

경남지역 야생들쥐에서 *Orientia tsutsugamushi*에 대한 항체 조사 및 PCR에 의한 검색

하대식¹ · 김영훈¹ · 박정웅¹ · 박재갑¹ · 김충희² · 류재두³ · 정명호⁴ · 허정호⁴ · 서종립⁴
조명희⁴ · 이국천⁴ · 김곤섭 · 김의경 · 김종수*

경상대학교 수의과대학 농업생명과학원

¹경남보건환경연구원

²진주산업대학교 동물생명과학과

³국립수의과학검역원 부산지원

⁴경남축산진흥연구소 남부지소

(제재승인: 2004년 4월 21일)

Survey of antibody on *Orientia Tsutsugamushi* among wild rodents in Gyeongnam area and detection by nested polymerase chain reaction

Dae-Sik Hah¹, Young-Hoon Kim¹, Jung-Ung Park¹, Jae-Kap Park¹, Chung-Hui Kim²,
Jae-Doo Ryu³, Myung-Ho Jong⁴, Jung-Ho Heo⁴, Jong-Lip Shu⁴,
Myung-Heui Cho⁴, Kuk-Cheon Lee⁴, Gon-Sup Kim, Eui-Kyung Kim, and Jong-Shu Kim*

Agriculture & Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Gyeongnam Provincial Government Institute of Health and Environment, Changwoon 641-825, Korea

²Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

³National Veterinary Research and Quarantine service Busan Regional Office, Busan 602-030, Korea

⁴Gyeongnam Livestock Promotion Institute South-branch, TongYoung 650-817, Korea

(Accepted: April 21, 2004)

Abstract : As a part of epidemiologic investigation of *tsutsugamushi* disease, the wild rodents which were captured in Gyeongnam area were diagnosed with indirect immunofluorescent antibody assay (IFA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) to find if they have an antibody against *Orientia tsutsugamushi*. The conclusion was drawn as followings. (1) The captured 58 wild rodents showed that the subspecies distribution of *Apodemus agrarius* was 86.2%, *Microtus fortis* was 8.6% and *Crocidura lasiura* was 5.2%. (2) The antibody positive rate of *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kart and Boryong by IFA method was 32.0% in *Apodemus agrarius* among 50 wild rodents and 40.0% in *Microtus fortis* among 5 wild rodents, respectively. It was negative in the case of all the 3 *Crocidura lasiura*. (3) The antibody titers on *Apodemus agrarius*, *Microtus fortis* and *Crocidura lasiura* against Gilliam, Karp, Kart and Boryong were measured between 1:20 and 1:640. The antibody titer against each antigen was in the order Boryong>Gilliam>Karp. (4) *O. tsutsugamushi* was detected from the blood, spleen and kidney from the artificially infected mice by IFA and PCR. IFA showed the positive response between 3 and 18 days after inoculation. On the other hand, positive response was found from all the samples by PCR. (5) From PCR of the genomic DNA extracted from the blood, spleen and kidney samples of the captured wild rodents, Boryong-specific amplification product with size of 210 bp, which is particular in Boryong, was detected from spleen and kidney samples, but not detected in the blood. (6) Boryong-specific amplification product was detected from spleen and kidney samples which were obtained at 3, 6, 12, 18 and 24 days after the infection with Boryong.

*Corresponding author: Jong-Shu Kim

Agriculture & Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[Tel: 82-55-751-5821, Fax: 82-55-751-5803, E-mail: jskim@gsnu.ac.kr]

But, it wasn't detected from the uninfected samples. (7) From PCR of spleen and kidney samples of the captured wild rodents, it was found that positive rate of *O. tsutsugamushi* in *Apodemus agrarius* and *Microtus fortis* were 25.0% (4/16) and 20.0% (1/5), respectively. From the above results, it can be concluded that *Apodemus agrarius* resided in Gyeongnam area carried *O. tsutsugamushi* and PCR method might be a simple, precise, rapid and useful diagnostic tool than IFA for the diagnosis of *O. tsutsugamushi*.

Key words : Orientia, thutsugamushi, PCR, Gilliam, Boryong

서 론

종래 *Rickettsia tsutsugamushi*로 불려졌던 *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*)는 $0.3 \times 1.2 \mu\text{m}$ 정도의 편성 세포 기생성 간균으로서 텔 진드기의 유충이 사람의 조직액을 흡입할 때 감염되며, 권태, 두통 등의 전구 증상 후 근육통, 림프절증장, 피부발진 등을 일으킨다. *Rickettsia* 속 균은 숙주 동물에 질병을 일으키는 양상, 그리고 균을 전파하는 매개충의 종류 및 생물학적 성상에 따라 typhus 균, spotted fever 균, scrub typhus 균으로 분류된다 [7, 31].

Scrub typhus 균에는 단일 종인 *O. tsutsugamushi*가 속해 있으며, 혈청형 특이 항원이 서로 다른 Gilliam, Kato 및 Karp의 세 가지 원형 균주로 분류되며 [29], 현재 이를 3원형 균주는 진단항원 제작과 연구에 표준 균주로 사용되고 있다 [13, 15]. 이 3 혈청형 이외에 아시아 지역에서는 Karp 혈청형과 성격이 비슷한 RA686, RA716, RA763, TH1817 및 TA678의 5가지 혈청형이 있는 것으로 알려져 있다 [25]. 최근 일본에서도 세 가지 원형 균과 혈청학적 반응양상이 다른 새로운 혈청형으로 Kawasaki, Kuroki 및 Shimokoshi 등이 보고되었다 [28]. 국내에서는 Gilliam과 Karp 혈청형 외에 기존에 알려진 원형 균주와는 혈청학적 반응양상이 다른 Boryong 주가 분리되고 있다 [14].

