

Identification of *Leptospira* species of Korean Isolates using Phylogenetic Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified 16S rDNA and LipL32 Genes

Kyung-Hee Park¹, Yeon-Joo Choi^{1,2}, Sun-Hye Shin¹, Min-Kyung Choi¹,
Yoon-Won Kim³ and Won-Jong Jang^{1,2*}

¹Department of Microbiology and ²Institute of Glocal Disease Control, College of Medicine, Konkuk University, Seoul;

³Department of Microbiology, College of Medicine, Hallym University, Chunchon, Kangwon-do, Korea

In this study, we selected only serologically identified 15 *Leptospira interrogans* isolates in the past and analyzed and identified them by using molecular method. The partial 16S rDNA and LipL32 genes were amplified from the bacteria by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. Sizes of the PCR products were 529 bp and 819 bp respectively and analysis of the nucleotide sequence of 16S rDNA and LipL32 genes showed that 14 out of the 15 *Leptospira* showed 99.4~100% and 99.2~99.9% similarity respectively to those of *L. interrogans* lai and one isolate named HS-7 showed 100% and 100% similarity to *L. interrogans* canicola. The phylogenetic tree based on the 16S rDNA and LipL32 genes obtained in this study revealed that 14 of the *Leptospira* composed a cluster distinct to that of *L. interrogans* lai and HS-7 composed to *L. interrogans* canicola.

Key Words: *Leptospira interrogans*, Serovar, Genospecies

INTRODUCTION

렙토스피라증(Leptospirosis)은 전세계적으로 발생하는 인수공통질환으로 렙토스피라(genus *Leptospira*)에 속하는 병원성 균에 의해 일어난다 (1). 1989년 이전, 렙토스피라는 혈청학적 분류에 따라 모든 병원성균을 포함하는 *Leptospira interrogans* sensu lato와 비병원성균을 포함하는 *L. biflexa* sensu lato 두 그룹으로 나뉘었다 (2). *L. interrogans*는 혈청학적인 방법으로 23 혈청군(serogroup)과 223여 개의 혈청형(serovar)으로 구분되고, 유전학적 분류방법에 따라서는 13종의 병원성 균과 6종의 비병원성 균을 포함하여 최소 약 19종으로 나뉘진다고 보고되

었다 (2~5). 1984년에 국내에서도 렙토스피라증이 발생되고 있음이 증명되었고, *L. interrogans* Icterohemorrhagiae 혈청군(serogroup)에 속하는 균이 원인균으로 분리동정되었다 (6). 국내에서 분리되는 렙토스피라 균주는 주로 Icterohemorrhagiae 혈청군에 속하는 lai 혈청형이고, 새로운 hongchon과 yeonchon 혈청형이 결정된 바 있으며, Canicola 혈청군에 속하는 canicola 혈청형도 환자로부터 분리되었다 (3, 7). 렙토스피라균을 동정하는 방법은 응집(agglutination)에 의한 혈청학적 분류방법이 기본적인 방법이다. 혈청학적인 동정방법으로는 전통적인 방법인 교차응집소 흡수시험법(cross-absorption agglutination test)과 비교적 빠른 동정방법인 현미경응집검사(microscopic agglutination test)가 있다 (7). 혈청군은 현미경응집검사로

Received: December 28, 2013/ Revised: February 10, 2014/ Accepted: February 28, 2014

*Corresponding author: Won-Jong Jang, Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea.

Phone: +82-2-2030-7816, Fax: +82-2-2030-7845, e-mail: wjang@kku.ac.kr

**This work was supported by the Konkuk University.

© 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/>).

