

2022년 매개체감염병과 연구사업 최종 보고서

해외유입 감염병 매개모기의 생화학적 추적관리

2023. 2. 6.



인천광역시 보건환경연구원

<http://incheon.go.kr/ecopia>

매개체감염병과

I. 서론

기후변화 및 세계화로 감염병매개모기의 서식지가 확대됨에 따라 이에 수반된 감염병 또한 확산되고 있다. 현재까진 유입된 모기로 인한 감염병 발생은 없었으나, 2019년 인천국제공항 인근 채집 모기에서 땡기 바이러스 유전자가 검출되어 항공기를 통한 감염병 매개모기 유입 가능성이 확인된 바 있다. 그러나 입국 환자 흡혈을 통한 국내 서식 모기 감염 가능성 또한 배제할 수 없어 해외유입 여부를 판단할 근거자료가 필요한 상황이다.

집단 내 새로운 개체의 유입 여부를 확인하는 방법으로 미토콘드리아 유전자의 염기서열 비교 분석법이 많은 연구에서 활용되고 있으며, 특히 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 유전자는 집단 간 계통분석에 널리 사용되고 있다. 국내에선 모기매개 감염병을 전파하는 흰줄숲모기가 주로 연구되고 있으며, 국제공항과 항만이 위치한 제주도에선 베트남 서식종과 동일한 유전자를 갖고 있는 흰줄숲모기가 확인된 바 있다.

생물의 이동 및 유입 연구에는 원자번호가 같지만 질량수가 다른 안정동위원소 분석 기법 또한 활용되고 있다. 안정동위원소는 기존 원소와 물리·화학적 성질은 같으나 생화학적 반응률에 차이가 있어, 서식지 및 섭식에 따라 생체 내에 다른 비율을 보이는 특성이 있다. 이러한 특성은 식품의 원산지 추적, 생물 간의 상호작용과 먹이사슬, 이동 및 유입에 관한 연구 뿐만 아니라 모기의 공간 분산 연구에도 활용되고 있다. 국내에서는 고춧가루, 콩, 돼지고기 등 식품의 원산지 판별을 위한 연구 결과가 보고되고 있으나, 모기의 안정동위원소비를 활용한 연구 결과는 보고된 바 없다.

본 연구는 땡기열, 치쿤구니아열, 지카바이러스감염증 등을 매개하는 흰줄숲모기와 2019년 땡기 바이러스가 검출된 바 있는 반점날개집모기를 대상으로 미토콘드리아 유전자와 안정동위원소비를 비교 분석하여 유입여부를 확인하고 이동경로를 추적함으로써 감염병 매개모기의 유입 가능성에 대한 근거자료를 확보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

모기채집 및 분류

감염병 매개모기의 유입 관문이 될 수 있는 인천국제공항 및 인천항 국제여객터미널 주변으로 5개 지점을 선정하여 6월부터 10월까지 BG-sentinel trap(지점당 1개)법으로 월 2회 채집하였다. 채집된 모기는 질병관리청에서 제공하는 분류표에 준하여 형태학적으로 분류하였으며 이중 흰줄숲모기와 반점날개집모기를 본 연구에 사용하였다.



그림 1. 모기 채집 지점

미토콘드리아 유전자 분석

채집된 흰줄숲모기와 반점날개집모기의 다리 1개씩을 100 μ L PBS와 멸균 bead가 들어 있는 튜브에서 30초간 파쇄한 후 DNeasy Blood & Tissue mini kit의 매뉴얼에 따라 DNA를 추출하였다.

미토콘드리아 유전자 중 Cytochrome C oxidase subunit I(COI), NADH dehydrogenase subunit 5(ND5)를 분석하기 위하여 PCR premix(accupower hotstart, Bioneer, Korea)에 추출된 DNA와 primer를 혼합하여 PCR를 진행하였다.