쓰쓰가무시병의 진단에는 환자의 혈액으로부터 *O. tsutsugamushi*를 분리하는 방법 [8]과 환자의 혈청 내에서 항체를 증명하는 방법 [9-11] 및 중합 효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 환자의 혈액 내에서 DNA를 검사하는 방법 등이 있다 [16, 20, 21, 24]. 이 중 균체를 배양하여 질병을 진단하는 방법은 균 배양 시간이 4주 이상 요구되므로 실제 환자의 조기 진단 목적으로는 부적합하고, 혈청학적 진단법은 검사방법에 따라 기술적인 까다로움, 위음성 (pseudo negative), 위양성 (pseudo positive), 재현성 및 특수한 장치의 필요성 등의 문제점이 있다. 중합효소연쇄반응은 리اكت치아 혈증을 보이면서 항체가 형성되지 않는 감염초기에도 환자의 혈액내에 소량의 균체만 있어도 균의 존재를 정확히 진단할 수 있는 장점이 있다 [20].

*O. tsutsugamushi*에는 지당체나 다당체가 없으므로 대

부분의 항원 성분은 단백질인 것으로 밝혀져 있다 [5, 12, 18, 23]. 혈청형의 다양성을 결정짓는 *O. tsutsugamushi*의 세포막 단백항원에는 종 특이 항원과 혈청형 특이 항원 등이 있으며, *O. tsutsugamushi*를 정제한 항원을 polyacrylamide 젤 전기영동과 immunoblotting으로 분석 하면 110-120, 58-60, 54-56, 46-47, 20-22 kDa 단백질의 주요 항원이 존재한다. 이 중 22 kDa, 46-47 kDa, 54-56 kDa, 120 kDa의 단백질이 항원성을 가지고 있으며, 54-56 kDa 단백질은 혈청형 특이 항원으로 알려져 있다 [17, 27]. 한편 *O. tsutsugamushi* 균체를 trypsin으로 처리하면 lymphocyte에 침투하는 능력이 소실된다는 사실에서 세포 표면 항원과 *O. tsutsugamushi*의 병원성 사이에는 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며, *O. tsutsugamushi*에 대한 방어면역이 혈청형에 특이한 점으로 보아 57-56 kDa 단백질은 방어면역의 유발에도 중요한 역할을 하는 것으로 추정하고 있다 [30].

우리나라에서 쓰쓰가무시병은 농촌을 중심으로 많은 환자가 발생하며 신증후출혈열, 렘토스피라증, 빨진열과 함께 가을에 유행하는 대표적인 급성발열성질환의 하나로 주목을 끌고 있는 질병이다. 장과 강 [8], 장 등 [9-11]은 환자의 혈청에서 쓰쓰가무시균의 분리 및 혈청역학 조사를 하였고, 신 등 [5], 노 등 [2], 기 등 [1], 이 [6], 박 등 [3]은 농촌지역에서 계절별 지리적 매개 진드기의 분포를 조사하고 하였으며, 백 등 [4]은 경기도와 강원도에서 야생들쥐의 리اكت치아 감염 실태를 조사한 바 있으나 이들의 조사는 주로 중·북부 지방에서 이루어졌고, 경남일대에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 쓰쓰가무시병에 대한 역학적 특성을 연구 할 목적으로 경상남도 일대에서 포획한 들쥐의 *O. tsutsugamushi*에 대한 항체보유 상황을 조사하고, 혈청과 장기에서 Indirect immunofluorescent antibody assay (IFA)법과 PCR법으로 비교 검사하였다.

재료 및 방법

쓰쓰가무시병 매개 야생들쥐의 분포 조사

야생들쥐는 2001년과 2002년 10월부터 12월까지 2회에 걸쳐 경남지방의 쓰쓰가무시병 다발지역을 중심으로 Chemał식 Wooden trap ($20 \text{ cm} \times 8 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$)을 [30] 변

형하여 제작한 스텐레스 trap을 사용하여 살아 있는 상태로 포획하였다. 이 쥐덫은 쥐가 들어가서 먹이를 건드리는 순간 입구 문이 폐쇄되면서 쥐가 갇히도록 고안된 trap으로 해가 지기전 야산, 들, 풀숲 등 야생 들쥐가 서식할 만한 장소에 설치하였으며, 포획된 들쥐는 다음날 아침에 살아 있는 상태로 실험실로 옮겼다.

야생들쥐의 IFA법에 의한 *O. tsutsugamushi*에 대한 항체 조사

항체 조사는 간접면역형 광항체법에 따라 실시하였다 [1]. *O. tsutsugamushi* Karp, Kato, Gilliam 및 Boryong주를 항원으로 사용하여 항원슬라이드를 acetone으로 고정하고 공기 중에서 건조한 후 U-bottom 96 well microtititer plater에 PBS로 1:10배 희석한 혈청 25 µl를 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS, 중류수 순으로 조심스럽게 세척 하였다. 건조 후 1:32로 희석한 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (ICN Co., USA)를 각 well에 25 µl씩 가하여 동일한 방법으로 2차 반응시키고 앞의 방법과 같이 세척, 건조하여 mounting media (Sigma, USA)로 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다. 항체 양성 판정은 Gilliam, Karp, Karto, Boryong 중에서 1주 이상이 양성을 보이는 것으로 하였고, 반응이 분명하게 관찰되는 최대 혈청희석 배수의 역수를 항체가로 정하였고, 1:10 이상의 역기를 보이는 것을 양성으로 판정하였다.