결정할 수 있고, 혈청형은 교차응집소 흡수시험법에 의해 결정된다 (8). 그러나 이들 방법은 수적인 제약과 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 이 후 단세포균형체를 이용한 혈청학적인 동정방법이 시도되었고 (9), 최근 분리 균주의 동정방법의 대안으로 DNA를 기초로 한 분자생물학적 분류기법이 개발되어 왔다. 분자생물학적 분류방법에는 DNA-DNA hybridization을 비롯하여 pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), rrs sequencing, 그리고 특정 유전자에 대한 sequencing 등의 다양한 기법들이 있고, 이들 DNA를 바탕으로 하는 렙토스피라의 재분류는 분류학적으로 비교적 정확하여 분류에 강한 기반을 제공한다 (6, 10~13). Polymerase chain reaction (PCR)은 임상증세를 보인 환자의 검체로부터 렙토스피라를 빠르고 민감하게 검출하는 데 유용한 분자생물학적인 방법 중 하나이다 (14). 또 한 이를 통해 렙토스피라의 병원성과 비병원성을 구분할 수 있다 (15). PCR을 이용한 렙토스피라 검출 및 종 동정에 사용하는 유전자들은 일반적으로 렙토스피라 뿐만 아니라 리케차를 포함하여 여러 세균의 동정에 사용되는 16S rDNA 유전자와 병원성 렙토스피라의 면역반응에서 주요한 항원으로 알려진 OmpL1, LipL32, LipL36, LipL41 그리고 LipL48 등의 외막단백(outer membrane protein) 유전자가 있다 (11, 15~18). 균주의 동정을 정확하게 하는 것은 렙토스피라중의 역학조사와 병인연구에 중요할 뿐만 아니라 진단법 및 백신개발을 위한 기초자료를 제공할 수 있으므로 질병예방에 큰 도움이 된다. 국내 분리균주들은 앞서 기술한 바와 같이 주로 혈청학적인 방법으로 분류가 되었으며, 일부 DNA 분석을 통한 분류가 시도된 바 있다 (7). 따라서 본 연구에서는 기준의 방법으로 분류되었던 국내 분리 균주들의 특성 분석에 보다 많은 정보를 추가하기 위하여 16S rDNA와 LipL32 유전자 일부분의 염기서열 분석을 실시하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

사용 균주

본 실험에서 사용한 균주는 Table 1과 같다. 렙토스피라 균주 중 일부는 서울대학교 의과대학 미생물학교실과 한림대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양받았으며, 일부는 건국대학교에서 환자 및 야생 설치류에서 분리한 균주를 사용하였다. 이 중 1984년부터 1990년 사이에 국

Table 1. Local *Leptospira* strains isolated in Korea for molecular typing using nucleotide sequences of 16S rDNA and LipL32 genes

Strain	Source	Area of isolation	Year
WH-20	Human	Wonju	1984
18R	Wild rodent	Hongchon	1985
30R	Wild rodent	Hongchon	1985
HS-7	Human	Kongju	1985
HM3	Human	Yeonchun	1985
AP33	Rat	Yeoju	1987
CH88-12	Human	Choonsung	1988
CH88-19	Human	Whachun	1988
KH-1	Human	Choongju	1989
KH-2	Human	Choongju	1989
HK-12	Human	Kosung	1990
A-15	<i>Apodemus agrarius</i>	Choongju	1993
A-19	<i>Apodemus agrarius</i>	Choongju	1993
M06	<i>Apodemus agrarius</i>	Choongju	2001
M07	<i>Apodemus agrarius</i>	Choongju	2001

내에서 발생한 환자 및 포획 야생쥐로부터 분리한 균주 중 동정이 어려웠던 7주의 렙토스피라 균주가 포함되었다.

렙토스피라 분리균의 배양

렙토스피라균의 배양에는 Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) 배지를 사용하였다. 일반적인 배양은 액체 EMJH 배지로 32°C에서 7~10일 간격으로 배양하고, 균주를 보관하기 위해서는 반고체 EMJH 배지 (0.2% agar 포함)에 배양하였다.

렙토스피라균주 DNA 추출 및 증폭

렙토스피라로부터 핵산을 추출하기 위하여 QIAamp DNA mini kits (QIAamp DNA mini kit; Qiagen Valencia, CA, USA)를 사용하였으며, 제조사에 방법에 따라 핵산을 추출하였다. 추출한 렙토스피라 핵산으로부터 특정 유전자를 증폭하기 위해 16S rDNA와 LipL32 유전자를 타겟으로 하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다 (Table 2) (12, 19~21). PCR 반응 혼합물은 Template DNA 2 μl에

2.5 mM dNTP 4 µl (Bioline, UK), 10 x PCR buffer 5 µl (Bioline, UK)와 0.25 U *Taq* polymerase (Bioline, UK)를 넣고 각각 20 pmol/µl 프라이머 1 µl씩을 넣은 후, 멸균증류수를 넣어 총 50 µl로 최종부피를 맞췄다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster

