

국내의 개에서 *Brachyspira pilosicoli*의 분리 및 동정

김태중 · 이재일*

전남대학교 수의과대학
(게재승인: 2004년 7월 30일)

Isolation and characterization of *Brachyspira pilosicoli* in Korean dogs

Tae-Jung Kim and Jae-II Lee*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Accepted: July 30, 2004)

Abstract : This study was performed to report the outbreaks of canine intestinal spirochetosis and to characterize the canine isolates. Three canine isolates were weakly beta-hemolytic and had sharp end shape with 5 flagella. Isolates didn't produce indole but fermented fructose. In API-ZYM[®] study, isolates were alpha-glucosidase negative and alpha-galactosidase positive, which is the typical characteristics of *B. pilosicoli*. In multilocus enzyme electrophoresis(MEE) study, isolates were divided into 2 electrophoretic types. Isolates showed different properties with *B. hyodysenteriae* but closely related with pathogenic canine intestinal spirochete(*B. pilosicoli*). This is the first report of the isolation and characterization of canine intestinal spirochete in Korean dogs.

Key words : *Brachyspira pilosicoli*, multilocus enzyme electrophoresis(MEE), Korean dog

서 론

Canine intestinal spirochetes는 개의 spirochetal diarrhea의 원인균으로 돼지적리와 비슷한 증상의 개 설사변으로부터 분리되며 [7, 21] 특히 돼지적리의 원인균인 *B. hyodysenteriae*와 연관된 원인균에 의해 발병된다는 보고가 오래전부터 있었다 [7]. *B. pilosicoli*는 점액성 설사를 보이는 돼지에서도 분리되지만 개의 spirochetosis의 원인균이며 [5], 사람 [16], 닭 [18], 오리 [10], 기니픽 [8] 등 많은 동물에서 장내 감염증의 원인이 된다. *B. pilosicoli*는 *B. hyodysenteriae*와는 달리 더 작고 용혈능이 약하며 periplasmic flagella의 수가 *B. hyodysenteriae*는 7-13개이지만 이들은 4-6개로 더 작다 [14]. 개의 intestinal spirochetes는 de Wergifosse and Coene [3]에 의해 사람의 intestinal spirochetes와 유전학적으로 상당히 비슷함이 밝혀졌고, Koopman 등 [12]도 역시 사람을 포함한 여러 숙주별 intestinal spirochetes 사이에 상당한 유전적 동일성이 있음을 보고하였다. Lee 등 [14]은 수년 전부터 돼지와 사람의 intestinal spirochetes와 개의

intestinal spirochetes는 표현형적, 유전형적으로 연관이 있음을 보고하였다.

개에 있어 *B. pilosicoli*의 발병률은 6.9%에서 66%까지 다양하게 보고되고 있으며 돼지와 사람의 경우처럼 반드시 설사등의 증상을 보이는 개체에서만 분리되는 것은 아니다 [6]. 개와는 달리 사람에게 있어서는 복통, 직장출혈, 설사 등의 여러 증상이 장기간에 걸쳐, 지속적 혹은 재발하는 형태로 증상이 나타난다 [15]. *B. pilosicoli*에 의한 인체 감염 발병은 지역적으로는 주로 개발도상국 [1], 그리고 개체 특성상 동성애자, 후천성면역결핍증(AIDS) virus에 감염된 환자 [19] 등에서 발병률이 높다는 보고도 있다. 이처럼 외국의 경우 본 균에 대한 연구가 오랫동안 실시되어 왔으나 아직까지 국내에서는 균의 분리조차 시도되지 않았다. 특히 최근 몇 년간 가정에서 사람들과 함께 생활하는 애완견의 수가 급증함에 따라 사람에게 병원성이 있는 이 균에 대한 연구가 전무하다는 사실은 본 균에 대한 연구의 필요성이 더욱 강조되는 요인이라 할 수 있겠다. 이에 국내에서 발병하고 있는 개의 intestinal spirochetal diarrhea의 원인

*Corresponding author: Jae-II Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

균을 분류하고 그들의 특성 등을 파악하여 질병의 치료나 예방에 이용하기 위한 예비조사로 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