표 1. Cytochrome C Oxidase subunit I(COI) 유전자 증폭을 위한 primer

Primer	Sequence(5' → 3')	Size
LCO1490	GTT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	709bp
HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
COI_2027F	CCC GTA TTA GCC GGA GCT AT	952bp
AealCOIb-r	CAT TGC ACT AAT CTG CCA TA	

표 2. NADH Dehydrogenase subunit 5(ND5) 유전자 증폭을 위한 primer

Primer	Sequence	Size
FOR ND5	TCC TTA GAA TAA AAT CCC GC	449bp
REV ND5	GTT TCT GCT TTA GTT CAT TCT TC	

표 3. PCR 시약 제조

Components	Volume (μL)	
	COI	ND5
accupower hotstart PCR premix	freeze-dried	freeze-dried
primer forward (5 pmole/μL)	1	1
primer reward (5 pmole/μL)	1	1
DW	16	13
DNA template	2	5
Total reaction volume	20	20

표 4. PCR 반응조건

CO I -1			CO I -2			ND5		
Cycle	Temp(°C)	Time	Cycle	Temp(°C)	Time	Cycle	Temp(°C)	Time
5	94	40 sec	1	95	5 min	1	95	5 min
	45	1 min		94	1 min		94	30 sec
	72	1 min		55	1 min		51	45 sec
35	94	40 sec		72	1 min		72	45 sec
	51	1 min	1	72	10 min	1	72	10 min
	72	1 min						
1	72	10 min						

안정동위원소비 분석

DNA추출 후 남은 부위는 전처리 없이 56 °C 오븐에서 48시간 동안 건조하였다. 탄소와 질소의 안정동위원소비 분석은 원소분석기(elemental analyzer, EA)와 질량분석기(isotope ratio mass spectrometry, IRMS) 장비로 수행하였으며 분석 조건은 표 5와 같다. 안정동위원소비 분석을 위한 국제표준물질로 탄소는 benzoic acid(IAEA-601), 질소는 ammonium sulfate(IAEA-N-2), 중간점검용 표준물질로는 sulfanilamide(S15.00-0062)를 사용하였다. 안정동위원소비 분석은 모기 개체 단위로 진행하였으며, 건조된 모기는 무게를 측정하고 tin boat에 담아 밀봉한 뒤 원소분석기로 측정하였다. 측정 결과는 델타값(‰)으로 표기했으며, 계산식은 $[(R_{\text{시료}}/R_{\text{표준시료}})-1] \times 1,000$ 이고, R값은 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 또는 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 이다.

표 5. 탄소 및 질소 안정동위원소비 분석 조건(EA-IRMS)

구분		조건	구분		조건
이동가스		He	질량 분석기	특성 이온	m/z 44($^{12}\text{CO}_2$)
원소	연소 온도(°C)	1,150			m/z 45($^{13}\text{CO}_2$)
	환원 온도(°C)	850			m/z 28($^{14}\text{N}_2$)
분석기					m/z 29($^{15}\text{N}_2$)

Ⅲ. 결과 및 고찰

모기채집 결과

흰줄숲모기는 총 212마리가 채집됐으며, 총 채집수의 93.4 %인 198마리가 8월 ~ 9월에 채집되었다. 지점별 채집수는 을왕산 173마리, 국제여객터미널 26마리, 오성산 10마리, 하늘정원 3마리 순으로 을왕산에서 가장 많이 채집되었다. 반점날개집모기는 9마리가 채집되었으며, 하늘정원 4마리, 국제여객터미널 4마리, 오성산 1마리 순으로 인천국제공항 및 인천항 국제여객터미널 주변에서는 반점날개집모기 채집수가 매우 적었다.