City, Calif, USA)로 실행하였으며, PCR 조건에서 16S rDNA는 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension순으로 35회 증폭시켰으며, 최후 반응 72°C에서 3분간 반응시켜 PCR 산물의 연장을 유도하였

Table 2. Nucleotide sequences of primers and conditions for PCR used in this study

Target genes	Primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	Products size (bp)
<i>16S rDNA</i>	27F ^a	AGAGTTGATCMTGGCTCAG	529
	518R ^{a,b}	GTATTACCGCGGCTGCTGG	
<i>lipL32</i>	LipL32F ^a	ATGAAAAAACTTCGATTTG	819
	LipL32R ^{a,b}	TTACTTAGTCGCGTCAGAAC	

^a Primers used for amplification and sequencing, ^b reverse primers

Table 3. The similarity between partial *16S rDNA* sequences of various reference *Leptospira* strains and isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	***	100	100	100	100	100	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
2		***	100	100	100	100	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
3			***	100	100	100	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
4				***	100	100	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
5					***	100	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
6						***	99.7	97.8	97.8	99.7	98.5	97.2	97.8	97.8	99.4	99.7	99.7	100	99.7
7							***	97.5	97.5	99.4	98.1	96.9	97.5	97.5	99.1	99.4	99.4	99.7	100
8								***	96.9	98.1	97.5	97.2	98.8	99.1	97.2	97.5	97.5	97.8	97.5
9									***	98.1	98.8	96.9	96.9	97.5	97.2	97.5	97.5	97.8	97.5
10										***	98.8	97.5	98.1	98.1	99.1	99.4	99.4	99.7	99.4
11											***	97.8	97.5	98.1	97.8	98.1	98.1	98.5	98.1
12												***	96.6	97.5	96.6	96.9	96.9	97.2	96.9
13													***	99.1	97.2	97.5	97.5	97.8	97.5
14														***	97.2	97.5	97.5	97.8	97.5
15															***	99.1	99.1	99.4	99.1
16																***	99.4	99.7	99.4
17																	***	99.7	99.4
18																		***	99.7
19																			***

1, partial *16S rDNA* of *L. interrogans* Lai 56601 (NR074481); 2, *L. interrogans* Copenhageni (JQ988857); 3, *L. interrogans* Autumnalis Akiyami A (FJ154557); 4, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA (FJ154549); 5, *L. interrogans* Kremastos (FJ154564); 6, *L. interrogans* Medanensis (DQ991471); 7, *L. interrogans* Canicola DB34 (JQ988855); 8, *L. alexanderi* Manhao (AY631880); 9, *L. meyeri* (LM16sRDNX); 10, *L. kirschneri* Grippotyphosa (JQ988856); 11, *L. noguchii* Panama CZ214K (AY631886); 12, *L. santarosai* Georgia LT117 (AY996805); 13, *L. weili* Celledoni (AY631877); 14, *L. borgpetersenii* Hardjobovis (AM050569); 15, 30R; 16, AP33; 17, A-15; 18, M06; 19, HS-7.

고, *lipL32*는 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 48°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 순으로 35회 증폭시켰으며, 최후 반응 72°C에서 3분간 반응시켜 PCR 산물의 연장을 유도하였다. 각 반응마다 음성 대조군으로 template DNA 대신 증류수를 사용하였으며 교차오염을 예방하기 위하여 aerosol resistant tip을 사용하였다. 증폭산물은 Accuprep PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제 한 후 염기서열을 분석하였다.

렙토스피라 유전자 염기서열의 결정과 분석

염기서열 분석은 (주) 제노텍(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 위해 27F와 518R 프라이머를 사용하였고, *LipL32* 유전자 염기서열 분석을 위해서 *LipL32F*와 *LipL32R* 프라이머를 사용하였다. 얻어진 염기서열은 MegAlign software package (DNASTAR, Lasergene 7.1, WI, USA)의 Clustal W를 이용

하여 GenBank database에서 얻은 참조 균주의 염기서열과 비교 분석하였고, phylogenetic tree를 제작하였다. Tree의 안정성을 조사하기 위해 bootstrap analysis (1,000회)를 수행하였다. 유사성에 대한 백분율은 MegAlign software를 이용하여 결정하였다.

