

## 콘택트렌즈 보존 용기 유래 *Acanthamoeba lugdunensis* KA/L5주의 내공생세균

정동일<sup>1)\*</sup>, 공현희<sup>1)</sup>, 김태호<sup>1)</sup>, 황미열<sup>1)</sup>, 유학선<sup>1)</sup>, 윤호철<sup>1)</sup>, 설성용<sup>2)</sup>

경북대학교 의과대학 기생충학교실<sup>1)</sup>, 미생물학교실<sup>2)</sup>

**초록:** 콘택트렌즈 보존 용기 유래 가시아메바 KA/L5주의 세포질 내에 존재하는 bacterial endosymbiont(내공생세균)을 투과전자현미경으로 관찰하여 확인하였다. 숙주인 가시아메바 KA/L5주는 형태학적으로 제2군에 속하였고, rDNA PCR-RFLP 결과 *A. lugdunensis*로 동정되었다. 미토콘드리아 DNA RFLP와 동위효소 분석상 이 종주는 국내 콘택트렌즈 보존용기에서 가장 흔히 분리되는 type인 KA/L1주, 국내 임상 분리주 중 하나인 KA/E2주, 내공생세균을 가지는 것으로 보고된 병원 냉각수 유래 KA/W4주 및 L3a주와 동일하거나 매우 유사한 성질을 보였다. 내공생세균은 약  $1.38 \times 0.50 \mu\text{m}$ 의 크기였고, 아메바 세포질 내에 불규칙하게 분포하고 있었으며, 그 표면에 아메바의 ribosome이 부착되어 있었다. 내공생세균을 둘러싼 lacuna나 막과 같은 구조는 관찰되지 않았다. *Legionella* 특이 primer를 이용한 효소중합반응(PCR)에서 내공생세균의 염색체 DNA는 증폭되지 않았다. *A. lugdunensis*의 우리말 이름을 담수가시아메바로 제안한다.

가시아메바는 인간의 생활 주변 환경에 널리 분포하면서(Visvesvara, 1991) 종에 따라 인체에 육아종성 뇌염, 각막염, 피부염, 폐렴 등을 일으킨다(Martinez, 1987; Helton et al., 1993). 또한 *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp., *Vibrio* spp. 및 *Listeria* spp. 등 병원성 미생물의 vector 역할을 하여(Jadin, 1973; Ly & Muller, 1990a, b; Field, 1991; Thom et al., 1992) 의학적 중요성을 더하고 있다. 그리고 가시아메바의 세포 내에 일반적인 배지로는 배양되지 않는 미동정 상태의 박테리아성 endosymbiont(내공생세균)에 관해서도 여러 학자들이 보고하고 있다(Proca-Ciobanu et al., 1975; Hall & Voelz, 1985; Drozanski, 1991; Fritsche et al., 1993; Gautom & Fritsche, 1995; Yagita et al., 1995; Kong & Chung, 1996).

저자들은 콘택트렌즈 보존 용기로부터 분리한 가시아메바 분리주들을 확보하고 그들의 생화학 및 분자생물학적 특성을 파악해 오던 중 한 분리주

(KA/L5)의 미토콘드리아 DNA RFLP 양상이 독특함을 관찰하였다. 이 분리주의 DNA 단편들의 크기의 합은 통상적으로 알려져 있는 가시아메바 미토콘드리아 DNA(40-55 kbp)보다 훨씬 컸으며, 반복적 실험에서도 계속 같은 결과를 보였다. 이 소견은 가시아메바 KA/L5주 세포 내에 미토콘드리아 DNA 이외에 또 다른 환상(circular) DNA의 존재를 시사하며 저자들은 그 DNA가 가시아메바 내에 기거하는 내공생세균에서 유래할 것으로 생각하였다.

본 연구에서는 국내 콘택트렌즈 보존 용기에서 분리한 가시아메바 KA/L5주의 세포질 내에 기거하는 내공생세균의 존재를 투과 전자현미경으로 확인하고, 그 분리주의 유전적 특성을 파악하여 보고하고자 한다.

콘택트렌즈 보존 용기에서 이 등(1996)의 방법으로 KA/L5주를 분리하고 0.1 N HCl로 무균화시켜 섭씨 24도 배양기에서 PYGC 배지에 배양하였다.