표 6. 월별 모기 채집현황

구분			6월	7월	8월	9월	10월	합계
흰줄 숲모기	공항 주변	을왕산*	-	6	100	65	2	173
		오성산*	-	3	4	3	0	10
		하늘정원	0	0	3	0	0	3
		영종소방서	0	0	0	0	0	0
	인천항	국제여객터미널	0	0	9	14	3	26
계			0	9	116	82	5	212
반점날개 집모기	공항 주변	을왕산*	-	0	0	0	0	0
		오성산*	-	0	0	1	0	1
		하늘정원	0	0	4	0	0	4
		영종소방서	0	0	0	0	0	0
	인천항	국제여객터미널	0	0	0	4	0	4
계			0	0	4	5	0	9

*을왕산, 오성산: 7월부터 지점 추가

미토콘드리아 유전자 분석 결과

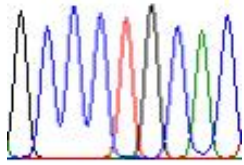
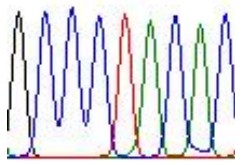
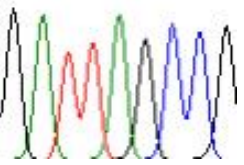
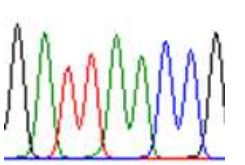
1) 흰줄숲모기

흰줄숲모기 212개체를 대상으로 미토콘드리아 유전자 중 COI을 분석한 결과, 총 4가지 유전자형(CH1~4)이 확인되었다(표 7). 우점 유전자형인 CH1은 국내에서 보고된 Genbank MG871365.1와 100 % 일치하였으며 을왕산 170개체, 오성산 10개체, 하늘정원 3개체, 국제여객터미널 26개체가 CH1 유전자형으로 총 98.6 % (209/212)를 차지하였다. 을왕산의 경우 우점 유전자형(170개체) 외 3가지 유전자형이 추가로 확인되었으며, 1건은 국내 보고 서열과 일치하는 서열(CH2, MG871384.1), 2건은 국내 기존서열과 일치율이 99.9% (CH3 및 CH4, MG871365.1 대비 염기 1개 변화)로 국내 서열과 유사하였다(표 8). ND5의 경우 212개체 모두 기존 국내에서 보고된 Genbank MG882412.1과 100% 일치하였다. 인천국제공항 및 인천항국제여객터미널 주변에 서식하는 흰줄숲모기의 COI 및 ND5 유전자형의 종류는 적었으며 기존에 보고된 국내서열과 일치 또는 유사하여 해외에서 유입된 개체는 없는 것으로 판단된다.

표 7. 흰줄숲모기 유전자 분석결과

구분		분석 개체수	COI		ND5	
			유전자형 수	유전자형 종류	유전자형 수	유전자형 종류
공항 주변	을왕산	173	4	CH1(170), CH2(1), CH3(1), CH4(1)	1	NH1(173)
	오성산	10	1	CH1(10)	1	NH1(10)
	하늘정원	3	1	CH1(3)	1	NH1(3)
인천항	국제여객터마널	26	1	CH1(26)	1	NH1(26)
계		212				

표 8. 흰줄숲모기 유사서열 정보

국내보고 COI 서열 (MG871365.1)	유사서열 1 (CH3)	국내보고 COI 서열 (MG871365.1)	유사서열 2 (CH4)
GCCCTGCAC	GCCCTACAC	GATTAGCCG	GATTAAACCG
			
GCCCTGCAC	GCCCTA A CAC	GATTAGCCG	GATTAA A CCG
염기 973번 구아닌(G) → 아데닌(A)		염기 1264번 구아닌(G) → 아데닌(A)	

