

국내 박쥐에서의 한탄바이러스 및 리케차에 대한 항체 조사

이재상 · 이연태

단국대학교 이공대학 미생물학과

한국 야산에서 포획한 박쥐 275수를 대상으로 형광항체법을 이용, Hantaan virus에 대한 항체 보유 여부를 조사한 바 3.6%가 양성으로 나타나 박쥐도 Hantaan virus 매개체란 사실이 세계 최초로 확인되었고 박쥐 종류별 항체 양성률을 보면 관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*)가 4.3%, 안주애기박쥐(*Vespertililio superans*)가 10%의 양성률을 보였으며 긴가락박쥐(*Miniopterus schreibersii*)와 큰수염박쥐(*Myotis mystatinus cilis*)는 음성이었다. 또한 야생박쥐의 *Rickettsia* 종류별 항체보유율은 *R. tsutsugamushi*가 3.3%, *R. typhi*가 1.8%, *R. sibirica*가 *R. sibirica*가 3.3%였으며 Thai typhus-118가 4.4%로서 가장 높은 양성률을 보였다. 이상의 성적을 종합하여 보면 국내에 서식하는 박쥐는 신증후출혈열 및 리케차의 보균동물임이 최초로 밝혀져 보고한다.

KEY WORDS □ Seroepidemiologic, Hantaan virus and *Rickettsia*, Korean bats

전세계에 서식하는 야행성 박쥐는 최초로 광견병 바이러스의 감염원으로 알려졌으며(14, 16, 17, 20), 그 외에도 arbovirus의 분리 또는 그 항체기도 입증되었다(11).

한국 전쟁중 수천명의 U.N.군에 큰 피해를 주었던 (22) 신증후출혈열(Hemorrhagic fever with renal syndrome)의 항원이 다발생지역에서 포획한 등줄쥐(*Apodemus agrarius corease*)의 폐조직으로부터 최초로 분리하여 한탄바이러스로 명명하였으며(3), 그 후 1982년 2월에 개최된 W.H.O. 서태평양지구 회의에서는 각국에서 여러 병명으로 불리우고 있는 출혈열을 신증후 출혈열로 병명을 통일하게 되었다. 그 후 여러 동물이 한탄 바이러스의 숙주 동물임을 입증하게 되었고, 동시에 이 바이러스가 구라파, 중동 및 전세계에 걸쳐 분포하고 있음도 밝혀졌다.

한편 쓰쓰가무시(*R. tsutsugamushi*)는 1951년 주한 U.N.군에서 처음 감염된 바 있고(15) 이후 1984년까지 발생보고가 없었으나, 1984년 진주에서 환자가 발생한 이래 최근에는 전국적으로 수백명씩 발생하고 있음이 보고되었다(1, 2, 5-7, 10, 12, 21). 그리고 *Rickettsia tsutsugamushi*의 세 가지 형인 Gilliam, Karp, Kato형 중에서 Gilliam과 Karp형 만이 국내에서 보고되었다. 그러므로 본 연구는 Hantaan virus와 *Rickettsia*의 자연 생활사를 다소나마 규명하기 위하여 국내 서식하는 야생박쥐 275수를 대상으로 바이러스 항체를 조사하여, 야생박쥐 체내에 한탄바이러스와 리케차의 존재를 검토하였다.

재료와 방법

한탄바이러스 주

Hantaan virus는 이와 이(3)가 분리한 76-118주를 Vero E6 cell에 계대 배양하여 TCID₅₀가 10^{3.1}인 것을 사용하였다.

리케차 주

Rickettsia 균주는 Malaysia Kuala Lumpur의 U. S. Army Medical Research Unit, Institute for Medical Research로 부터 고려대학교 의과대학 미생물학교실이 분양 받은 것을 분양받아 *R. tsutsugamushi*(Karp E53, Gilliam E167, Kata E14, *R. typhi* E3, *R. sibirica* E19와 Thai tick typhus-118 E54)를 본 실험에 사용하였다(5-8).