KA/L5주의 동정을 위해 18S rRNA coding DNA의 PCR-RFLP를 시행하였다. 18S rDNA universal primer를 이용하여 PCR로 증폭한 ssu rDNA를 8가지 제한 효소로 소화시킨 후 2.5% 한천 겔 또는 12% acrylamide 겔에 전기 영동하여 단편들의 크기와 수를 확인하고 지금까지 알려진

\* 논문접수 1997년 1월 10일, 수정후 채택 1997년 5월 12일

• 이 연구는 1994년도 경북대학교 병원 의학연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

\*책임저자(E mail address: dichung@bh. kyung-pook.ac.kr)

충추들의 성적과 비교하였다. 사용한 universal primer의 염기서열은 다음과 같다.

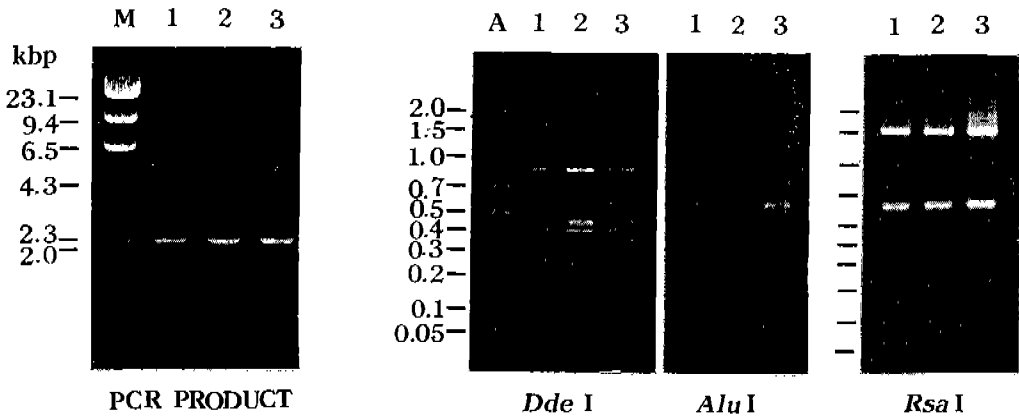
P1: 5'-CCGAATTCGTCFACAACTGGTTGATC  
C TGCCAGT-3'

P2: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGC  
AGGTTACCTAC-3'

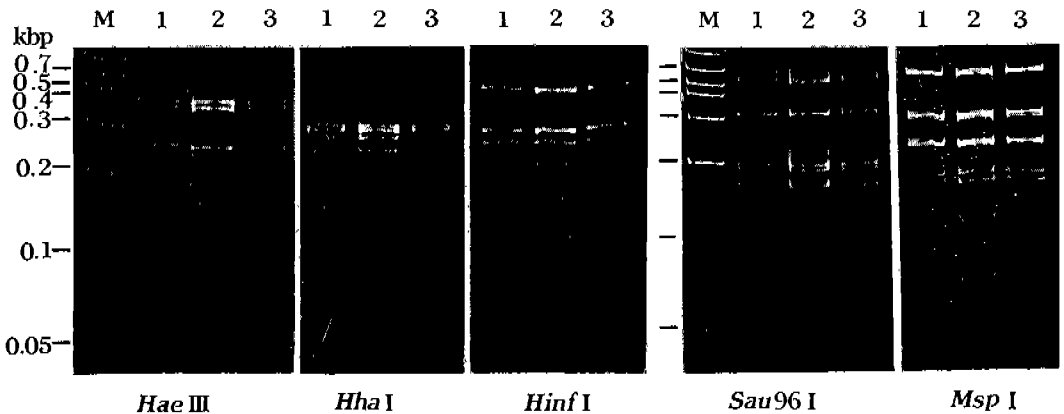
Yagita and Endo(1990)의 방법으로 추출한 가시아메바 미토콘드리아 DNA를 제한 효소로 소화시켜 0.7% 한천 겔에 전기 영동하였다. Kong *et al.*(1995)의 방법으로 가시아메바 lysate를 만들고 isoelectric focusing을 시행하여 동위효소의 양상을 파악하였다. 가시아메바 국내 분리주인 KA/L1, KA/W4, KA/W2, KA/E2 및 *A. lugdunensis* L3a주를 비교주로 하여 KA/L5의 미토콘드리아 DNA RFLP 양상과 동위효소 양상을 비교주들의 성적과 비교하였다.