2) 반점날개집모기

반점날개집모기 7개체의 COI유전자를 분석한 결과 7개 유전자형이 확인되었으며, 기존 국내에서 보고된 총 3건의 유전자 정보와 비교한 결과, 하늘정원 1건(CB-CH2, 국내보고 서열 KT358430.1와 100% 일치)을 제외한 나머지 유전자형은 국내 보고된 유전자와 서열이 유사하였다. ND5 유전자의 경우 기존에 보고된 유전자 정보가 없어 7개체의 유전자 서열 간 차이를 비교하여 총 4개의 유전자형으로 분류하였다. 흰줄숲모기와는 달리 COI과 ND5 유전자의 다양성이 높은 것을 확인하였으나 세계적으로 보고된 유전자 정보가 적어 유전자 서열간 비교 분석으로 유입여부를 확인하는데 어려움이 있어 인천지역 개체에 대한 유전자 정보 확보가 우선되어야 할 것으로 사료된다.

표 9. 반점날개집모기 유전자 분석

구분		분석 개체수	COI		ND5	
			유전자형 수	유전자형 종류	유전자형 수	유전자형 종류
공항 주변	을왕산	0	-	-	-	-
	오성산	1	1	CB-CH1(1)	1	CB-NH4(1)
	하늘정원	4	4	CB-CH1(1), CB-CH3(1), CB-CH4(1), CB-CH5(1)	3	CB-NH1(2), CB-NH2(1), CB-NH3(1)
인천항	국제여객터마널	2	2	CB-CH6(1), CB-CH7(1)	2	CB-NH1(1), CB-NH4(1)
계		7				

안정동위원소비 분석 결과

보고에 따르면 서식지에 따라 모기의 안정동위원소비에 차이가 있어 인천지역에서도 차이가 있는지를 확인하고자 실험법을 확립하고 개체 단위로 분석을 수행하였다.

1) 흰줄숲모기

흰줄숲모기 210개체 중 207개체의 안정동위원소비는 탄소($\delta^{13}\text{C}$)가 $-31.25 \sim -20.67 \%$, 질소($\delta^{15}\text{N}$)가 $-0.09 \sim 19.74 \%$ 로 확인되었으며, 3개체는 이 범위를 벗어나 산출 시 제외하였다. 특이값으로 확인된 오성산(1개체) $\delta^{15}\text{N} = 38.38 \%$, $\delta^{13}\text{C} = -20.67 \%$, 인천항 국제여객터미널(2개체) $\delta^{15}\text{N} = 22.69 \%$, $\delta^{13}\text{C} = -25.64 \%$ 및 $\delta^{15}\text{N} = 4.23 \%$, $\delta^{13}\text{C} = -19.29 \%$ 의 유전자를 분석한 결과, 국내 보고된 유전자 정보와 일치하였으나 분석된 개체수가 적어 실험오차 유무와 국내 타 지역에서의 유입여부를 확인하기 어려워 차후 누적된 데이터의 통계분석으로 지역 간 안정동위원소비의 비교를 진행할 예정이다.