*O. tsutsugamushi*의 인공감염 시험

국립보건원에서 분양 받은 쪽쪽가무시의 Boryong주를 경상대학교에서 생산하는 4주령 이상 ICR mouse를 암수 구분없이 분양받아 체중에 따른 아치사량(Sublethal dose, 5×10^4 infected cell units [ICU])을 계산하여 복강내로 접종하였고, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 접종 후 혈액, 비장, 신장을 3, 6, 12, 18 및 24일에 채취하였으며, 1군당 3마리를 사용하였다. 대조군으로 생리식염수를 복강내 투여한 것을 사용하였다.

장기적출 및 혈청분리

실험실로 옮겨진 야생들쥐와 인공 감염시킨 ICR mouse를 ether로 마취하고 심장 채혈한 다음 신장과 비장을 무균적으로 적출하였다. 혈액은 DNA 검출용과 혈청분리용으로 나누었고, 신장과 비장은 PBS(0.1 M; pH 7.2)로 깨끗이 세척하여 -70°C에 보관하였다.

야생들쥐 및 인공감염 mouse 장기로부터 DNA 추출

야생들쥐 및 인공감염 mouse에 대한 *O. tsutsugamushi*

DNA의 검색은 기 등 [1]의 PCR법 [1, 2, 4, 6, 19, 26]과 Furuya 등 [16]이 개발한 PCR법을 변형하여 사용하였다. 58마리의 야생들쥐로부터 혈액, 비장 및 신장을 채취하여 DNA를 추출하였으며, 이때 가검물간의 교차 오염을 방지하기 위하여 모든 시약 및 기구는 1회용과 멀균 처리된 것을 사용하였다. DNA 추출은 spin column method (QIAamp Tissue kit, Blood Mini kit, QIAGen Inc. Germany)를 사용하여 -70°C에 보관된 조직을 25 mg 정도의 작은 조각으로 잘라서 microcentrifuge tube에 넣고 Buffer ATL 180 µl와 Proteinase K를 20 µl 첨가한 후, vortexing하고 조직이 완전히 용해될 때까지 55°C shaking water bath에 정 치하였다. 용해가 끝난 용액을 15초간 vortexing하고 Buffer AL 200 µl 첨가하여 다시 vortexing 한 후 70°C shaking water bath에서 10분간 정 치하였고, ethanol 200 µl를 첨가하여 vortexing 하였다. DNeasy spin column을 2 ml collection tube에 놓고 위의 혼합용액을 가하고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 column을 통과한 용액과 collection tube를 버리고 DNA가 포획된 DNeasy spin column을 새로운 2 ml collection tube에 취한 다음 Buffer AW1 500 µl을 첨가한 후 1분간 원심분리하여 column을 통과한 용액과 collection tube를 버렸다. DNeasy spin column을 새로운 2 ml collection tube에 취하고 Buffer AW2 500 µl를 첨가한 후 3분간 원심분리하여 DNeasy membrane을 건조시켰다. 다음 DNeasy spin column을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮기고 Buffer AE 200 µl를 DNeasy membrane에 넣고 상온에서 1분간 정 치한 후 1분간 원심분리하여 추출한 DNA를 template DNA로 사용하였다.

PCR 분석

PCR oligonucleotide primer는 Furuya 등 [16]에 의해 고안된 nested PCR 방법을 약간 변형하여 사용하였다 (Table 1). 일차 PCR 분석은 10×PCR buffer 5 µl [100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 1 ng의 template DNA, 200 µM dNTPs, 각 혈청형 공통적

Table 1. Primer sequences used for nested PCR

First PCR

forward (R56f) : 5'-ATT-GCT-AGT-GCA-ATG-TCT-GC-3'
reverse (R56r) : 5'-CTT-CTT-GCG-CTG-TAG-CTT-GA-3'

Second PCR

forward (R56c) : 5'-CAG-CCT-ACT-ATG-AGT-CCT-AT-3'
reverse :

B/K(Boryong) : 5'-CAC-CGG-ATT-TAC-CAT-CAT-AT-3'
KP(Karp) : 5'-ACA-ATA-TCG-GAT-TTA-TAA-CC-3'
KT(Karto) : 5'-GGA-ATA-TTT-AAT-AGC-ACT-GG-3'
GM(Gilliam) : 5'-CTT-TAT-ATC-ACT-ATA-TAT-CTT-3'