투과 전자현미경으로 관찰하기 위해 가시아메바 KA/L5주의 영양형과 포낭형을 취하여 PBS(-)로 3회 세척하고 2.5% glutaraldehyde로 3시간 전고정하였다. 0.1 M phosphate buffer로 세척한 다음 1% osmium으로 3시간 동안 후고정 하였다. 0.1 M maleate buffer로 세척하고 ethanol로 단계적으로 탈수한 후 propylene oxide로 30분간 처리하였다. Plastic에 embed하여 섭씨 60도에서 굳힌 다음 ultramicrotome으로 잘라 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

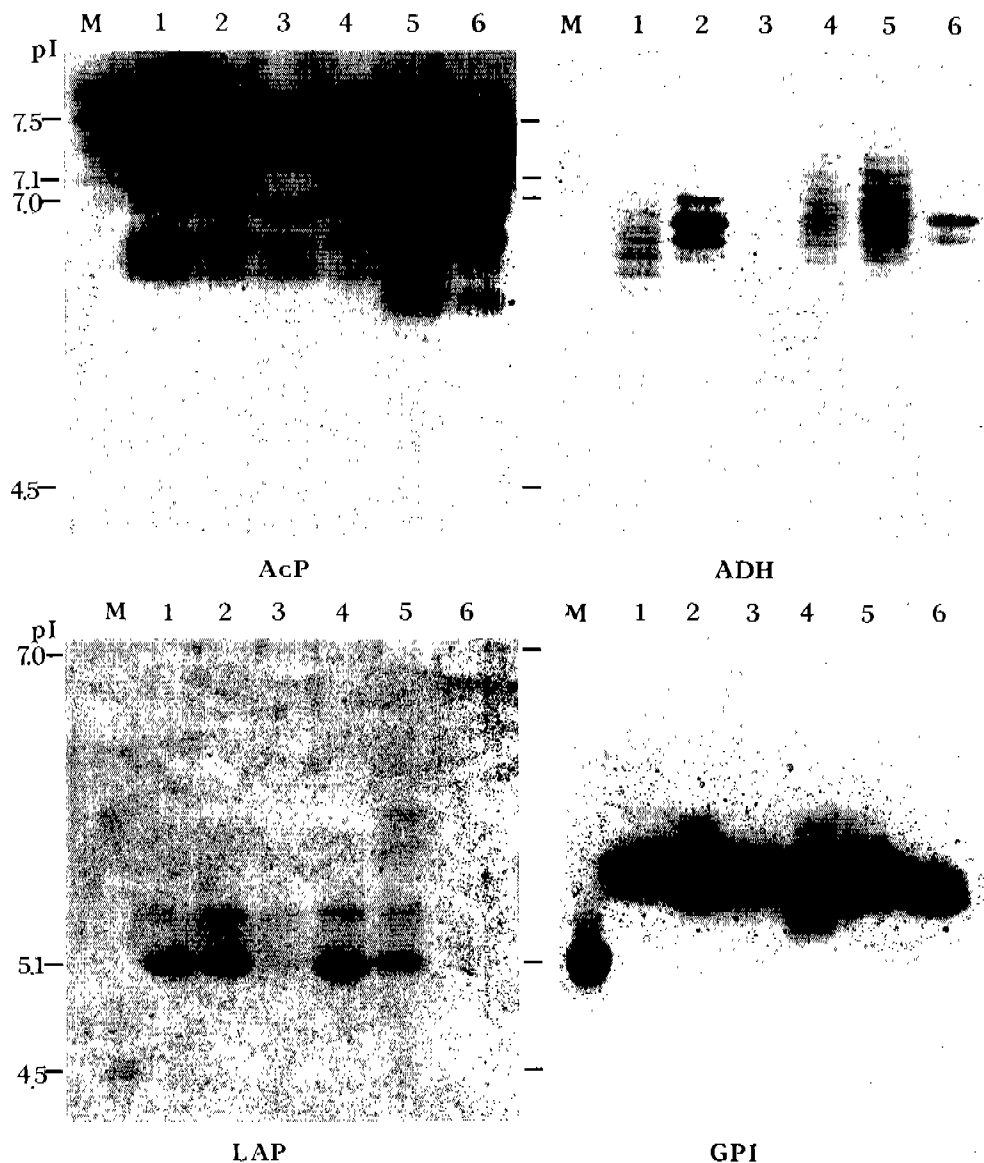
*Legionella* 5S rRNA coding DNA 특이 primer(Koide *et al.*, 1993)를 사용하여 KA/L5주 내공생세균의 핵 DNA를 효소 중합 반응시켰다. 사용한 primer는 L5SL9(5'-ACTATAGCGATTGGAACCA-3')와 L5SR93(5'-GCGATGACCTACT