그림 2. 흰줄숲모기 안정동위원소비 분석 결과

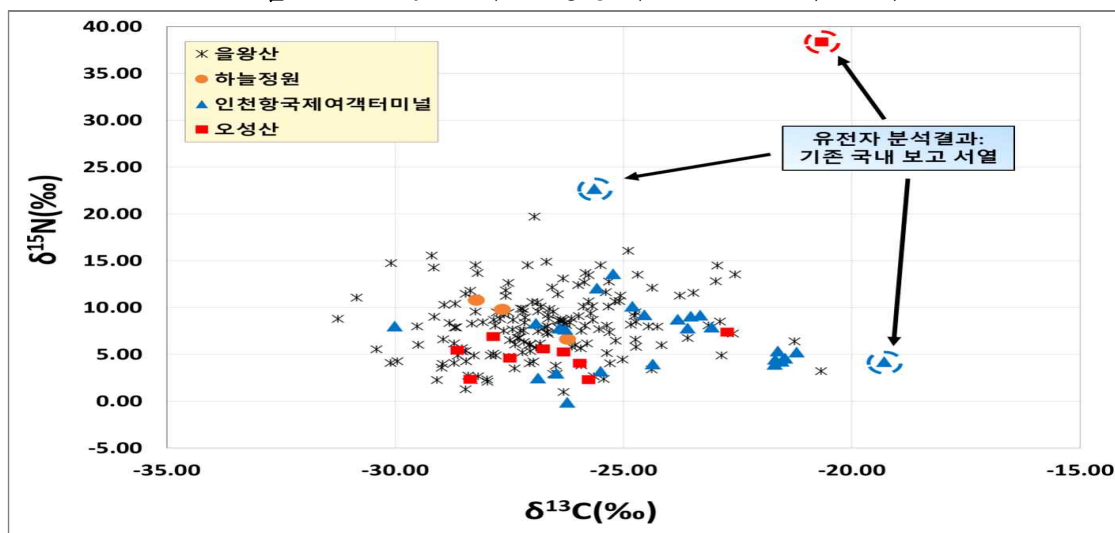


표 10. 흰줄숲모기 안정동위원소비 분석 결과

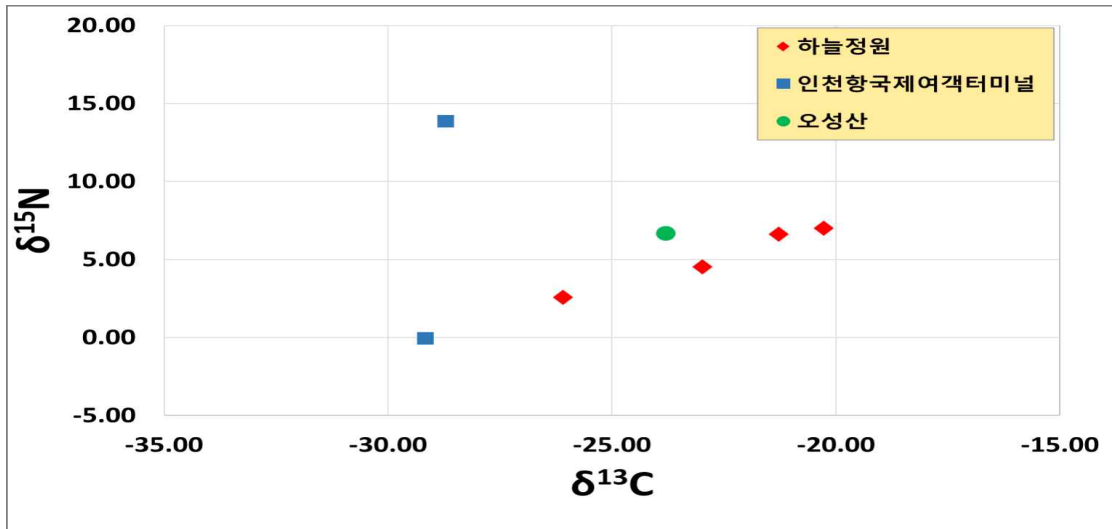
(평균±표준오차)

구분		분석 개체수	동위원소비	
			탄소: $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	질소: $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$
공항 주변	을왕산	171	$-31.25 \sim -20.67$ (평균 -26.70 ± 0.14)	$0.98 \sim 19.74$ (평균 8.14 ± 0.26)
	오성산	9	$-28.64 \sim -22.73$ (평균 -26.65 ± 0.60)	$2.3 \sim 7.38$ (평균 4.88 ± 0.59)
	하늘정원	3	$-28.22 \sim -26.22$ (평균 -27.36 ± 0.59)	$6.61 \sim 10.79$ (평균 9.06 ± 1.26)
인천항	국제여객터미널	24	$-30.01 \sim -21.21$ (평균 -24.40 ± 0.46)	$-0.09 \sim 13.63$ (평균 6.69 ± 0.67)
계		207	$-31.25 \sim -20.67$	$-0.09 \sim 19.74$

2) 반점날개집모기

반점날개집모기의 안정동위원소비는 탄소가 -29.17 ~ -20.27 ‰, 질소가 -0.02 ~ 13.87 ‰로 확인되었다. 채집 개체수가 적어 측정값 범위를 한정하기 위한 데이터가 부족한 상황으로 자료를 확보 후 지역 간 비교를 진행할 예정이다.