염기서열의 accession number

염기서열을 비교를 위해 사용된 염기서열들은 GenBank database (National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 얻었으며 참조로 사용한 렙토스피라 16S rDNA와 *LipL 32* 유전자 염기서열의 accession number는 Fig. 1, 2와 Table 3, 4에 표시하였다.

RESULTS

렙토스피라의 16S rDNA와 *LipL32* 유전자를 타겟으로 하는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 15개 모

Table 4. The similarity between partial *lipL32* sequences of various reference *Leptospira* strains and isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	***	100	99.9	99.9	100	100	99.7	99.7	99.4	98.3	95.2	96.1	95.9	99.9	99.2	99.7
2		***	99.9	99.9	100	100	99.7	99.7	99.4	98.3	95.2	96.1	95.9	99.9	99.2	99.7
3			***	100	99.9	99.9	99.6	99.6	99.3	98.5	95	96	95.7	100	99.3	99.6
4				***	99.9	99.9	99.6	99.6	99.3	98.5	95	96	95.7	100	99.3	99.6
5					***	100	99.7	99.7	99.4	98.3	95.2	96.1	95.9	99.9	99.2	99.7
6						***	99.7	99.7	99.4	98.3	95.2	96.1	95.9	99.9	99.2	99.7
7							***	99.7	99.4	98.3	95.2	96.1	95.9	99.6	98.9	99.7
8								***	99.4	98.3	95.2	96.4	96.1	99.6	98.9	100
9									***	98.6	95.2	96.4	96.1	99.3	98.6	99.4
10										***	94.5	95.6	95.5	98.5	97.8	98.3
11											***	96.3	96	95	94.4	95.2
12												***	99.7	96	95.3	96.4
13													***	95.7	95	96.1
14														***	99.3	99.6
15															***	98.9
16																***

1, partial *lipL32* of *L. interrogans* Lai (AY568679); 2, *L. interrogans* Autumnalis (JN210551); 3, *L. interrogans* 56601 (AY461908); 4, *L. interrogans* Hardjoprajitno (AY461905); 5, *L. interrogans* Akiyami (AY461902); 6, *L. interrogans* RGA (AY461909); 7, *L. interrogans* Pomona RZ11 (AY461910); 8, *L. interrogans* Canicola RTCC 2824 (KC800990); 9, *L. kirschneri* 5621 (AY461917); 10, *L. noguchi* 1011 (AY461918); 11, *L. santarosai* HS-616 (AY461926); 12, *L. weili* LT89-68 (AY461930); 13, *L. borgpetersenii* 1409 (AY461893); 14, 30R; 15, KH-1; 16, HS-7.

