. trachomatis*의 합병증, 즉 골반염이나, 이차적인 불임 등의 치료에 쓰고 있어서, 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 자극 증상이나 분비물 등의 증상이 없어, 많은 환자들이 치료를 받지 않거나 받을 필요성을 느끼지 못하고 성 상대자와 지속적인 성관계를 가짐으로써 성매개감염의 전파에 중요한 역할을 한다.¹⁰ 이와 같이 *C. trachomatis* 감염 후 모호한 증상으로 특이도와 민감도가 높고 경제적인 검사방법이 요구되고 있어 최근 NAAT 등이 광범위하게 사용되고 있다.² 핵산 증폭법은 알려진 *C. trachomatis* 고유 염기서열을 primer를 이용하여 증폭하는 것으로 그 특이도와 민감도가 매우 높아 현재 세계보건기구 및 많은 나라에서 *C. trachomatis* 표준 진단법으로 적극 권장하고 있다.^{11,12}

유전자증폭법의 기본 개념은 목표 DNA의 일부 염기서열을 증폭하는 것으로 그 결과물을 어떻게 표현하는가에 따라 in house PCR, real time PCR 등의 방법으로 구분한다. *C. trachomatis*의 경우 ompA 유전자나, 16S ribonucleic acid

(RNA), cryptic plasmid의 *C. trachomatis* 유전자를 목표로 하고 있다. 이들 중 ompA 유전자나 16S RNA 유전자는 *C. trachomatis* 한 객체당 1개의 유전자만이 존재하지만, cryptic plasmid의 경우 *C. trachomatis*의 분화의 정도에 따라 한 객체당 4-10개가 존재하여, 적은 수의 *C. trachomatis*균이 존재하여도 쉽게 감염을 증명할 수 있는 장점이 있어 많은 진단기계들은 상기 cryptic plasmid를 증폭하여 *C. trachomatis*균을 진단하고 있다.^{13,14}

상업적으로 Roche사(Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland)의 Amplicor kit와, ligase chain reaction을 이용한 Abbott사(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) kit 등이 잠복 플라스미드를 증폭하여 *C. trachomatis*를 진단하고 그 민감도를 99%까지 보고하고 있다. 그러나, NAAT법은 그 민감도와 특이도는 매우 높게 관찰되지만 스웨덴 돌연변이형과 같이 일부 유전자염기서열 소실이 나타나면 균이 있어도 NAAT법으로 진단할 수 없다는 문제가 있다.

일부 유전자염기서열이 소실된 스웨덴 돌연변이형 *C. trachomatis*의 출현은 아래와 같은 중요한 임상적 의미를 가진다.

첫째, *C. trachomatis*균은 왜 갑자기 자신이 오랫동안 가지고 있었던 염기서열의 일부를 버렸는가? 또한 그 결론으로 *C. trachomatis*에 감염된 환자에게 어떠한 영향을 미치는가 하는 점이다. *C. trachomatis*에서 관찰된 유전자 소실의 중요성은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 드물게 cryptic plasmid가 없는 *C. trachomatis*가 발견되기도 하여 이러한 결론은 *C. trachomatis* 생존에 중요한 영향을 주지 않는다는 주장도 있다. 하지만 바이러스나 세균은 종종 자신의 효율적인 증식(cloning)을 위해 잘 쓰이지 않거나 혹은 별로 중요하지 않은 유전자의 일부를 버리는 경향이 있다는 점을 고려한다면 *C. trachomatis*에 어떠한 변화의 가능성을 생각할 수가 있다. 이런 현상은 다른 균의 *C. trachomatis*보다 탁월한 생존 능력을 가진 serotype E군에서만 관찰되는 현상이다. 최근 Magbanua 등¹⁵의 연구에 따르면, 상기 유전자의 결손을 가진 *C. trachomatis*에 감염된 환자의 경우 기존에 *C. trachomatis* 감염에 1차 약제로 권장되는 azithromycin에는 효과가 없고 doxycycline으로만 치료가 된다고 하므로 그 임상적인 의미가 크다고 하겠다.¹³