균분리

전남대 동물병원, 집단사육시설 등에서 사육하고 있는 개에서 신선한 분변 총 70개에서 균분리를 실시하였다. 분변은 정상변, 설사변 등의 성상에 상관없이 무작위로 수집되었고 이동 후 8시간 이내에 접종하였다. 단독 colony를 얻기 위해 최소한 2번 이상의 agar dilution passage를 실시하였으며 각각의 passage 때마다 균의 오염 및 활성 검사를 실시하였다. 고체배지는 Jenkinson and Wingar [11]의 방법에 준하여 혈액배지에 3가지 항생제 (colistin methanesulfonate 25 µg/ml, vancomycin hydrochloride 25 µg/ml, spectinomycin dihydrochloride 400 µg/ml)를 첨가하여 준비하였다. 여기에 분변을 접종 후 GasPak® jar(BBL, USA)에서 37°C를 유지하면서 5-15일간 배양하였다. 그 결과 약한 beta-hemolysis를 보이는 분리주 3개를 분리하였다. 분리주는 대량증식을 위하여 액체배지 [13]에서 배양한 후 *B. pilosicoli* 표준균주(P43/6/78)와 형태학적, 생화학적, 효소학적으로 비교, 분류하였다. *B. pilosicoli* 표준균주(P43/6/78)는 호주 Murdoch 대학교 수의·의생물학 대학 Dr. D.J. Hampson 교수로부터 분양받아 실험에 이용하였다.

균의 분류

균체 선단모양 및 periplasmic flagella의 수는 3% phosphotungstic acid로 negative stain 한 후 TEM을 이용하여 12,000배의 비율에서 관찰하였다. 생화학적 test는 Lee 등 [14]의 방법에 준하여 indole test와 fructose fermentation test를 실시하였다. Indole test를 위해 액체 배지에서 배양된 균주 배양액 1.5-2 ml를 주사기로 빼서 다른 멸균된 test tube에 분주하였다. 여기에 0.5 ml xylene을 첨가 후 2방울의 Kovak's reagent를 떨어뜨린 후 pink color ring 생성여부를 관찰하였다. Pink color의 ring이 형성되면 양성이고 색깔의 변화가 없으면 음성이다. Fructose fermentation test를 위해 3-4일간 GasPak® jar에서 배양 후 배지를 15 mm×15 mm의 크기로 잘라서 slide glass 위에 놓았다. Back ground를 흰 바탕으로 한 다음 100% ethyl alcohol에 녹인 0.2% bromothymol blue sol. 3-5방울을 떨어뜨렸다. 약 1분 후 색깔이 blue-green color로 변하면 음성이고 yellow-orange color로 그대로 있으면 양성이다. 같은 방법으로 Negative control 배지 역시 test를 하였다. 분리된 균주를 Hunter and Wood

[9]의 방법에 준하여 API-ZYM® system(bioMérieux, France)을 이용하여 19개 효소에 대한 실험을 실시하였다.

Multilocus enzyme electrophoresis(MEE)

MEE는 horizontal starch gel electrophoresis의 방법으로 실험에 사용된 buffer 및 gel 등의 제작방법, 전류의 세기 등 제반사항은 Lee 등 [14]의 방법에 준하여 실시하였다. 균 배양 후 원심 분리 후 pellet을 ultrasonication 방법으로 cell wall을 파괴 후 15,000 rpm/4°C에서 30분간 초고속 원심분리한 후 상층액을 200 µl 씩 1.5 ml tube에 분주하여 사용 전까지 -70°C에 보관하였다. Gel은 일반적으로 전기영동을 실시하기 약 4시간 전에 만들어 준비했다.

효소의 활성 정도를 알아보기 위해 Lee 등 [14]이 사용한 기질을 종합하여 agar overlay method와 soaking method를 이용하여 15개 효소에 대한 염색을 실시하였다. Agar overlay method는 ADH, AK, FDP, GDA, GDH, GPI, HK, MPI, NP, PEP, PGM, SOD 등 12개 enzyme에 이용하였고 soaking method는 ACP, ALP, EST 등 3개 enzyme에 이용하였다.