인 3' (R56r) 및 5' 말단 primer (R56f)를 각각 10 pmol 씩 가하고, Taq DNA polymerase (Bioneer Co., Korea)를 2 unit 넣고 최종 반응부피를 50 μl로 하여 thermal cycler (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 2400, USA)로 시료 DNA를 증폭하였다. 이 때 증폭횟수는 총 30 cycle로 하였으며, 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 30초간 extention 순으로 반응시켰으며, 최후 반응 후 72°C에서 7분간 반응시켜 최종 PCR산물의 연장을 유도하였다. 이차 PCR은 template DNA로 일차 PCR에서 얻은 산물을 3 μl, 10×PCR buffer 5 μl, 200 μM dNTPs, 각 혈청형에 공통적인 5'말단 primer (R56c)와 3'말단 primer는 각 혈청형에 특이한 primer들을 각각 20 pmol 씩, Taq는 2 unit 넣고 최종 반응부피를 50 μl로 하여 PCR을 실시하였다. 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 60°C에서 2분, 30초, 72°C에서 3분 30초로 25 cycle 반응시키고, 최후 반응 후 72°C에서 7분간 반응시켰다. 각 반응 시마다 음성 대조군으로 template DNA 대신 증류수를 사용하였으며, 교차 오염을 예방하기 위해 aerosol resistant micropipet tip을 사용하였다.

전기영동

증폭된 DNA 5 μl에 6배 농도의 loading buffer (0.03% bromophenol blue, 30% glycerol, 30 mM EDTA, 0.03% xylene cyanol) 1 μl을 혼합한 뒤 0.002% ethidium bromide 를 첨가하여 제작한 1% horizontal agarose minigel로 전기영동 하였다. standard molecular weight marker (Takara Co., Japan) 100 bp, 200 bp 및 20 bp DNA Ladder와 함께 증폭된 DNA 절편을 확인하였다.

결 과

야생들쥐의 종별 분포

2001년과 2002년 10월부터 12월까지 두번에 걸쳐 경남지방에서 포획한 야생들쥐의 종별 분포는 Table 2와 같이 총 58마리 중 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)가 50마리(86.5%)로 가장 많았고, 맷쥐(*Crocidura lasiura*)가 3마리(5.2%), 갈밭쥐(*Microtus fortis*)가 5마리(8.6%)이었다.

경남지방 야생들쥐의 *O. tsutsugamushi*에 대한 항체 양성을

O. tsutsugamushi Gilliam, Karp, Kart, Boryong주에 대한 IFA법에 의한 항체 양성을 Table 3과 같이 등줄쥐에서는 50마리 중 16에에서 항체가 검출되어 32.0%의 양성을 나타내었고, 지역별로 보면 밀양시에서 46.2%, 의령군 40.0%, 창녕군 41.7%, 함양군 50.0%이었다. 갈

Table 2. Species of wild rodents trapped in Gyeongnam area from 2001 to 2002

Locality	No. of tested rodents	No. of rodents trapped (%)		
		<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Crocidura lasiura</i>	<i>Microtus fortis</i>
Miryang	15	13(86.7)	1(6.7)	1(6.7)
Uiryeong	6	5(83.3)	0	1(16.7)
Changnyeong	15	12(80.0)	1(6.7)	2(13.3)
Goseong	8	8(100)	0	0
Hamyang	7	6(85.7)	0	1(14.3)
Hapcheon	7	6(85.7)	1(14.3)	0
Total	58	50(86.2)	3(5.2)	5(8.6)

Table 3. Detection rates of antibody positive on *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Boryong by IFA

Miryang	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Crocidura lasiura</i>	<i>Microtus fortis</i>
Miryang	6/13(46.2) ^a	0/1	1/1
Uiryeong	2/5(40.0)	0/0	0/1
Changnyeong	5/12(41.7)	0/1	1/2
Goseong	0/8	0/0	0/0
Hamyang	3/6(50.0)	0/0	0/1
Hapcheon	0/6	0/1	0/0
Total	16/50(32.0)	0/3	2/5(40.0%)

a. No. of positive rodents / No. of tested rodents(%)

밭쥐에서는 밀양시와 창녕군에서 5마리 중 2마리(40.0%)에서 양성을 보였고, 땃쥐에서는 3마리 모두 음성 반응을 나타내었다.

야생들쥐의 *O. tsutsugamushi*에 대한 항체가 등줄쥐, 땃쥐, 갈밭쥐의 Gilliam, Karp, Kart, Boryong 주에 대한 immunofluorescent antibody assay(IF)법에 의한 항체가는 Table 4와 같이 1:20에서부터 1:640까지 다양하게 나타났으며, 항체가는 Boryong 주에서 대체로 높게 나타나는 반면, Gilliam 주에서는 중간 정도로, 그리고 Karp 주는 낮게 나타났다.

인공감염 마우스에서 *O. tsutsugamushi* 검출율에 대한 IFA법과 PCR의 비교

*O. tsutsugamushi*를 검출하기 위하여 Boryong 주를 마우스의 복강내로 투여한 후 혈액 및 장기 재료로부터 IFA 방법과 PCR 법으로 *O. tsutsugamushi*를 검출한 결과 IFA법은 균 접종 후 3일에 3마리 중 2마리에서 검출되기 시작하여 6, 12일에는 각각 3마리 모두에서 검출

Table 4. Antibody titer of serum by against *O. tsutsugamushi* of wild rodents captured in Gongnam area