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoretic patterns of PCR products and digested DNA fragments of *Acanthamoeba* KA/L5 and reference strains. **Lane 1:** *Acanthamoeba* KA/L5, **2:** *Acanthamoeba* KA/L1, **3:** *Acanthamoeba* *lugdunensis* L3a, **M:** *Hind* III digested lamda phage DNA, **A:** Amplisize<sup>R</sup> (Biorad, USA) as DNA molecular size standard.



**Fig. 2.** Acrylamide gel electrophoretic patterns of digested PCR product of *Acanthamoeba* KA/L5 and reference strains. **Lane 1:** *Acanthamoeba* KA/L5, **2:** *Acanthamoeba* KA/L1, **3:** *Acanthamoeba* *lugdunensis* L3a, **M:** Amplisize<sup>R</sup> (Biorad, USA) as DNA molecular size standard.



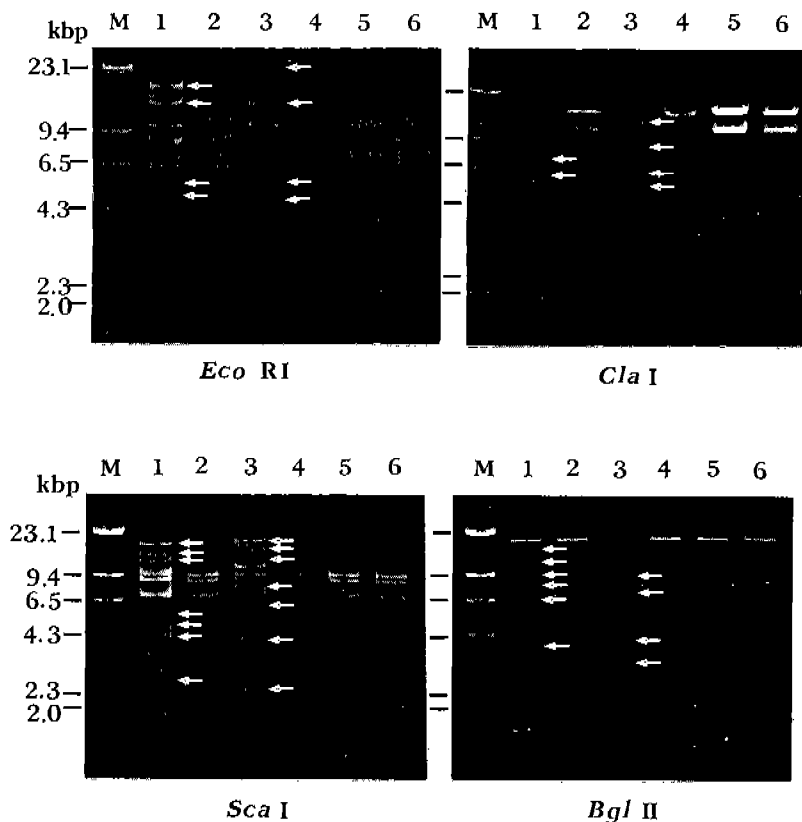
**Fig. 3.** Zymograms for isoenzymes of KA/L5 and reference strains of *A. lugdunensis* separated by polyacrylamide gel isoelectric focusing in pH gradient 3-10. AcP, acid phosphatase; ADH, alcohol dehydrogenase; LAP, leucine aminopeptidase; GPI, glucose phosphate isomerase. **Lane 1:** *A. lugdunensis* KA/L5, **2:** KA/L1, **3:** KA/W4, **4:** KA/W2, **5:** KA/E2, **6:** L3a strain.