반응을 보인 효소들은 band의 형태와 이동상의 차이에 따라 양극 (+)쪽으로 이동성이 감소한 순서에 따라, 그리고 같은 band 형태 및 이동성이 같은 것은 같은 번호를 부여하였다. 모든 효소에 대하여 위와 같은 방법으로 allele를 지정하고 같은 염색상을 나타내는 재료들은 같은 집단으로 분류하여 하나의 electrophoretic type (ET), 즉 전기영동상에서의 동일한 표현형으로 같은 번호를 부여하였다. 4개의 균주들간의 유전적 거리(D)는 TAXAN 2 Package에 기초한 "Phentree"라는 program을 이용하여 다른 allele이 존재하는 loci의 비율로 산출되었다 [14]. Phenogram은 유전적 계수들의 한 행렬로부터 fusion strategy를 clustering하여 unweighted pair-group method of arithmetic mean(UPGMA)의 원리를 이용하여 작성되었다.

결 과

개의 분변에서 intestinal spirochetes의 분리실험 결과, 집단으로 사육되고 있는 개의 분변 70개 중에서 미약한 용혈성을 보이는 3개의 균주를 분리하였다. 분리주들의 특성과악 및 분류를 위한 형태학적, 생화학적 실험의 결과는 다음 Table 1과 같다. 균체의 선단은 모두 뾰족하였으며(sharp-end shape) flagella의 수는 5개로 동일하였다(Fig. 1). 그리고 각 분리주에 대한 API-ZYM® profiles을 아래 Table 2에 정리하였다. 위 결과, 국내에서 분리된 개의 intestinal spirochetes의 API-ZYM® digit code는

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of Korean isolates (CS-3, 4, 5)

Isolates	Hemolysis	End shape	No. of flagella	Indole production	Fructose fermentation	Alpha-galactosidase	Alpha-glucosidase
CS-3	Weak	Sharp	5	-	+	-	-
CS-4	Weak	Sharp	5	-	+	-	-
CS-5	Weak	Sharp	5	-	+	-	-

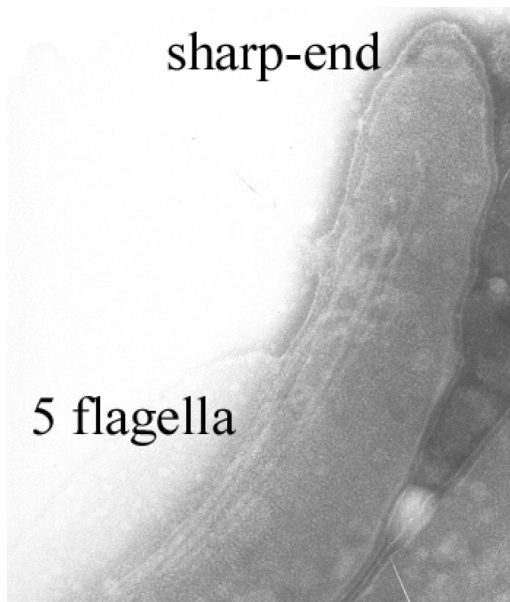


Fig. 1. Electron micrograph(TEM) of canine intestinal spirochete isolated from Korea showing sharp end shape with 5 periplasmic flagella.

모두 14-0-4-2-0로 나타났으며, 위의 형태학적, 생화학적 특성 및 효소학적 특성을 종합하면 분리주들 모두의 특성은 *B. pilosicoli*에 해당하는 내용이었다.

Multilocus enzyme electrophoresis

(1) Enzyme activity

Lee 등 [14]은 intestinal spirochetes의 효소학적인 분류에는 검사 가능한 30개의 효소 중 15개의 효소가 유의성이 있다고 하였다. 본 실험에서도 이에 준하여 15개 효소를 5가지 buffer system을 사용하여 검색하였다. 이를 통해 부여된 각 효소별 전기영동상의 대립형질의 종류 및 번호는 Table 3과 같다. ET가 모두 1인 효소는 균주간 형질이 모두 동일함을 의미하고, ET가 3인 것은 효소에서 형질이 3가지로 나타난다는 것을 의미한다.