그림 3. 반점날개집모기 안정동위원소비 분석 결과



IV. 결론

본 연구에선 해외모기의 국내유입 가능성을 확인하기 위해 국제 공·항만 주변 모기의 미토콘드리아 유전자와 안정동위원소비를 개체 단위로 비교 분석하였다. 흰줄숲모기의 유전자를 분석한 결과, 보고된 서열 외 특이서열은 확인되지 않았으며 안정동위원소비 범위 확인에 필요한 데이터를 확보하였다. 그러나 반점날개집모기의 경우 채집 개체수가 적어 차후 데이터를 확보한 뒤 분석할 예정이다. 연구원은 지속적인 분석을 통해 새로운 유전자형의 유입을 감시하고자 하며, 차후 해외서식 모기를 확보하여 안정동위원소비 차이를 비교 분석함으로써 감염병 매개모기의 유입 여부 확인을 위한 기준을 확립하고자 한다.

V. 참고문헌

1. Lee E, Yang SC, Kim TK, Noh BE, Lee HS, Kim H, Roh JY, Lee WG. Geographical Genetic Variation and Sources of Korean *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations. J Med Entomol. 2020 Jul 4;57(4):1057-1068. doi: 10.1093/jme/tjz254. PMID: 31972007.
2. Lee SH, Nam KW, Jeong JY, Yoo SJ, Koh YS, Lee S, Heo ST, Seong SY, Lee KH. The effects of climate change and globalization on mosquito vectors: evidence from Jeju Island, South Korea on the potential for Asian tiger mosquito (*Aedes*

- albopictus) influxes and survival from Vietnam rather than Japan. PLoS One. 2013 Jul 24;8(7):e68512. doi: 10.1371/journal.pone.0068512. PMID: 23894312; PMCID: PMC3722226.
3. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci. 2003 Aug 7;270 Suppl 1(Suppl 1):S96-9. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025. PMID: 12952648; PMCID: PMC1698023.
 4. Beebe NW. DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. Parasitology. 2018 Apr;145(5):622-633. doi: 10.1017/S0031182018000343. Epub 2018 Mar 22. Erratum in: Parasitology. 2020 Jan;147(1):126. PMID: 29564995.
 5. Lee SH, Nam KW, Jeong JY, Yoo SJ, Koh YS, Lee S, Heo ST, Seong SY, Lee KH. The effects of climate change and globalization on mosquito vectors: evidence from Jeju Island, South Korea on the potential for Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) influxes and survival from Vietnam rather than Japan. PLoS One. 2013 Jul 24;8(7):e68512. doi: 10.1371/journal.pone.0068512. PMID: 23894312; PMCID: PMC3722226.
 6. Rubenstein DR, Hobson KA. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. Trends Ecol Evol. 2004 May;19(5):256-63. doi: 10.1016/j.tree.2004.03.017. PMID: 16701265.
 7. Young GB, Golladay S, Covich A, Blackmore M. Stable isotope analysis of larval mosquito diets in agricultural wetlands in the coastal plain of Georgia, U.S.A. J Vector Ecol. 2014 Dec;39(2):288-97. doi: 10.1111/jvec.12103. PMID: 25424257.
 8. Kaufman MG, Pelz-Stelinski KS, Yee DA, Juliano SA, Ostrom PH, Walker ED. Stable Isotope Analysis Reveals Detrital Resource Base Sources of the Tree Hole Mosquito, *Aedes triseriatus*. Ecol Entomol. 2010 Oct 1;35(5):586-593. doi: 10.1111/j.1365-2311.2010.01217.x. PMID: 21132121; PMCID: PMC2995505.