한탄바이러스에 대한 간접형광항체법

Vero E6 세포에 3일간 배양한 후 한탄바이러스가 76-118주를 접종하여 2시간 동안 흡착시켜 Dulbecco Modified Eagle's medium(DMEM, 10 ml; fetal bovine serum, 5 ml; 200 mM Hepes Buffer, 1 ml; Gentamycin 50 mg/ml), 0.1 ml을 가하고 37°C의 CO₂ 항온기에서 7일간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 pH 7.4 인산염완충액(Phosphate buffer saline)으로 세척한 다음 trypsin 처리 후 수확한 감염된 세포를 spot slide에 고정하여 항원으로 사용하였다. 간접면역 형광항체법은 항원 슬라이드를 acetone으로 10분간 고정하고 각각의 박쥐 혈청을 항원에 20 μl 가하고 37°C 30분간 반응시킨 후 인산염완충액으로 5분간 세척하고 FITC(fluorescein isothiocyanate) conjugated goat anti-mouse IgG (cooperat 제품)를 8 unit 희석하여 각 well에 20 μl씩 가하고 37°C분간 반응시킨 후 인산염완충액으로 세척하고 건조시켰으며 polyvinyl alcohol mounting medium을 가한 후 뒷개유리를 덮고 형광현미경으로 관찰하였다.

리케치아에 대한 간접 형광항체법

종자균주들(20% 난황낭 부유액)을 5-7일된 부화란의 난황낭에 0.1 ml/씩 접종하고 35°C 부화기에서 일정기간 부화시킨 후 난황낭막을 채취하였다. 채취한 난황낭막의 일부를 슬라이드 글라스에 도말하고 *R. tsutsugamushi*는 Giemsa염색법 그리고 *R. typhi*, *R. sibirica*는 Gimenez 염색법으로 염색하여 균의 증식을 판별하였다.

Omnimixer(Dupont Instruments)로서 10,000 rpm으로 1분씩 3회 처리하고 20% 용액으로 만든 다음 10분간 800 rpm으로 원침시켰다. 중층액을 채취하여 slide glass에 일정량씩 도말하여 항원으로 사용하였다.

항체검사 방법은 한탄바이러스에 대한 간접면역형광항체법과 동일하게 실시하였다(18).

결과 및 고찰

한탄바이러스의 감염

한탄바이러스의 감염이 등줄쥐(3)에서 발견된 바 있으나 야생박쥐에서의 한탄바이러스 항체의 유무에 대해서는 조사한 바 없다. 그러므로 본 실험에서는 한탄바이러스가 한국산 야생박쥐에도 감염되는가의 여부를 조사하기 위하여 시행하였으며, 그 결과 전북, 충남, 강원에서 포획한 전체 야생박쥐의 3.6%(275수

중 10수)가 한탄바이러스의 보균동물임을 처음으로 밝혔다.

Vero E6 세포에 증식한 한탄 바이러스를 항원으로 사용하여 박쥐 혈청과 반응시키고 FITC-표식 항체와 2차 반응을 통하여 한탄 바이러스에 대한 항체실험을 간접면역형광항체법으로 관찰했다(Fig. 1).

박쥐의 종류별로는 관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*) 4.3%(209수 중 9수)가 양성이었고, 안주애기박쥐(*Vespertilio superans*)는 10%(10수 중 1수)가 양성이었으며, 긴가락박쥐(*Miniopterus schreibersii*)와 큰수염박쥐(*Myotis mystatinus cilis*)에서는 모두 음성이었다(Table 1).

지역별로는 전북에서 채집한 198수 중 8수가 항체를 보유하고 있어 4.0%의 양성률을 보였으며 충남에서 채집한 41수 중 2수가 항체를 갖고 있어 4.9%의 양성률을 보였으나 강원도에서 채집한 36수는 모두 음성이었다(Table 2). 지역별로 채집한 박쥐의 종류와 수가 일정치 않아 통계적 의미는 미약하다.

남미나 미국에서 박쥐에 물린 사람 및 동물들이 광견병에 감염되어 문제를 일으키자 박쥐가 어떤 병

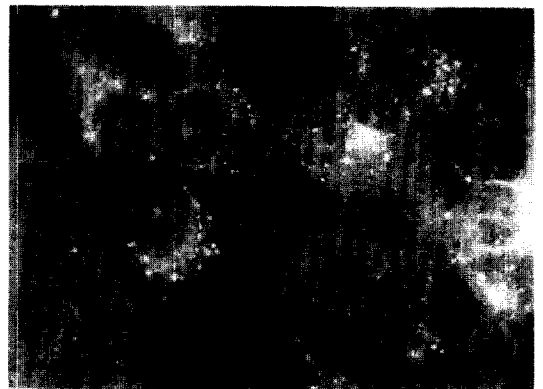


Fig. 1. Hantaan viral antigen in vero E6 cells stained by the indirect immunofluorescent antibody technique($\times 1,000$). Note the fluorescent granules located in the cytoplasm.