(2) Genetic diversity

각 효소별 loci 빈도는 다음 Table 4와 같다. 각 효소의 locus당 allele의 평균 숫자는 1.57이었다. 유전적 변이가 가장 큰 효소는 GPI와 PGM로 0.469였고 ACPH, AK, ALP, FDP, GDA, HK, MPI, PEP, SOD는 동종 내 유전적 변이가 없었다. 즉 GPI와 PGM은 ET의 종류가

Table 2. Enzyme assay results using API-ZYM® system

Isolates	Enzymes																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CS-3	0	3	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	2	5	0	0	0	0	0	0
CS-4	0	2	2	3	0	0	0	0	0	0	2	0	1	5	0	0	0	0	0	0
CS-5	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	2	5	0	0	0	0	0	0

Table 3. Allelic frequencies for 15 enzyme loci in ETs of *B. pilosicoli* (P43/6/78) and Korean isolates

ETs*	Isolates	Alleles at the enzyme locus														
		ACP	ADH	AK	ALP	EST	FDP	GDA	GDH	GPI	HK	MPI	NP	PEP	PGM	SOD
1	P43/6/78	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
2	CS-3	1	2	1	1	1	1	1	2	3	1	1	2	1	2	1
3	CS-4	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1
2	CS-5	1	2	1	1	1	1	1	2	3	1	1	2	1	2	1

*: Electrophoretic type

Table 4. Allelic frequencies and genetic diversity at 15 enzyme loci in 3 canine intestinal spirochetes isolated from Korea

Enzyme locus	Frequencies of indicated allele			Genetic diversity
	1	2	3	
ACPH	1			0
ADH	0.75	0.25		0.281
AK	1			0
ALP	1			0
EST	0.25	0.75		0.281
FDP	1			0
GDA	1			0
GDH	0.5	0.5		0.375
GPI	0.25	0.25	0.5	0.469
HK	1			0
MPI	1			0
NP	0.25	0.75		0.281
PEP	1			0
PGM	0.25	0.5	0.25	0.469
SOD	1			0
Mean genetic diversity per locus				0.154

많은 의미이고 ACPH, AK, ALP, FDP, GDA, HK, MPI, PEP, SOD는 형질이 모두 동일하다는 것을 의미한다.

(3) Genetic relationships

MEE에 근거한 4개 균주들간의 유전적 거리는 Lee 등 [14]에 의하면 15개 이상의 효소의 다형성을 분석결과, 0.4의 유전적 거리이내에 분포하는 시료들은 동종으로 구분할 수 있다고 했는데, 본 실험 결과 분리주들은 표준균주인 P43/6/78과 모두 0.357의 유전적 거리 이내에 분포하여 같은 종으로 추정되었다. 각 균주별로 dissimilarity를 분석한 내용은 Table 5에 정리하였으며 위의 결과들을 돼지의 intestinal spirochete 인 *B. hyodysenteriae*와 비교하여 작성한 phenogram은 Fig. 2와 같다.

Table 5. Dissimilarity matrix of genetic distances among *B. pilosicoli* (P43/6/78) and Korean isolates

Isolates	ETs				
P43/6/78	1	.000			
CS-3	2	.286	.000		
CS-4	3	.357	.357	.000	
CS-5	2	.286	.000	.357	.000
		P43/6/78	CS-3	CS-4	CS-5

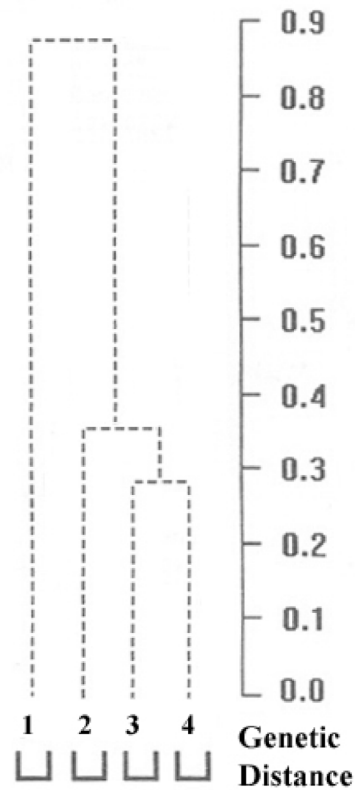


Fig. 2. Phenogram constructed by cluster analysis to demonstrate relatedness among porcine and canine isolates, based on MEE. Lane 1: *B. hyodysenteriae* B204; 2: CS-4; 3: CS-3 and 5; 4: *B. pilosicoli* P43/6/78.