Rodents No.	Collection area	IFA antibody titer			
		Gilliam	Karp	Karto	Boryong
M-A. agrarius-2	Miryang	20	0	0	0
M-A. agrarius-4	Miryang	0	0	0	20
M-A. agrarius-7	Miryang	40	20	0	0
M-A. agrarius-12	Miryang*	80	0	0	640
M-A. agrarius-13	Miryang	0	20	0	0
M-A. agrarius-15	Miryang	0	0	0	40
U-A. agrarius-1	Uiryeong	0	0	0	80
U-A. agrarius-3	Uiryeong*	80	0	0	160
C-A. agrarius-3	Changnyeong	20	20	0	0
C-A. agrarius-5	Changnyeong	0	0	0	20
C-A. agrarius-8	Changnyeong	40	0	0	0
C-A. agrarius-10	Changnyeong*	160	0	0	640
C-A. agrarius-12	Changnyeong	0	40	0	0
HM-A. agrarius-1	Hamyang*	80	0	0	320
HM-A. agrarius-3	Hamyang	40	0	0	0
HM-A. agrarius-6	Hamyang	40	0	0	0
M-M. fortis-14	Miryang*	80	0	0	320
C-M. fortis-15	Changnyeong	0	20	0	40

*Antibody positive

Table 5. Comparison of detection rates of IFA and PCR for detecting *O. tsutsugamushi* in artificial infected mouse

Detection method	Organ	Days after inoculation				
		3	6	12	18	24
Clinical manifestation ^b	-	0/3	3/3	3/3	2/3	1/3
IFA ^c	Serum	2/3 ^a	3/3	3/3	2/3	0/3
PCR	Blood	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
PCR	Spleen	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
PCR	kidney	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

a : No. of positive samples / No. of tested samples.

b : Clinical manifestation actually developed from 5 days after inoculation.

c : Indirect immunofluorescent antibody assay.

되었으나 18일부터 감소하기 시작하여 24일에는 검출되지 않았다. 이에 반하여 PCR법은 균 접종 후 3일부터 24일까지 전 개체의 모든 시료에서 검출되었다(Table 5).

혈액 및 장기 재료로부터 PCR 증폭산물의 확인

야생들쥐 58마리에서 채취한 혈액, 비장 및 신장으로부터 추출한 각 genomic DNA를 PCR로 증폭시킨 다음 1% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같다. 비장 재료 4건 및 신장 1건에서 210 bp 크기의 Boryong

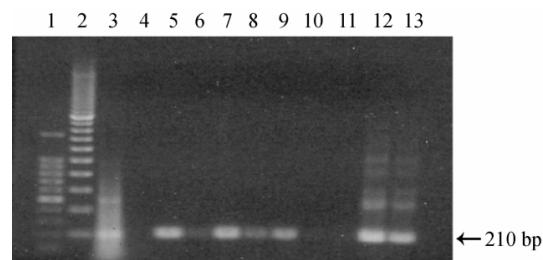


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of rickettsial DNAs amplified by polymerase chain reaction for the various specimen of wild rodents. [Lane 1, 2, 3: 100, 200, 20 bp DNA ladder, Lane 4: negative control, Lane 5: M-A 12, Lane 6: U-A 3, Lane 7: C-A-10, Lane 8: HM-A 1, Lane 9: M-M 14 PCR products from the spleen, and kidney specimen of wild rodents, Lane 10, 11: non-infected ICR mouse control spleen, kidney, Lane 12, 13: Gilliam, and Boryong strain].

주 특이의 증폭산물을 나타내었으나, 공식한 혈액 5건에서는 같은 크기의 증폭산물이 나타나지 않았다. 한편 Boryong주를 인공 감염시킨 후 3, 6, 12, 18 및 24일에 채취한 비장과 신장 재료를 PCR한 결과 Boryong주 특이의 DNA 증폭산물이 관찰되었으나, 감염시키지 않은 대조군의 장기 재료에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다(Fig. 2).

PCR에 의한 *O. tsutsugamushi*의 검출율을 검토하기 위

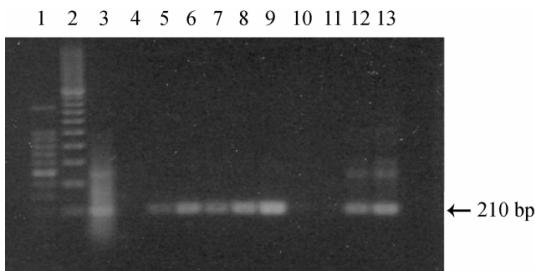


Fig. 2. Products of rickettsial DNAs amplified by polymerase chain reaction for mouse specimen infected with Boryong strain. [Lane 1, 2, 3: 100, 200, 20 bp DNA ladder, Lane 4: negative control, Lane 5~9: PCR products from the infected ICR mouse 3, 6, 12, 18, 24 day after inoculation. Lane 10, 11: non-infected ICR mouse control spleen, kidney, Lane 12, 13: Gilliam, and Boryong strain].

Table 6. Detection rate of rickettsial DNAs from the spleen and kidney samples of wild field rodents by nested polymerase chain reaction

Locality	Detection rate of rickettsial DNA	
	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Microtus fortis</i>
Miryang	1/6 ^a	1/1 ^a
Uiryeong	1/2	0/1
Changnyeong	1/5	0/2
Hamyang	1/3	0/1
Total(%)	4/16(25.0)	1/5(20.0)

a. Total no. of detected samples. / No. of tested samples.

하여 밀양, 의령, 창녕과 함양 네 지역에서 포획된 들쥐의 비장과 신장에서 PCR법으로 rickettsial DNAs를 검출한 결과 등줄쥐에서는 16마리 중 4마리(25.0%)에서 Boryong주 특이의 증폭산물이 검출되었고, 갈밭쥐는 5마리 중 1마리(20.0%)에서 검출되었다(Table 6).