Table 1. Serum IFA positive rate by the species to Hantaan virus in wild bats.

Species (bats)	*IFA rate	No. of positive (%)
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	9/209	(4.3)
<i>Vespertilio superans</i>	1/10	(10.0)
<i>Miniopterus schreibersii</i>	0/48	(0.0)
<i>Myotis mystatinus cilis</i>	0/8	(0.0)
Total	10/275	(3.6)

*Immunofluorescence antibody

Table 2. Serum IFA titers of Hantaan virus in wild bats by trapping area

Province	Species	IFA titer				No. of positive (%)	
		16	64	256	1024	No. of examined	(%)
Chunbuk	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	5	1	0	1	7/132	(5.3)
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	0	0	0	0	0/48	(0.0)
	<i>Vespertilio superans</i>	1	0	0	0	1/10	(10.0)
	<i>Myotis mystatinus cilis</i>	0	0	0	0	0/8	(0.0)
Chungnam		0	0	2	0	2/41	(4.9)
Kangwon	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	0	0	0	0	0/36	(0.0)
Total	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	6	1	2	1	10/275	(3.6)

Table 3. Serum IFA titers to *Rickettsia* infected in the wild bats

Rickettsia strain	IFA titer		No. of positive (%)	
	16	64	No. of examined	(%)
<i>R. tsutsugamushi</i>	6	3	9/275	(3.3)
<i>R. typhi</i>	5	0	5/275	(1.8)
<i>R. sibirica</i>	7	2	9/275	(3.3)
Thai tick typhus-18	9	3	12/275	(4.4)
Total			27/275	(9.8)

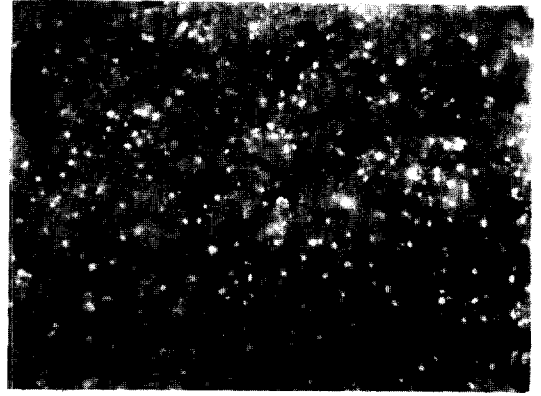
원균을 보유한다는 의심을 갖게 되고 박쥐로부터 광견병의 병원체를 분리하게 되어 박쥐가 광견병 바이러스의 보균동물(reservoir)이라는 사실이 밝혀지자 보균동물을 차단함으로써 감염을 예방하게 된 것이다 (14).

그 후 박쥐가 어떤 arbovirus를 매개할 것이라는 가정 하에서 박쥐에서 arbovirus를 분리하려는 학자들이 관심을 가지고 박쥐를 대상으로 바이러스 보유 유무를 연구하기 시작했다(22, 24).

그리고 감염 virus는 박쥐 체내에서 불현성 감염으로 증식하여 자연계에 바이러스 보유체로서의 역할을 할 것으로 생각되어(23), 박쥐에서의 각종 바이러스의 역학적 기전을 규명하는 연구가 많이 실시되었다.

우리나라의 신증후출혈열 환자 다발발생지역에는 9종의 야생쥐들이 서식하고 있는데, 이 중 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)가 한탄바이러스의 자연계 숙주 동물임이 증명되었다(3). 그리고 등줄쥐가 서식하지 않는 대도시에서 발생하는 신증후출혈열의 숙주동물은 집쥐로 밝혀졌다(4).

우리나라에서 출혈열 환자가 유행하는 시기는 바람이 많이 부는 건조기의 4, 5, 6월로 야외에서 일을

**Fig. 2.** *Rickettsia tsutsugamushi* Karp in yolk sac of embryonated hen's egg stained by indirect immunofluorescent antibody technique (X400). Note the fluorescent granules located in the cytoplasm.

많이 하는 시기이다. 등줄쥐가 먹이를 찾아 논밭에서 활발히 활동하기 때문에 병원체가 동물의 타액, 소변, 대변을 통해 다량 분비됨으로 이 계절에 환자 발생이 많다고 한다. 그리고 박쥐는 날아다니기 때문에 광범위한 지역에 한탄바이러스를 등줄쥐보다 빠른 속도로 전파할 수 있다.