고 찰

개의 intestinal spirochetes는 Craigie [2]에 의해 최초 보고된 이래 많은 보고자에 의해 그 발병 및 분리보고가 있었다. 특히 외부증상이 없는, 즉 설사증상을 보이지 않는 정상 개에서도 분리된다 [21]. 호주의 경우 전체적으로 약 18.7%의 감염률을 보이고 있고 설사를 보이는 개 분변의 67.7%에서, 그리고 정상견의 14.4%가 분변내 직접 검검으로 intestinal spirochetes의 존재를 확인할 수 있다는 보고도 있다 [21]. 또한 Turek and Meyer [20]는 정상개의 결장을 scraping하여 보면 66.7%의 intestinal spirochetes 검출률을 보인다고 했다. 하지만 본 실험에서는 집단사육시설에서 유래된 분변 70개 중에서 3개의 균주가 분리되었는데(4.28%) 이는 국내에서는 돼지의 경우처럼 항생제가 남용되고 있어 특정 항생제에 저항력이 약한 *B. pilosicoli*의 전파율이 낮은 것으로 추정된다. 또 개의 intestinal spirochetes가 돼지에 있어 감염을

유발할 수 있음이 밝혀져 [20], 개 역시 돼지의 감염 전파원이 될 수 있음을 암시하였다. 그리고 개의 intestinal spirochetes는 사람이나 돼지 등 다른 동물에서 분리되는 intestinal spirochetes와 많은 연관성이 있음이 밝혀지고 있다. 특히 de Wergifosse and Coene [3]에 의하면 개의 intestinal spirochetes의 DNA는 사람의 intestinal spirochetes와 56-95%까지의 homology를 보인다고 보고하였다. 한편 Koopman 등 [12]도 동물별 intestinal spirochetes 사이의 hemolysin gene 및 flagella gene, 16S rRNA sequence에 대한 DNA probe에 각 숙주별로 비특이적 결합반응을 보인다고 하여 더욱 이들 intestinal spirochetes 사이의 연관성이 입증되고 있다. Duhamel 등 [4]도 개의 intestinal spirochetes가 사람 및 돼지 spirochetes와 유전학적으로 연관이 되어 있음을 보고한 바 있다. 그리고 동물과의 접촉으로 인한 사람에의 감염의 보고는 최근까지도 계속되어 오고 있다 [17]. 최근 몇 년간 국내에서도 각종 대중매체의 홍보에 힘입어 반려 동물로서 애견과 함께 생활하는 인구가 많이 증가함에 따라 애견으로부터 전파되는 각종 인수공통 질병에 대한 연구 및 각성이 요구되고 있다. 이러한 시점에서 본 연구는 *B. pilosicoli*에 의해 발생하는 인수공통 전염병인 intestinal spirochetosis의 원인균을 분리, 보고하는데 그 의의가 있다고 하겠다. 특히 분리된 균주가 사람의 intestinal spirochetosis의 원인균과 동일하다는 점은 공중보건학적으로 중요한 의미를 가진다고 하겠다. 본 실험의 결과, 분리주들의 분류를 위해 실시한 형태학적, 생화학적 검사에서는 종분류를 할 수 있는 기초 자료를 제공하였다. 더불어 실시한 MEE 실험에서는 분리주들과 *B. pilosicoli* 표준균주(P43/6/78) 사이의 유전적 거리를 알 수 있게 함으로써 위의 2가지 실험체계를 보충하기에 충분하였고 아울러 MEE의 유전학적인 수준에서의 종분별력의 우수함을 다시 한 번 알 수 있었다.