둘째, 상기 현상이 전세계적인 보편적인 현상인가 아니면 스웨덴에 국한된 현상인가 하는 의문이 있을 수 있다. 현재까지의 보고에 따르면 이러한 현상은 스웨덴에 국한된 현상이고 그 주변 국가 즉 다른 유럽공동체에서는 매우 드문 현상으로 알려지고 있다. 특히 다른 나라에서 스웨덴 돌연변이형 *C. trachomatis*로 진단된 환자도 스웨덴 여행 기왕력이 있는 환자임을 고려한다면 이는 지역적인 문제로 생각될 수가 있다. 하지만 현대 사회의 빈번한 여행과 우리나라를 포함하여 많은

나라에서 아직 체계적인 연구가 없다는 점을 고려한다면 앞으로 사회적으로 큰 문제가 될 수도 있다고 하겠다.

셋째, 돌연변이형은 일부 상업적인 *C. trachomatis* 유전자 증폭법에는 진단이 되지 않는다는 점이다.

본 연구는 비록 적은 환자에서 시행한 검사결과이지만 우리나라뿐만 아니라 동양권에서는 아직 스웨덴 돌연변이형의 유병률 연구가 없음을 고려할 때 본 연구의 결과는 그 의미가 있을 것으로 생각된다. 향후 대규모 환자를 대상으로 연구할 필요가 있다.

결 론

아직까지 우리나라에서는 스웨덴 돌연변이형 *C. trachomatis*의 빈도는 높지 않을 것으로 추정한다. 앞으로 국민 보건 향상과 여성 환자의 자궁외 임신, 골반염 등의 합병증 방지를 위해 더 많은 환자를 대상으로 주기적으로 이러한 돌연변이형 *C. trachomatis* 발생을 감시할 필요가 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 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.
- Stamm WE. Chlamydia trachomatis infections of the adult. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh P, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, eds. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1999:407-22.
- Lee G, Sohng I. Cryptic plasmid amplification of Chlamydia trachomatis at a Korean Health Center for Female Commercial Sex Workers. *Korean J Urol* 2006;47:37-41.
- Unemo M, Olcén P, Agné-Stadling I, Feldt A, Jurstrand M, Herrmann B, et al. Experiences with the new genetic variant of Chlamydia trachomatis in Orebro county, Sweden - proportion, characteristics and effective diagnostic solution in an emergent situation. *Euro Surveill* 2007;12:E5-6.
- Jurstrand M, Christerson L, Klint M, Fredlund H, Unemo M, Herrmann B. Characterisation of Chlamydia trachomatis by ompA sequencing and multilocus sequence typing in a Swedish county before and after identification of the new variant. *Sex Transm Infect* 2010;86:56-60.
- Reinton N, Moi H, Bjerner J, Moghaddam A. The Swedish Chlamydia mutant nvC trachomatis in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2010;130:380-1.
- Hoffmann S, Jensen JS. Mutant Chlamydia trachomatis in Denmark. *Euro Surveill* 2007;12:E7-8.
- de Barbeyrac B, Raherison S, Cado S, Normandin F, Clerc M, Claret V, et al. French situation concerning the Swedish Chlamydia trachomatis variant. *Euro Surveill* 2007;12:E11-2.
- Morré SA, Catsburg A, de Boer M, Spaargaren J, de Vries HJ, Schirm J, et al. Monitoring the potential introduction of the Swedish Chlamydia trachomatis variant (swCT) in the Netherlands. *Euro Surveill* 2007;12:E9-10.
- National guideline for the management of Chlamydia trachomatis genital tract infection. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases). *Sex Transm Infect* 1999;75(Suppl 1):S4-8.
- Pasternack R, Vuorinen P, Pitkärä 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.
- 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.
- Lee G, Park J, Kim B, Kim SA, Yoo CK, Seong WK. OmpA genotyping of Chlamydia trachomatis from Korean female sex workers. *J Infect* 2006;52:451-4.
- Byun Y, Park HY, Kim H, Lee G. Differences in Chlamydia trachomatis cryptic plasmid loads in two types of female commercial sex workers in Korea. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:146-7.
- Magbanua JP, Goh BT, Michel CE, Aguirre-Andreasen A, Alexander S, Ushiro-Lumb I, et al. Chlamydia trachomatis variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterisation and failure of single dose azithromycin. *Sex Transm Infect* 2007;83:339-43.