박쥐가 한탄바이러스의 항체를 보유하고 있다는 보고는 아직 없었다.

그러나 본 연구에서는 국내에서 포획한 275수의 박쥐에서 Hantaan virus 항체가 보유율은 3.6%로서 박쥐가 항체를 가지고 있다는 사실이 최초로 밝혀졌다.

리케치아의 감염

각 지방에서 포획한 야생박쥐 275수에 대하여 리케치아의 감염 여부를 확인하기 위하여 간접면역 형광

Table 4. Serum IFA titers of *Rickettsia* in wild bats by trapping area

Province	Species	IFA titer		No. of positive (%)		
		16	64	No. of examined	(%)	
Chunbuk	<i>R. tsutsugamushi</i>	4	3	7/198	(3.5)	
	<i>R. typhi</i>	1	0	1/198	(0.5)	
	<i>R. sibirica</i>	1	1	2/198	(1.0)	
	Thai tick typhus-118	0	1	1/198	(0.5)	
Chungnam	<i>R. tsutsugamushi</i>	2	0	2/41	(4.9)	
	<i>R. typhi</i>	3	0	3/41	(7.3)	
	<i>R. sibirica</i>	5	1	6/41	(14.6)	
	Thai tick typhus-118	7	2	9/41	(22.0)	
Kangwon	<i>R. tsutsugamushi</i>	0	0	0/36	(0.0)	
	<i>R. typhi</i>	1	0	1/36	(2.8)	
	<i>R. sibirica</i>	1	0	1/36	(2.8)	
	Thai tick typhus-118	2	0	2/36	(5.6)	
Total			27	8	35/275	(8.4)

항체법으로 리케치아의 항체실험을 실시한 결과 Table 3과 Fig. 2와 같다. *R. tsutsugamushi* 3.3%(275수 중 9수), *R. typhi* 1.8%(275수 중 5수), *R. sibirica* 3.3%(275수 중 9수), Thai tick typhus-118 4.4%(275수 중 12수)의 양성률을 나타냈다. 지역별 박쥐의 항체 양성률은 충남이 48.8%(41수 중 20수), 강원 11.1%(36수 중 4수), 전북이 5.5%(198수 중 11수)로서 가장 낮고 충남이 48.8%로 가장 높았다(Table 4).

한편, 항원의 존재 유무를 조사하기 위해 일정기간 배양된 난황막(yolk sac)을 채취하여 슬라이드 글라스에 도말하여 *R. tsutsugamushi*는 Giemsa 염색법, 그리고 *R. thphi*, *R. sibirica*는 Giemenez 염색법으로 염색하여 균의 증식을 판별하였다.

리케치아는 야생쥐와 집쥐가 숙주동물이며 이들에 기생하는 진드기, 이, 벼룩 등이 매개체로 사람에게 전파된다.

우리나라에서는 1911년 발진티브스(epidemic typhus)가 처음 보고되었고, 1951년에 쓰쓰가무시병(scrub typhus), 1959년에 발진열(murine thphus)의 환자가 발생하였다(8, 13, 17).

그러나 1968년부터 1948년까지는 환자 발생이 없는 것으로 보고되었으나 이는 무관심한 결과로 생각되며 1985년부터 다시 많은 환자가 발생하고 있다.

우리나라에서 발생하는 리케치아 환자는 쓰쓰가무시병과 발진열 이외에도 시베리아 홍반열(Siberian tick typhus)이 발생하고 있음을 혈청학적으로 증명하였다(2, 19).

박쥐가 한탄바이러스와 리케치아에 대한 항체를 보유하고 있다는 사실이 최초로 밝혀졌으므로 박쥐에 대한 연구가 계속 수행되어야 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 박희상, 전종휘, 1988. 가을에 유행하는 서족 관련 발열성 감염증, 특히 부산, 경남지역 발생 현황, 감염, 20, 247-267.
2. 백낙주, 송진원, 이호왕, 1989. 1988년 한국에서 혈청학적으로 확인된 신증후출혈열 및 Rickettsiosis 환자, 대한바이러스학회지, 19, 117-125.
3. 이호왕, 이평우, 1976. 한국형 출혈열 I. 원체와 항체 증명, 내과학회지, 19, 371-376.
4. 이호왕, 주용규, 1987. 한국 집쥐 및 들쥐의 Hantaan virus, Rickettsia 및 Leptospira에 대한 항체 역학적 조사, 대한미생물학회지 초록, 22, 371.
5. 장우현, 강재승, 1981. 환자에서 *Rickettsia tsutsugamushi*의 분리, 대한학회지, 30, 999-1008.
6. 장우현, 강재승, 최인희, 박경희, 최명식 외 13, 1987. 혈청학적으로 진단된 1986년도 *Rickettsia* 질환의 발생양상, 대한내과학회잡지, 33, 604-612.
7. 장우현, 1988. 우리나라 쯔쯔가무시병의 발생 양상과 *R. tsutsugamushi*의 원형의 분포, 대한의학협회지, 31, 601-607.
8. 전종휘, 1975. 한국 급성 전염병 개관. 최신의학사 발행, p. 118.
9. 전종휘, 정희영, 1960. 처음으로 확인된 발진열의 3예, 대한내과학회지, 2, 429-433.