참고문헌

1. Brooke, C. J., Clair, A. N., Mikosza, A. S. J., Riley, T. V. and Hampson, D. J. Carriage of intestinal spirochaetes by humans: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiol. Infect.* 2001, **127**, 369-374.
2. Craige, J. E. Spirochetes associated with dysentery in dogs. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* 1948, **113**, 247-249.
3. de Wergifosse P. and Coene, M. Comparison of the genomes of pathogenic Treponemes of human and animal origin. *Infect. Immun.* 1989, **57**, 1629-1631.
4. Duhamel, G. E., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Johnson, J. L., Toth, J., Elder, R. O. and Doster, A. R. Certain canine weakly beta-hemolytic intestinal spirochetes are phenotypically and genotypically related to spirochetes associated with human and porcine intestinal spirochetosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 2212-2215.
5. Duhamel, G. E., Trott, D. J., Muniappa, N., Mathiesen, M. R., Tarasuik, K., Lee, J. I. and Hampson, D. J. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and newly identified group provisionally designated "*Serpulina canis*" sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2264-2270.
6. Fellstrom, C., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A. and Feinstein, R. Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. *Anim. Health Res. Rev.* 2001, **2**, 75-82.
7. Goudswaard, J. and Cornelisse, J. L. The agent possibly associated with swine dysentery and the antigenic relationship with *Borrelia canis*. *Vet. Rec.* 1973, **21**, 562-563.
8. Helie, P., Harel, J. and Higgins, R. Intestinal spirochaetosis in a guinea pig with colorectal prolapse. *Can. Vet. J.* 2001, **41**, 134.
9. Hunter, D. and Wood, T. An evaluation of the API ZYM system as a means of classifying spirochaetes associated with swine dysentery. *Vet. Rec.* 1979, **104**, 383-384.
10. Jansson, D. S., Brojer, C., Gavier-Widen, D., Gunnarsson, A. and Fellstrom, C. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* Spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. *Anim. Health Res. Rev.* 2001, **2**, 93-100.
11. Jenkinson, S. R. and Wingar, C. R. Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 1981, **109**, 384-385.
12. Koopman, M. B. H., Kasbohrer, A., Beckmann, G., van der Zeijst B. A. M. and Kusters, J. G. Genetic similarity of intestinal spirochaetes from human and various animal species. *J. Clin. Microbiol.* 1993, **31**, 711-716.
13. Kunkle, R. A., Harris, D. L. and Kinyon, J. M. Autoclaved liquid medium for prolongation of *Treponema hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.* 1986, **24**, 669-671.
14. Lee, J. I., Hampson, D. J., Lymbery, A. J. and Harders, S. J. The porcine intestinal spirochaetes: Identification of new genetic groups. *Vet. Microbiol.*

- 1993, **34**, 273-285.
15. **Mikosza, A. S. J. and Hampson, D. J.** Human intestinal spirochaetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*? Anim. Health Res. Rev. 2001, **2**, 101-110.
 16. **Mikosza, A. S. J., La, T., de Boer, W. B. and Hampson, D. J.** Comparative prevalences of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* as etiologic agents of histologically identified intestinal spirochetosis in Australia. J. Clin. Microbiol. 2001, **39**, 347-350.
 17. **Mikosza, A. S. J., Hampson, D. J., Koopmans, M. P. and van Duynhoven, Y. T.** Presence of *Brachyspira aalborgi* and *B. pilosicoli* in feces of patients with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 2003, **41**, 4492.
 18. **Stephens, C. P. and Hampson, D. J.** Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. Avian Pathol. 1999, **28**, 447-454.
 19. **Trivett-Moore, N. L., Gilbert, G. L., Law, C. L. H., Trott, D. J. and Hampson, D. J.** Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. J. Clin. Microbiol. 1998, **36**, 261-265.
 20. **Turek, J. J. and Meyer, R. C.** Studies on a canine intestinal spirochaetes : Scanning electron microscopy of canine colonic mucosa. Infect. Immun. 1978, **20**, 853-855.
 21. **Zymet, C. L.** Canine spirochetosis and its association with diarrhea. Vet. Med. Small Animal Clinician. 1969, **64**, 883, 886-887.