TT CGCAT-3')이며 섭씨 94도 1분, 55도 1분 및 72도 1분을 30회 반복하였다.

가시아메바 KA/L5주의 포낭은 크기가 10.2-13.2  $\mu\text{m}$ (평균 11.9  $\mu\text{m}$ )였고 4-6개(평균 4.7개)의 arm을 갖고 있어, 형태학적으로 Pussard and Pons(1977)의 제2군에 속하였다. Riboprints에 의거하여 KA/L5주는 *A. lugdunensis*로 동정하였다(Fig. 1 & 2). 이 분리주는 콘택트렌즈 보존 용

기에서 분리된 가시아메바 KA/L1주, 병원 냉각수 유래 KA/W4주 및 KA/W2주, 국내 각막염 유래 KA/E2주 및 *A. lugdunensis* L3a주(ATCC #50240)와 동위 효소 양상은 아주 유사하였으며(Fig. 3), 미토콘드리아 DNA RFLP에서도 KA/L1주, KA/W2주, KA/E2주 및 L3a주의 모든 분획에 대한 공통 분획을 가지고 있었다(Fig. 4).

투과 전자현미경으로 확인한 내공생세균은 가시



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoretic patterns of digested mitochondrial DNA of *A. lugdunensis* KA/L5 and reference strains. **Lane 1:** *A. lugdunensis* KA/L5, **2:** KA/L1, **3:** KA/W4, **4:** KA/W2, **5:** KA/E2, **6:** L3a strain, **M:** *Hind* III digested lambda phage DNA as DNA molecular size standard. KA/L5 and KA/W4 show extra bands (arrows) as well as common bands with the other reference strains.

아메바 KA/L5주의 영양형과 포낭형의 세포질 내에 무작위로 분포하고 있었다(Fig. 5A, B). 미토콘드리아의 수와 비교해 볼 때, 영양형에서는 내공생세균이 1.5배로 많았으나 포낭형에서는 0.4배로 그 수가 적었다. 끝이 둥근 간균 형태로 크기는  $1.38 \times 0.50 \mu\text{m}$ 인 내공생세균은 이중 막 구조를 가지며 세포막의 바깥에는 가시아메바의 리보솜들이 많이 부착되어 있었다(Fig. 5C). 가시아메바에서 분리된 endosymbiont들은 편모는 없었다.