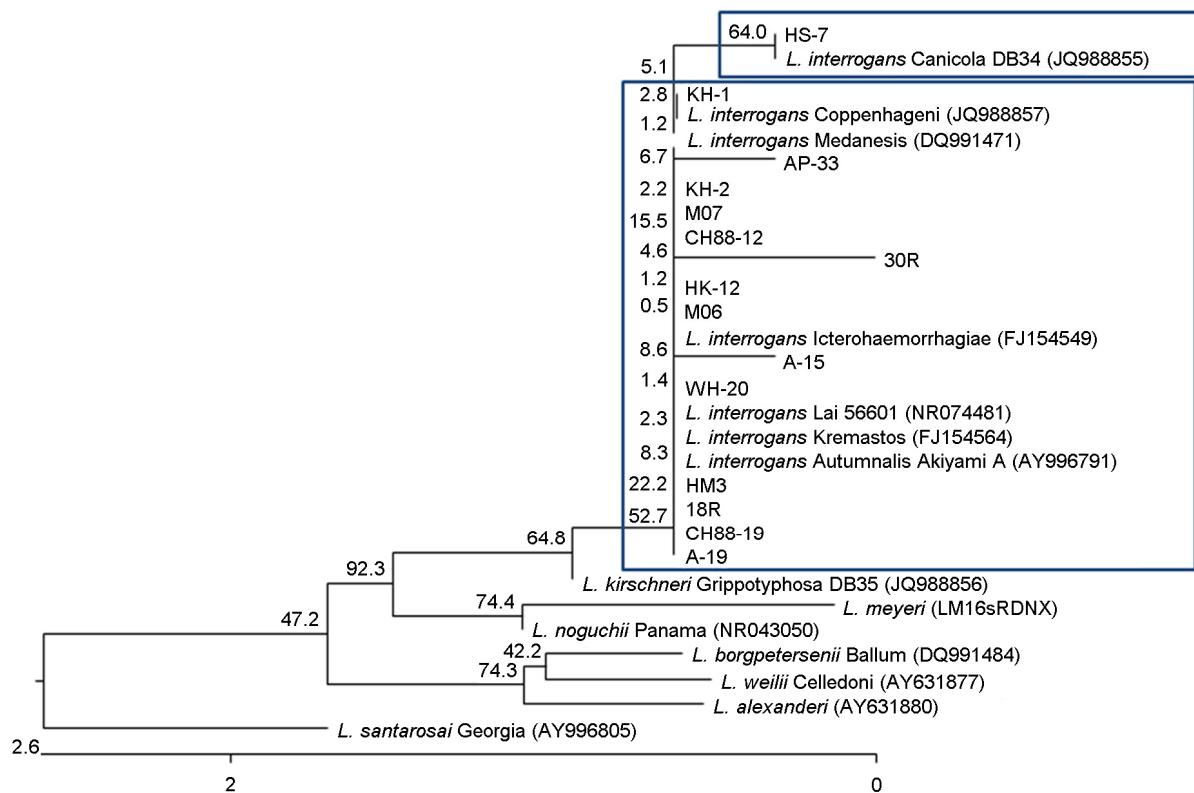


Figure 1. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial 16S rDNA sequences (the size of about 323 bp) of reference *Leptospira* strains and 16S rDNA PCR products of isolates. The phylogram was generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

든 시료에서 각각 해당 유전자의 증폭을 확인하였다. 16S rDNA 유전자를 타겟으로 PCR을 수행한 시료에서 529 bp 크기의 증폭산물을 확인하였고, LipL32 유전자를 타겟으로 한 시료에서는 819 bp 크기의 증폭산물을 확인하였다. 각 증폭산물을 정제하여 염기서열을 결정하였으며, 프라이머를 포함한 양쪽 말단의 염기서열을 제거한 후 분석하였다. 최종적으로 결정된 염기서열의 크기는 16S rDNA 유전자는 323 bp, LipL32 유전자는 727 bp였다. 이를 염기서열과 GenBank database에서 얻은 다양한 렙토스피라 염기서열과 비교하였다. 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, 국내 분리 균주 15개 중 11개 즉, WH-20, 18R, HM3, CH88-12, CH88-19, KH-1, KH-2, HK-12, A-19, M06, M07은 *L. interrogans* Iai에 100%의 유사도를 나타내었으며, 30R, A-15, AP33은 *L. interrogans* Iai에 99.4~99.7%의 유사도를 나타내었다. 그리고 HS-7은 *L. interrogans* canicola에 100%의 유사도를 나타내었다. Table 3에는 15개 균주 중 대표적인 5개 균주를 선별하여 참조 균주의

16S rDNA 유전자 염기서열과의 유사도를 나타내었다. Genotype의 위치를 확인하기 위하여 균주들의 16S rDNA 계통발생학적인 분석을 수행한 결과, HS-7는 *L. interrogans* canicola와 클러스터(Group 1)를 형성하였고, 나머지 균주들은 *L. interrogans* Iai와 클러스터(Group 2)를 형성하였다 (Fig. 1). LipL32 유전자 염기서열을 분석한 결과, 15개 균주 중 14개, 즉 WH-20, 18R, 30R, HM3, AP33, CH88-12, CH88-19, KH-1, KH-2, HK-12, A-15, A-19, M06, M07은 *L. interrogans* Iai에 99.2~99.9%의 유사도를 나타내었으며, 나머지 한 개는 *L. interrogans* canicola에 100%의 유사도를 나타내었다. Table 4에는 15개 균주 중 대표적인 3개 균주를 선별하여 참조 균주의 LipL32 유전자 염기서열과의 유사도를 나타내었다. Genotype의 위치를 확인하기 위하여 균주들의 LipL32 유전자의 계통발생학적인 분석을 수행한 결과, 14개 균주가 *L. interrogans* Iai와 클러스터(Group 1)를 형성하였고, HS-7은 *L. interrogans* canicola와 클러스터(Group 2)를 형성하였다 (Fig. 2).