고 칠

쓰쓰가무시병은 한국을 비롯한 일본, 중국 및 동남아시아에 분포하는 주요 열성 질환으로서 고열, 두통, 발진을 특징으로 하는 진드기가 매개하는 리켓치아성 질병이다. 원인체인 *O. tsutsugamushi*는 세포내 기생균으로서 숙주세포의 원형질에서 증식하며, 길이는 0.3 - 0.5 μm , 폭 0.2 - 0.4 μm 정도의 크기로서 세포막의 특성상 그람음성균으로 분류된다 [7]. *O. tsutsugamushi*는 종래 생물학적 특성에 따라 Rickettsia 속으로 분류되었으나 세포벽의 구조가 *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. rickettsii*와는 다르고 다른 리켓치아와 항원교차반응을 일으키지

않고, 유전자의 상동성이 적어 Orientia 속으로 재분류되었다 [11, 24]. 쓰쓰가무시병을 매개하는 텔진드기는 알, 유충, 번데기 및 성충의 네 단계의 생활사를 거치는데, 번데기로 탈바꿈하는 유충 단계에서 동물의 혈액을 흡혈한다. 사람은 우연숙주(incidental host)로서 *O. tsutsugamushi*에 감염된 텔진드기의 유충이 사람의 조직 액을 흡입할 때 균체가 혈액 내로 주입되면서 쓰쓰가무시병에 감염된다 [5]. 우리나라에 서식하는 텔진드기 중 *Leptotrombidium pallidum*, *Leptotrombidium scutellare*, *Leptotrombidium palpalae*의 3가지 종이 *O. tsutsugamushi*를 매개하는 것 [3]으로 알려져 있다. *O. tsutsugamushi*는 한 개의 종으로 분류되나 다양한 혈청형이 있으며, 이 중 Gilliam, Karp, Kato 주가 표준균주로 밝혀져 있으나 각 나라마다 다른 혈청형이 보고되었다 [3, 22]. 한국에서 분리되는 주요 혈청형은 Gilliam, Karp, Boryong이며, 이 중 Boryong 주가 가장 많이 분리된다고 보고되어 있다. 경남지방에서 포획한 야생들쥐의 종을 분류한 바 총 58마리 중 등줄쥐가 86.5%로 가장 높은 분포를 나타내었고 그 다음으로 갈밭쥐(8.3%) 및 땃쥐(5.2%) 순으로 나타났다(Table 2). 이는 박 등 [3]과 백 등 [4]이 보고한 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 경남지방에 서식하는 들쥐도 우리나라 중, 남부지방에 서식하는 야생들쥐와 같은 등줄쥐가 주종을 이루고 있는 것으로 알 수 있었다.

경남일대에서 포획한 등줄쥐, 땃쥐, 갈밭쥐의 *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kart, Boryong주에 대한 지역별 항체 보유율을 검사한 결과 50마리의 등줄쥐에서는 평균 32.0%를 나타내었다(Table 3). 지역별로 보면 밀양시가 46.2%, 의령군은 40.0%, 창녕군은 41.7%, 함양군이 50.0%의 양성을 보였고, 밀양시와 창녕군의 갈밭쥐 2마리에서도 양성을 나타내었는데 이러한 결과는 백 등 [4]과 유사한 결과를 나타내었다. 이와 같이 경남지방에서 서식하는 야생들쥐 중에서 등줄쥐가 리켓치아병을 매개하는 가장 유력한 동물 숙주인 것으로 추측할 수 있다.

항체가를 측정한 결과 Boryong 주에서 대체로 항체가가 높게 나타나는 반면, Gilliam주에서는 중간정도의 항체가를 보였고, Karp주에서는 대체적으로 항체가가 낮게 나타났다. Boryong, Gilliam 주 중에서도 일부 항체가 낮은 것은 항원으로 사용한 4주 중 2주 이하에만 반응하는 것도 있었기 때문에 대부분 Boryong주에서 강하게 나타내었다. 이러한 결과는 장 등 [8-11], 신 등 [5], 백 등 [4]이 보고한 결과와 유사하게 나타남으로서 경남일대에서도 Gilliam주와 Boryong주가 주로 감염되고 있는 것으로 볼 수 있다.

ICR 마우스에 *O. tsutsugamushi*를 인공 감염시키고

IFA방법과 PCR법을 이용하여 *O. tsutsugamushi*를 조사한 결과 IFA법은 균 접종 후 6일과 12일에는 전 개체에서 검출되었으나 18일 이후부터는 검출율이 감소하는 경향을 보이는 반면, PCR법은 blood, spleen, kidney 모든 시료에서 균 접종 후 3일부터 24일까지 검출되었다 (Table 5). 이러한 결과는 Kee 등[20]이 보고한 결과와 유사한 결과를 보였다.