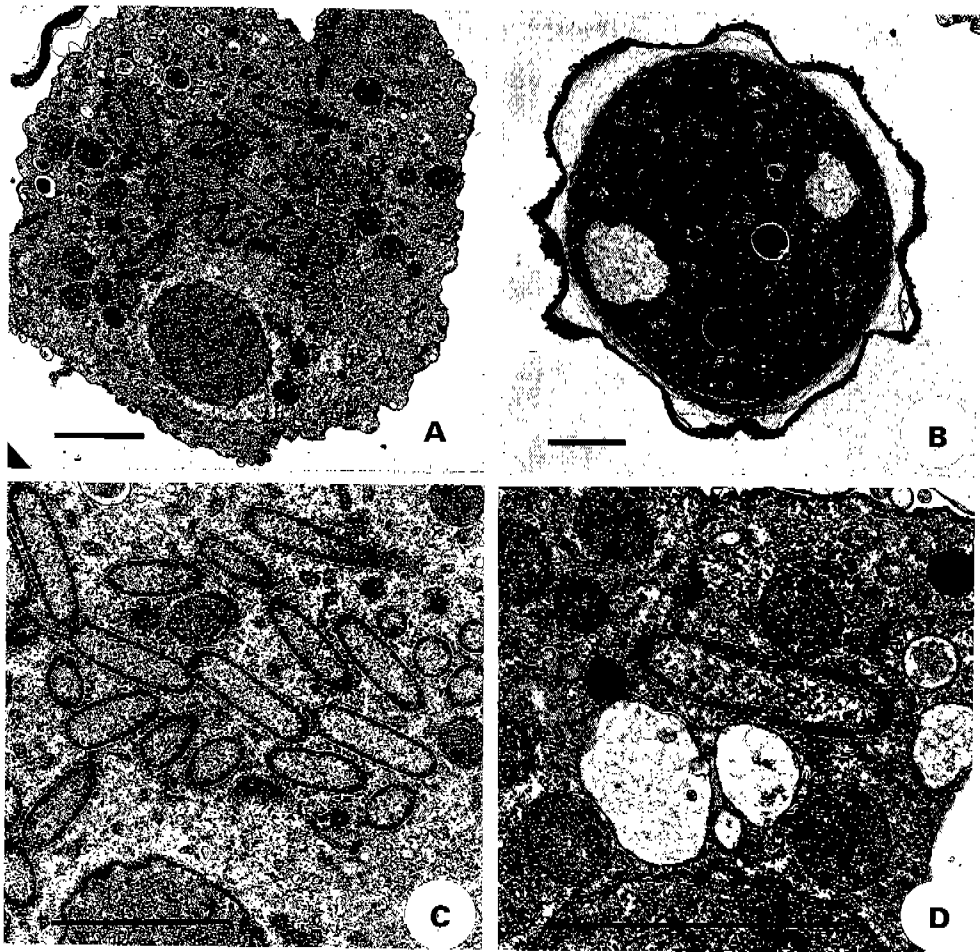
*Legionella* 특이 primer를 사용한 효소 중합 반응 결과 KA/L5주의 내공생세균의 염색체 DNA는 증폭되지 않았다(Fig. 6).

국내에서 분리된 가시아메바에 기거하는 내공생세균에 대한 보고는 Kong and Chung(1996)의 병원 냉각수에서 분리한 가시아메바 KA/W4주에 이어 본 연구가 두번째이다. 가시아메바 KA/L5주는 국내 콘택트렌즈 보존 용기에서 분리된 KA/L1주, 프랑스의 수영장에서 분리된 L3a주, 그리고 국내 아메바성 각막염 환자에서 분리된 KA/E2주와 동일하거나 매우 유사한 유전적 특성을 나타내었

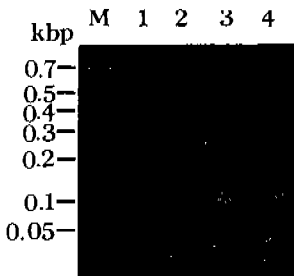
다. L3a주는 마우스의 두개골 내에 실험적으로 주입하였을 때 50%의 치사율을 보여 병원성 분리주로 알려져 있고(De Jonckheere, 1980) KA/E2주 또한 임상 각막염에서 분리되어 병원성이 증명된 분리주이다. 그러므로 KA/L5주의 병원성 및 *in vitro* 세포 병원성에 대한 연구가 신속히 수행되어야 할 것이다.

가시아메바 KA/L5주에서 발견된 내공생세균은 형태학적으로 Kong and Chung(1996) 및 Yagita *et al.*(1995)이 보고한 가시아메바의 내공생세균과 상당히 유사하다. 내공생세균의 가시아메바 내 분포 정도는 KA/L5의 경우(11-25/section) Yagita *et al.*의 보고(8-10/section) 보다는 많았으나 Kong and Chung의 보고(33-77/section) 보다는 적었다.

가시아메바의 배양 환경에 세균의 존재는 가시아메바의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 콘택트렌즈 보존 용기의 소독이 불완전하여 세균과 가시아메바가 동시에 오염된 경우, 각막염의 유발 가능성은 더욱 높아진다고 알려져 있다(Gautom &



**Fig. 5.** Electron micrographs of *A. lugdunensis* KA/L5 with bacterial endosymbionts. **A:** Rod-shaped bacterial endosymbionts are randomly distributed in the cytoplasm of trophozoite. **B:** Cyst with endosymbionts. **C:** Magnification of A. Ribosomes of amoebic host are studded on the surface of endosymbionts. **D:** Dividing endosymbiont. Bar indicates 2  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Agarose gel electrophoresis of PCR products with *Legionella* specific primer set. Chromosomal DNA of endosymbionts and *Legionella* spp. were used as template DNA. **Lane 1:** endosymbionts of *Acanthamoeba* KA/L5 strain, **2:** *L. pneumophila* ATCC 33154, **3:** *L. pneumophila* ATCC 33156, **4:** *L. gormanii* ATCC 33297, **M:** Amplisize as DNA molecular size standard.