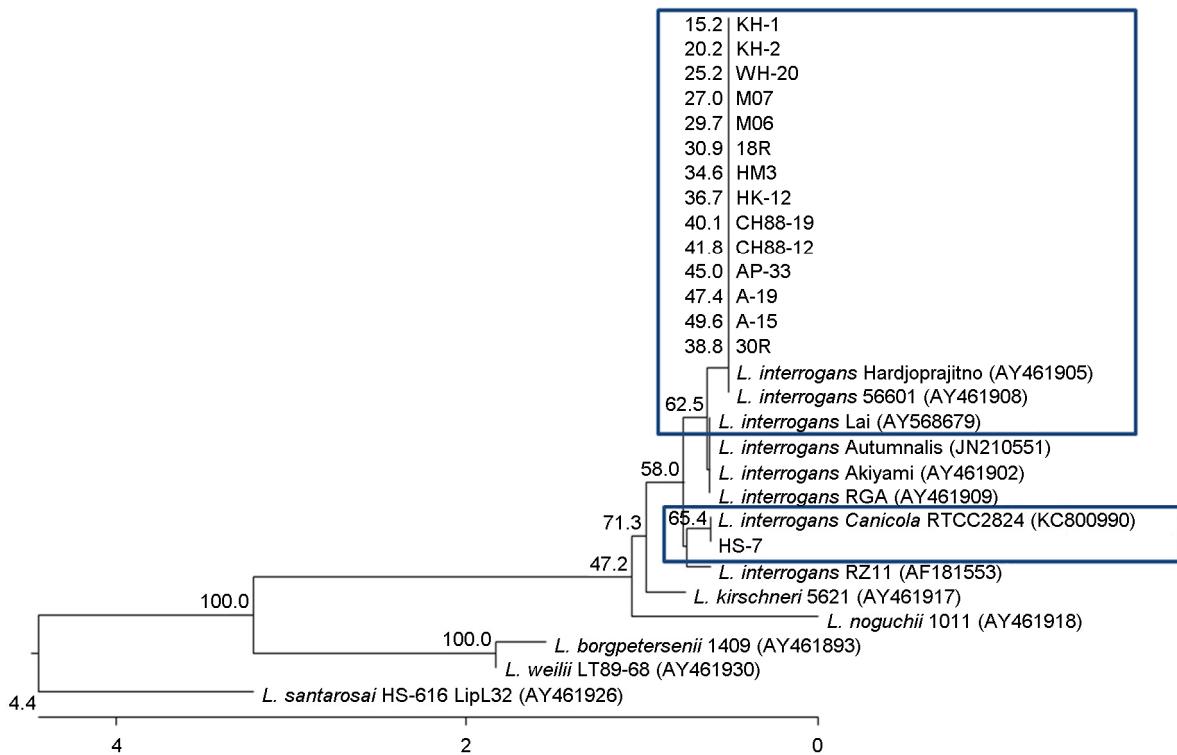


Figure 2. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *LipL* 32 sequences (the size of about 727 bp) of reference *Leptospira* strains and *LipL* 32 PCR products of isolates. The phylogram was generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

DISCUSSION

렙토스피라증은 *L. interrogans* sensu lato의 감염에 의해 발생되는 인수공통 감염병으로 발열, 두통, 근육통 등의 일반적인 증상을 보이고 심한 경우 내부장기출혈, 황달, 심부전 등의 증상을 나타낸다 (17). 우리나라에서 렙토스피라증은 가을철 추수기에 농촌에서 많이 발생되어 1987년 제2종법종전염병으로 지정되었으며, 렙토스피라의 주된 매개체는 *Apodemus agrarius* 등의 야생 설치류로 알려져 있다 (19). 렙토스피라를 감지하고 동정하기 위한 다양한 분자적인 방법이 개발되어 왔으며, PCR을 기반으로 한 전략은 여러 병원성균의 진단에 유용하게 이용될 뿐만 아니라 새로운 종의 렙토스피라를 분류하기 위해서도 사용되고 있다 (22). PCR을 이용한 렙토스피라 동정은 arbitrarily primed PCR (AP-PCR), low-stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR), PCR restriction endonuclease analysis (PCR-REA), specific probes 그리고 real-time quantitative PCR