58마리 야생들쥐에서 채취한 혈액, 비장, 신장 재료에서 추출한 genomic DNA를 PCR한 결과 혈액에서는 증폭산물이 검출되지 않았지만, 비장 4건과 신장 1건에서 Boryong주 특이의 증폭산물을 관찰할 수 있었고(Table 4, 6), 또한 인공감염 후 3, 6, 12, 18 및 24일의 비장과 신장에서 동일한 증폭산물을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 대조군으로 이용한 비감염 마우스의 비장과 신장에서 증폭산물이 검출되지 않았고, 인공감염 장기 재료에서 균 접종 후 3일부터 24일까지 DNA 검출이 가능하였던 점으로 미루어 볼 때 PCR법의 우수함을 입증할 수 있었으며, PCR 검사 재료로서는 혈액보다 비장 및 신장 재료가 유력한 것으로 사료된다.

또한 경남지역에서 포획된 들쥐의 비장과 신장에서 PCR 법으로 rickettsial DNAs를 검출한 결과에서도 4개 지역 5개 검체의 비장과 신장에서 증폭산물을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 IFA법에 의한 항체 양성을 검사에서 항체가 높을 경우 2종 이상 항체가가 양성을 보이는 등 다양한 항체가를 나타낸 것과 대조적으로 PCR법의 정확성을 다시금 입증하는 것이다. Kee 등 [20]에 의하면 생물학적인 시료의 검출한계가 혈액 1 ml 내에 리켓치아 수가 10개 이상 들어 있어야 한다는 점으로 미루어 볼 때 이는 항체 양성일지라도 혈액 샘플에서 검출되지 않은 것은 항체가 검출될 시점에는 혈액이 병원체가 소실되고, 혈액내 개체수가 거의 없거나 또는 오래 전에 항체가 소실된 것으로 볼 수 있다. Kee 등 [20]은 비장은 혈액보다 리켓치아 DNA를 검색하는데 있어서 효율성이 떨어지고 비장에서 특이 DNA band가 관찰된 것은 비장내에 대량의 세포가 존재하기 때문이라고 하였다. 본 실험에서는 이와 같은 현상이 나타나지 않았고 혈액보다는 비장에서 DNA 검색율이 높게 나타난 것으로 미루어 볼 때 PCR법은 리켓치아성 질병의 진단에 유용한 진단법이 될 것으로 사료된다.

결 론

쭈쭈가무시병에 대한 역학적 연구의 일환으로 경남지방에서 서식하고 있는 야생들쥐를 포획하여 *Orientia tsutsugamushi*에 대한 항체 보유 상태를 IFA법으로 조사하고 PCR법으로 감별 진단한 결과 다음과 같은 결론을

얻었다.

- (1) 경남지역에서 포획한 야생들쥐의 종별 분포를 조사한 바 58마리 중 86.5%(50마리)가 등줄쥐였고, 갈밭쥐가 8.6%(5마리), 땃쥐가 5.2%(3마리)이었다.
- (2) *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Karto 및 Boryong 주에 대한 IFA법에 의한 항체 양성을 등줄쥐는 50마리 중 32.0%(16마리)이었고, 갈밭쥐는 5마리 중 40.0%(2마리)이었으며, 땃쥐는 3마리 모두 음성이었다.
- (3) 등줄쥐, 땃쥐 및 갈밭쥐의 Gilliam, Karp, Karto 및 Boryong주에 대한 항체 가는 1:20에서 1:640까지 다양하였고, 대체적으로 Boryong주에서 높은 항체가를 나타내었고, Gilliam주는 중간정도의 항체 가를, 그리고 Karp주에서는 낮게 나타났다.
- (4) 인공감염 마우스의 혈액, 비장 및 신장 재료로부터 IFA법과 PCR법으로 *O. tsutsugamushi*를 검출한 결과 IFA법은 균 접종 후 3일부터 18일까지 양성을 나타내었으나, PCR법은 24일 까지 전 시료에서 검출되었다.
- (5) 포획한 야생들쥐의 혈액, 비장 및 신장 재료로부터 추출한 genomic DNA를 PCR한 결과 비장 및 신장 재료에서는 210 bp 크기의 Boryong주 특이의 증폭산물이 검출되었으나 혈액에서는 검출되지 않았다.
- (6) Boryong주를 인공감염시킨 후 3, 6, 12, 18 및 24일에 얻은 비장 및 신장 재료로부터 Boryong주 특이의 증폭산물을 관찰할 수 있었으나 비감염 재료에서는 관찰되지 않았다.
- (7) 포획한 들쥐의 비장 및 신장 재료를 PCR한 결과 *O. tsutsugamushi* 양성을 등줄쥐에서 25.0%(4/16마리), 갈밭쥐는 20.0%(1/5마리)이었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 경남지방에 서식하는 들쥐 가운데 *O. tsutsugamushi*를 매개하는 쥐는 대부분이 등줄쥐인 것으로 확인되었으며, 그 진단방법에는 PCR법이 IFA법에 비하여 우수한 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. 기선호, 송현체, 장우현. *Orientia tsutsugamushi* 유전형 Karp의 56kDa 유전자변이. 대한미생물학회지. 1997, 32, 35-40.
2. 노주영, 기선호, 송해준, 김수남, 최영주, 송기준, 김우주, 홍승민. 이중 중합효소 연쇄반응을 이용한 *Orientia tsutsugamushi*의 혈청형의 동정. Infection. 1997, 29, 138-189.
3. 박재갑, 남기진, 장명호, 최환주, 천미옥, 김홍주, 전상수, 박희태, 최연식. 농촌지역 양충병 매개진드기의