Fritsche, 1995). 그러나 숙주 아메바 내에 영구적으로 존재하는 내공생세균과 가시아메바의 관계에 대해서는 아직 알려진 바가 별로 없다. Fritsche *et al.*(1993)은 임상 및 환경에서 분리한 가시아메바 분리주들의 24%에서 bacterial

endosymbiont를 가진다고 보고하였다. Proca-Ciobanu *et al.*(1975)은 내공생세균을 가진 가시아메바 분리주를 발견하고 내공생세균의 존재가 가시아메바의 병원성에 어떤 영향을 줄 것이라고 예측하였다. 그러나 아직 이 내공생세균들이 가시아

메바의 생존이나 병원성 등에 미치는 영향은 별로 알려진 것이 없다. 가시아메바에 기생하는 내공생 세균이 숙주 가시아메바에 미치는 영향을 연구하는 데는 여러 가지 어려움이 있다. 내공생세균을 가시아메바로부터 분리하여 배양할 수 없고 가시아메바 분리주들 간의 심한 특성 차이 때문에 내공생세균을 가진 가시아메바 분리주의 여러 가지 특성을 내공생세균이 없는 분리주와 직접적으로 비교할 수 없는 점 등이다. Gautom and Fritsche(1995)은 내공생세균과 숙주 가시아메바와의 상호 관계를 연구하기 위한 수단으로 내공생세균의 유무를 제외한 다른 특성들은 모두 같은, 유전적으로 동일한 가시아메바 분리주들(isogenetic pair)의 제작을 시도한 바 있다.

본 연구에서 얻은 결과들로 가시아메바 KA/L5 주는 KA/L1주와 내공생세균의 존재 여부를 제외하고는 유전적으로 거의 동일한 것을 알 수 있었고 이들 isogenetic pair를 이용하여 내공생세균과 가시아메바의 상호관계에 대하여 많은 연구를 할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- 이상미, 최을제, 정동일 (1996) 콘택트렌즈 보존액 및 보존용기에서의 *Acanthamoeba*에 의한 오염. 대한안과학회지 **37**: (in press).
- De Jonckheere JF (1980) Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **39**: 681-685.
- Drozanski WJ (1991) *Sarcobium lyticum* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 82-87.
- Field BS (1991) The role of amoebae in legionellosis. *Clin Microbiol Newsletter* **13**: 92-93.
- Fritsche TR, Gautom RK, Seyedirashti S, Bergeron DL, Lindquist TD (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**: 1122-1126.
- Gautom RK, Fritsche TR (1995) Transmissibility of bacterial endosymbionts between isolates of *Acanthamoeba* spp. *J Euk Microbiol* **42**: 452-456.
- Hall J, Voelz H (1985) Bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp. *J Parasitol* **71**: 89-95.
- Helton J, Loveless M, White CR Jr (1993) Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *Am J Dermato-pathol* **15**: 146-149.
- Jadin JB (1973) De la meningoencephalite amibienne et du pouvoir pathogene des amibes limax. *Année Biologique* **12**: 305-342.
- Koide M, Saito A, Kusano N, Higa F (1993) Detection of *Legionella* spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1943-1946.
- Kong HH, Chung DI (1996) Bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp. isolated from cooling tower water. *Jpn J Parasitol* **45**(6): (in press).
- Kong HH, Park JH, Chung DI (1995) Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. *Korean J Parasitol* **33**: 331-340.
- Ly TMC, Muller HE (1990a) Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* **33**: 51-54.
- Ly TMC, Muller HE (1990b) Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* with protozoans. *J Gen Appl Microbiol* **36**: 143-150.
- Martinez AJ (1987) Amphizoic amoeba; human pathology. Piccin, Italy, 183-186.
- Proca-Ciobanu M, Lupascu GH, Petrovici AL, Ionescu MD (1975) Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: The presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**: 49-56.
- Pussard M, Pons P (1977) Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* **13**: 557-598.
- Thom S, Warhurst D, Drasar BS (1992) Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* **36**: 303-306.
- Visvesvara GS (1991) Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infec Dis* **13**(Suppl. 5): s369-s372.
- Yagita K, Endo T (1990) Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J Protozool* **37**: 570-575.
- Yagita K, Matias RR, Yasuda T, Natividad FF, Enriquez GL, Endo T (1995) *Acanthamoeba* sp. from the Philippines: electronic microscopy studies on naturally occurring bacterial symbionts. *Parasitol Res* **81**: 98-102.