방법 등으로 수행되었다 (19, 23). PCR 기법을 이용해서 렙토스피라증의 조기진단이 가능하고, 렙토스피라의 혈청형이나 종의 분류도 가능하다는 것이 알려졌다 (24). 다양한 임상시료로부터 렙토스피라의 종을 감지하기 위해서 이 기법이 사용되고 있고, 또한 렙토스피라의 종 분류는 이런 유전적인 방법을 통해 보다 확실해지고 있다 (10, 20, 25, 26). 본 연구에서 렙토스피라 동정을 위해 16S rDNA와 *lipL32* 유전자를 선택하였다. 16S rDNA 유전자의 염기서열 분석은 미지의 세균 확인 및 동정에 포괄적으로 이용되고, 세균의 분류목적으로 흔하게 이용된다 (12, 15). 또한 렙토스피라의 16S rDNA 부분 염기서열은 많이 알려져 있어 종의 동정에 유용한 유전자로 사용할 수 있다 (12). *LipL32* 단백은 바깥 쪽 막 표면에 노출된 단백으로서 세포에서 가장 풍부한 단백질이며 배양 중이나 감염 중 생체 내에서 발현되고, 많은 렙토스피라 군주들의 *LipL32* 유전자서열이 결정되어 있어 이 유전자를 이용한 렙토스피라의 분류 및 동정이 많이 시도되고 있다 (14, 16, 22).

본 연구에서는 PCR 기법과 염기서열 분석을 이용하여 15개의 국내 분리주를 동정하고자 하였다. 이 균주들은 과거 혈청학적인 방법으로 분류된 균주들로서 WH-20, KH-1, KH-2, A-15, A-19, M06, M07은 *L. interrogans* 혈청형 lai로 동정되었고, HS-7 균주는 *L. interrogans* 혈청형 canicola로 동정되었었다. 다른 7개 균주, 즉 18R과 30R, AP33, HM3, CH88-12, CH88-19, HK12 렙토스피라 분리주들은 혈청학적으로 분류가 어려워서 연구자들간의 많은 논란이 있었는데, 이 중 18R과 HM3는 기존의 혈청형과 구별되어 혈청형 hongchon과 yeonchon으로 명명된 바 있다. 또한, AP-33은 국내 분리주 WH-20와 같은 혈청형 lai로 동정되었고, 이외의 균주들은 새로운 혈청형임을 시사하는 보고가 있었다 (8, 10, 18, 27).

본 연구를 통해 국내 분리주 15개를 분자생물학적으로 재분류하였으며, 이 중 HS-7은 분자생물학적 *L. interrogans* canicola로 분류되었고, 다른 14개 균주들은 모두 *L. interrogans* lai로 분류되었다. Genospecies *L. interrogans*에는 다양한 혈청형, 즉 icterohaemorrhagiae, lai, copenhageni, canicola, pomona, saxkoebing, wolffi, pyrogenes, autumnalis, bataviae 등의 혈청형이 포함된다 (10). 따라서 국내에서 분리된 균주들은 과거 혈청학적으로 lai, hongchon, yeonchon, canicola 등으로 분류되었었지만, 분자생물학적으로는 모두 *L. interrogans*에 속하는 것으로 나타났다.