10. 정희영, 1986. 쯔쯔가무시병의 역학, 감염, 18, 85-89.
11. Berge, T.O., 1975. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 2nd ed., W.A. Benjamin, Inc. London, pp. 1-789.
12. Brown, G.W., D.M. Robinson and D.L. Huxsoll, 1978. Serologic evidence for a high incidence of transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in two organ sali settlements in peninsular Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 121-124.
13. Chung, H.Y., 1988. Historical review of rickettsiosis in Korea. The 15th international symposium of rickettsial disease, Seoul, Korea.
14. Courter, R.D., 1954. Bat rabies. Public Health Report, 69, 9-16.
15. Jackson, E.B., J.X. Danauskas, J.E. Smadel, H.S. Fuller, M.C. Coale and F.M. Bozeman, 1957. Occurrence of *Rickettsia tsutsugamushi* in Korean rodents and chiggers. *Am. J. Hyg.* 66, 30.
16. Kent, J.R. and S.M. Finegold, 1960. Human rabies transmitted by the bite of a bat. *New England J. Med.*, 263, 1035-1065.
17. Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st ed. Williams and Wilkins, pp. 694-684.
18. Nairn, R.C. ed. 1980-1984. Practical methods in Clinical Immunology Series. Churchill Livingstone, Edinburgh.
19. Ormsbee, R., M. Peacock, R. Philip, E. Casper, J. Plorde, K. Gabre and L. Wright, 1988. Antigenic relationships between the typhus and spotted fever groups of *Rickettsiae*. *Am. J. Epidemiol.* 108, 53-58.
20. Sheperd, R.C. and M.C. Williams, 1964. Studies on viruses in East African bats(Chiroptera). I. Hemagglutination inhibition and Circulation of Arboviruses *Zoos. Res.*, 3, 125-139.
21. Shiri, A., A.L. Dohany, S. Ram, G.L. Chiang and D.L. Huxsoll, 1981. Serological classification of *Rickettsia tsutsugamushi* organisms found in chiggers. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Myg.* 75, 580-582.
22. Smadel, J.E., 1953. Epidemic hemorrhagic fever. *Am. J. Pub. Health.* 43, 1327-1330.
23. Sulkin, S.E. and R. Allen. 1964. Studies of arthropod-borne virus infection in *Chiroptera*. I. Susceptibility of insectivorous species to experimental infection with Japanese B and ST. louis encephalitis viruses in Osaka City: First cases found in Japan with characteristic feature of marked proteinuria. *Biken J.* 7, 79-84.
24. Sulkin, S.E., R. Sims and R. Allen. 1964. Studies of arthropod-borne virus infections in *Chiroptera*. II. Experiments with JEV and ST. Louis encephalitis virus in the Gravid bat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 475-481.

(Received February 11, 1992)

(Accepted March 3, 1992)

ABSTRACT: Detection of Antibodies in Korean Bats to Hantaan Virus and Rickettsiae

Lee, Jae-Sang and Yun-Tai Lee (Department of Microbiology, College of Sciences and Engineering, Dan-Kook, University, Seoul, Korea)

A total of 275 wild bats captured in Korea were examined on the possibility that they will harbor and spread the infectious pathogens of Hantaan virus and Rickettsia. They possessed antibodies in 3.6% blood sera against Hantaan virus by the indirect immunofluorescence technique and showed relatively high serum titers with a range of 16 to 1024X, whereas 12.7% of them were positive to Rickettsia, dividing into 3.3% against *R. tsutsugamushi*, 1.8% against *R. siberica tick typhus*, and 4.4% against *R. thai tick typhus*, respectively. It was first confirmed in Korean wild bats that are infected with Hantaan virus and Rickettsia agents, and play a role as vector.