## = Abstract =

# Bacterial endosymbiosis within the cytoplasm of *Acanthamoeba lugdunensis* isolated from a contact lens storage case

Dong-II CHUNG<sup>1)\*</sup>, Hyun-Hee KONG<sup>1)</sup>, Tae-Ho KIM<sup>1)</sup>, Mee-Yul HWANG<sup>1)</sup>,  
Hak-Sun YU<sup>1)</sup>, Ho-Cheol YUN<sup>1)</sup> and Sung-Yong SEOL<sup>2)</sup>

Department of Parasitology<sup>1)</sup> and Department of Microbiology<sup>2)</sup>,  
Kyungpook National University School of Medicine, Taegu 700-422, Korea

Transmission electron microscopy of an *Acanthamoeba* isolate (KA/L5) from a contact lens case revealed bacterial endosymbionts within cytoplasm of the amoebae. The *Acanthamoeba* isolate belonged to the morphological group II. Based on the polymerase chain reaction (PCR) — restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 18S ribosomal RNA coding DNA (rDNA), the isolate was identified as *A. lugdunensis*. Strain typing by isoenzyme analysis using isoelectric focusing (IEF) and mitochondrial (Mt) DNA RFLP revealed that the isolate was closely related with KA/L1, the most predominant type of isolates from contact lens storage cases, KA/E2, a clinical isolate, KA/W4, previously reported to host endosymbionts, and L3a strains of *A. lugdunensis*. The endosymbionts were similar to those of KA/W4 in aspects that they were randomly distributed in both trophozoites and cysts, and were rod-shaped bacteria measuring approximately 1.38 x 0.50  $\mu\text{m}$ . But the number of endosymbionts per amoeba was significantly lower than that of KA/W4. They were neither limited by phagosomal membranes nor included in lacunae-like structure.

**Key words:** Intracytoplasmic endosymbionts, *Bacillus*, *Acanthamoeba lugdunensis*, contact lens storage case

[Korean J. parasitol. 35(2): 127-133, June 1997]

---

\*Corresponding author

故 백영한 교수 약력  
(1927. 12. 17.-1997. 3. 27.)



본적: 서울시 용산구 청파동 3가 108번지  
주소: 서울 용산구 이촌1동 렉스아파트 19동 406호

학력: 1951. 9	서울대학교 의과대학 졸업
1960. 3	우석대학교 대학원 의학석사과정(예방의학 전공) 수료
1961. 3	일본 오사카 시립대학 의학박사학위 수령
경력: 1990-1992	경희대학교 의과대학 학장
1986-1993	경희대학교 의과대학 교수
1967-1986	세계보건기구 파견 근무
1960-1966	보건사회부 말라리아 박멸사업 담당관
기타: 1990-1991	대한기생충학회장
1992-	세계보건기구 서태평양지역 보건연구 자문위원
1986-	세계보건기구 말라리아 전문위원
1989.12	한국보건대상 수상

IN MEMORIUM

YUNG HAN PAIK  
(1927. 12. 17.-1997. 3. 27.)

Professor Yung Han Paik (1927-1997), Member Emeritus and the 18th President of KSP in 1990-1991, died on 27 March 1997. He was 70. He graduated in 1951 from Seoul National University, and received his Ph.D. from Osaka University, Japan in 1961. He actively engaged in malaria control program as an official in the Ministry of Health, Korea from 1960 to 1966, and then extended his career in the West Pacific regions including Solomon Islands, Papua New Guinea as a consultant for the World Health Organization (WHO). Since 1986, he served on the Department of Parasitology, College of Medicine, Kyung Hee University, and retired in 1993.