다른 genospecies인 *L. kirschneri*에도 다양한 혈청형 (bogvere, bulgarica, butembo, cynopteri, dakota, dania, grippotyphosa, kabura, kambale, mwogolo, ndambari, ndahambukuje, ramisi, sokoine 그리고 tsaratsovo)이 포함된다 (10, 25). 위의 15개 균주 외에 렙토스피라 분리균 AP31의 유전자를 추가로 분석하였다. AP31 균주는 서로 다른 실험실에서 각각 유지 보관되었던 같은 이름의 두 균주를 사용하였다. 한 균주의 16S rDNA와 LipL32 유전자는 *L. kirschneri*와 100% 유사도를 나타낸 반면, 다른 한 균주의 16S rDNA와 LipL32 유전자는 *L. interrogans* lai와 99.9% 유사도를 나타낸 것을 확인하였다 (data not shown). 렙토스피라는 균주의 특성상 냉동 혹은 동결보존이 어렵고 지속적으로 계대배양을 해야 하기 때문에 계속 계대배양되고 있는 2개 이상의 균종의 우연한 혼합배양의 결과 또는 labeling 잘 못 등의 결과로 균종이 바뀔 가능성이 있다 (28). 이와 같은 원인으로 인해 서로 다른 실험실에서 오랜 기간 유지되어 온 동일한 분리 균주가 각각 다른 특성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 우

리나라에 genospecies *L. interrogans* 외에도 *L. kirschneri*에 속한 균주가 존재함을 배제할 수 없다.

본 연구에서는 최초로 국내 렙토스피라 분리 균주 중 일부를 분자생물학적으로 분류해 보았다. 렙토스피라는 진단 및 백신제조 등을 위해서 균의 동정이 필수적이라 할 수 있다. 과거에는 혈청학적인 진단법과 동정법이 주로 사용되었지만, 분자생물학적인 진단법의 적용 및 관련 역학조사를 위해서 국내에서 분리된 다양한 균주들을 대상으로 한 분자생물학적 접근의 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Yim EK, Kim YW, Lee JS, Chang IA, Baek LJ, Song JW, et al. Detection of leptospiral DNA from field rodents by PCR. *J Bacteriol Virol* 2003;33:177-81.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3:757-71.
- Kim MJ. Leptospirosis in the Republic of Korea: Historical Perspectives, Current Status and Future Challenges. *Infect Chemother* 2013;45:137-44.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;27:287-96.
- Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 2010;5:1413-25.
- Chang WH, Kim YW, Oh HB, Cho MK, Kee SH, Kim HJ. Serovar identification and genetic characterization of *Leptospira* isolates by arbitrarily primed PCR and ribotyping. *J Korean Soc Microbiol* 1999;34:409-21.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 2009;9:760-8.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
- Oh HB, Chang WH, Cho MK, Seong WK, Park KS. Identification of new serovar yeonchon and hongchon belonging to *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae serogroup. *J Kor Soc Microbiol* 1991;26:253-62.
- Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:215-9.
- Turk N, Milas Z, Mojsec V, Ruzic-Sablje E, Staresina V,

- Stritof Z, *et al.* Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett 2009;300:174-9.
- 12) Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 2006;44:3510-6.
- 13) La Scola B, Bui LT, Baranton G, Khamis A, Raoult D. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. FEMS Microbiol Lett 2006;263:142-7.
- 14) Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonlup S, *et al.* Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PLoS One 2011;6:e16236.
- 15) Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004;17:840-62.
- 16) Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattacharjee P, Chirathaworn C. LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. Asian Pac J Allergy Immunol 2005;23:133-41.
- 17) Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO. 1982.
- 18) Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S rRNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82:6955-9.
- 19) Cho MK, Kee SH, Song HJ, Kim KH, Song KJ, Baek LJ, *et al.* Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. Epidemiol Infect 1998;3:685-90.
- 20) Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmann T, De Wachter R. The European database on small subunit rRNA. Nucleic Acids Res 2002;30:183-5.
- 21) Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. J Bacteriol 2004;186:2818-28.
- 22) Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, *et al.* The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun 2000;68:2276-85.
- 23) Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect Immun 1996;64:2322-30.
- 24) Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol 2010;10:325.
- 25) Mgode GF, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Hartskeerl RA. New *Leptospira* serovar sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56:593-7.
- 26) Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Evol Microbiol 1987;37:407-15.
- 27) Chang WH, Kee SH, Park KH, Kim SY, Kim IS, Choi MS. Antigenic analysis of *Leptospira interrogans* isolated in Korea using monoclonal antibodies and cross-agglutinin absorption test. J Kor Soc Microbiol 1989;24:165-73.
- 28) Park KH, Chang WH. Serovar identification of leptospiral strain HS-7 isolated in Korea by monoclonal antibodies. J Kor Soc Microbiol 1988;23:293-305.