- 계절적 소장에 관한 조사연구(III). 경남보건환경연 구원보. 1998, **5**, 9-32.
4. 백락주, 송진원, 송기준, 고은영, 정기모, 이용주. 경기도와 강원도 야생들쥐의 리كت치아 감염에 대한 혈청학적 조사. *Infection*. 1998, **30**, 443-449.
 5. 신학균, 김희연, 장영식. 쯔쯔가무시병에 관한 혈청역학적 연구. 국립보건원보. 1989b, **26**, 136-156.
 6. 이인용. 국내 텔진드기(Acarina, trombiculidae)의 계절적 소장 및 지리적 분포 조사. 1992, 인천대학교 대학원 석사학위논문.
 7. 장우현. 한국의 쯔쯔가무시병. p. 1-153, 서홍출판사. 1994.
 8. 장우현, 강재승. 환자에서 *Rickettsia tsutsugamushi*의 분리. 대한의학회지. 1987, **30**, 99-1008.
 9. 장우현, 김익상, 기선희. 1990년에 한국에서 발생한 쯔쯔가무시병의 혈청역학조사. 대한미생물학회지. 1991, **26**, 273-277.
 10. 장우현, 김익상, 최명식. 1992년에 한국에서 발생한 쯔쯔가무시병의 혈청학 조사. 대한미생물학회지. 1994, **29**, 153-160.
 11. 장우현, 최명식, 기선희. 1989년에 한국에서 발생한 쯔쯔가무시병의 혈청 역학조사. 대한미생물학회지. 1990, **25**, 227-235.
 12. Amano, K., Tamura, A., Ohashi, N. and Urakami, K. Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun.* 1987, **55**, 2290-2292.
 13. Bozeman, F. M. and Elisberg, B. L. Serologic diagnosis of scrub typhus by indirect immunofluorescence. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1963, **112**, 568-573.
 14. Chang, W. H., Kang, J. S., Lee, W. K., Choi, M. S. and Lee, J. H. Serological classification by immunoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. *J. Clinical Microbiol.* 1990, **28**, 685-688.
 15. Eisenmann, C. S. and Osterman, J. V. Identification on strain specific and group-reactive antigenic determinants on the Karp, Gilliam and Kato strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985, **34**, 1173-1178.
 16. Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Kawamori, F., Yamamoto, S., Ohashi, N., Tamura, A. and Kawamura, A. Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991, **29**, 2628-2630.
 17. Hanson, B. Identification and partial characterization of *Rickettsia tsutsugamushi* major protein immunogens. *Infect. Immun.* 1985, **50**, 603-609.
 18. Jackson, E. B., Danauskas, J. X., Smadel, M. E. and Sekikawa, H. Occurrence of *Rickettsia tsutsugamushi* in Korea rodents and chiggers. *Am. J. Hyg.* 1957, **66**, 309-320.
 19. Kee, S. H., Choi, I. H., Choi, M. S., Kim, I. S. and Chang, W. H. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* in experimentally infected mice by PCR. *J. Clinic. Microbiol.* 1994, **43**, 1435-1439.
 20. Kee, S. H., Jin, W. S., Lee, J. E., Kim, S. H., Park, K. S., Baek, L. J. and Song, K. J. Seroepidemiologic analysis of acute febrile illness in Korea during 1997-1998. *J. Bacteriol. Virol.* 2002, **32**, 263-267.
 21. Kelly, D. J., Marana, D. P., Stover, C. K., Oaks, E. V. and Carl, M. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* by gene amplification using polymerase chain reaction techniques. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1990, **590**, 564-571.
 22. Rappmund, G., Gohany, A. L. and Manikumran, C. Transovarial transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium* (*Leptotrombidium*) *arenicola* Traub (Acarina: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.* 1972, **9**, 71-72.
 23. Ree, H. I., Lee, H. S., Lee, I. Y. and Yoshida, Y. Epidemiological studies on host animals of tsutsugamushi disease in Korea. *Kor. J. Parasitol.* 1991b, **29**, 181-188.
 24. Roberts, L. W. and Robinson, D. M. Efficiency of transovarian transmission *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium arenicola* (Acari: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.* 1977, **13**, 493-496.
 25. Shirai, A., Coolbaugh, J. C. and Gan, E. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine islands. *Japan J. Med. Scil. Biol.* 1982, **35**, 255-259.
 26. Song, H. J., Seong, S. Y., Huh, M. S., Park, S. G., Jang, W. J., Kee, S. H., Kim, K. H., Kim, S. C., Choi, M. S., Kim, I. S. and Chang, W. H. Molecular and serologic survey of *Orientia tsutsugamushi* infection among field rodents in southern cholla province of Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, **13**, 56-61.
 27. Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Takahashi, K. and Oyanagi, M. Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *Infect. Immun.* 1985, **48**, 671-675.
 28. Tamura, A., Takahashi, K. and Tsuruhara, T. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp and Gilliam strain from patients. *Microbiol. Immunol.* 1984, **26**, 87-882.
 29. Traub, R. and Wisserman, C., L. The ecology of

- chigger-borne rickettsiosis (Scrub typhus). J. Med. Ent. 1974, **11**, 237-303.
30. Weiss, E. The biology of rickettsiae. Annu. Rev. Microbiol. 1982, **36**, 345-370.
31. Weiss, E., Moulder, J. W. and Order, I. Rickettsiales in Bergeys manual of systemic bacteriology. p. 687-698, Williams Wilkins, Baltimore. 1984.