J Vet Clin 27(4) : 374-377 (2010)

Journal of Veterinary Clinics
www.ksvc.or.kr

Nested PCR법을 이용한 Cat Scratch Disease의 원인체인 *Bartonella Henselae*와 *Bartonella Clarridgeiae*균의 동물병원 수의사의 감염 실태조사

최은화*・이종화・윤화영[1]

서울대학교 수의과대학 인수공통질병연구소, 내과학교실

*삼성생명과학연구소 실험동물연구센터

(게재승인: 2009년 9월 30일)

Prevalence of *Bartonella Henselae* and *Bartonella Clarridgeiae* in Veterinarian Working at the Veterinary Teaching Hospital (by nested PCR)

Eun Wha Choi*, Jong Hwa Lee and Hwa Young Youn[1]

KRF Priority Zoonotic Disease Research Institute and Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Laboratory Animal Research Center, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul 135-710, Korea*

Abstract : Cat scratch disease is a zoonotic disease usually caused by the gram-negative bacterium *Bartonella henselae*. It is transmitted commonly by scratch or bite from cats or kitten. Cat scratch disease typically affects children and young adults, who develop regional lymphadenopathy. In contrast, in immunocompromised hosts, bacteremia may occur, bacillary angiomatosis and bacillary peliosis hepatitis or splenitis are the most common manifestations. *Bartonella henselae* was detected in three of thirty veterinarians and *Bartonella clarridgeiae* was detected in one of thirty veterinarians by a novel nested polymerase chain reaction. Cat scratch disease will not be neglected, and it needs continuous studies as well as observation and prevention of this disease.

Key words **:** *Bartonella henselae*, cat scratch disease, veterinarian, prevalence, nested PCR.

서 론

Cat scratch disease (CSD)는 우리나라 말로 묘소병(猫搔病), 고양이 긁힘병, 고양이 할퀴병이라고 명명된다. 이 질환은 인수공통전염병이며, 그람 음성 간상균인 *Bartonella henselae*에 의해서 발생된다(6,7). 잠복기가 대개 3-12일 정도로 급성 경과를 취하며 고양이와 접촉한 아이들과 젊은이에게서 가장 흔하게 발생한다(5). 주로 할퀴거나 다른 상처를 통해서 전파되며, 할퀸 다음 며칠 후, 접종부위에서 중앙에 액포나 농포가 있는 가피가 덮인 궤양이나 구진으로 나타난다(12). 1-3주 후에 전반적인 감염의 양상이 보이며 국소적 임파선이 커진다. 진행 과정이 양성일지라도 어떤 경우엔 열이 나며 몇 주 동안 심한 전신 증상을 보이기도 한다(1,2,8,15). 림프절 종대 시에는 림프종이나 다른 악성 종양, 결핵, 림프 육아종, 급성 세균성 감염과 감별해야 한다.

[1]Corresponding author.
E-mail : hyyoun@snu.ac.kr

1931년에 CSD라는 명칭이 처음 붙여졌으며, 원인체가 처음으로 동정된 것은 1985년이다. 당시는 *Rochalimaea henselae*로 분류되었으나 후에 다시 *Bartonella henselae*로 재분류 되었으며, CSD의 원인체로 확정되었다(4,16). 1993년 미국 질병관리본부에 의해 제한된 수의 발생률 조사가 실시되었으며, 연간 십만명 당 9.3건 정도의 발생을 보이는 것으로 보고되었다(14). 국내에서는 2005년에 처음으로 PCR법에 의해 CSD가 진단된 환자가 case report 되었다(5). 유병율 조사가 일본, 인도네시아, 필리핀, 이스라엘, 이집트, 독일, 오스트리아, 스위스, 노르웨이, 스페인, 가본, 짐바브웨이, 호주, 미국 등에서 국소적으로 이루어졌으며(5), 우리나라에서도 최근 고양이 및 개에서의 유병율이 서울 및 경기지역을 대상으로 조사되어 보고되었다(9). 이 보고에 따르면, *Bartonella henselae*균 검출은 고양이 151두 (야생고양이 102두, 애완고양이 44두)를 대상으로 한 nested PCR 기법에서 야생 고양이 혈액의 41.8%, 침의 44.1%, 발톱의 42.7%에서 확인할 수 있었으며, 애완 고양이의 경우 혈액의 33.3%, 침의 43.5%, 발톱의 29.5%에서 나타났다. 한편, 애완견 54두를 대상으로

한 결과, 혈액의 16.6%, 침의 18.5%, 발톱에서 29.6%에서 나타났다. 이렇듯 야생 고양이뿐 만 아니라, 애완 고양이 및 애완견에서도 높은 양성률을 보여, 이 질병에 대한 관심과 예방 대책이 필요하다. 이 연구에서는 진료 시 애완 고양이 및 애완견과의 접촉이 빈번하게 이루어지는 수의사들을 대상으로 nested PCR 기법을 이용하여, *Bartonella henselae* 및 또 하나의 CSD 원인체로 지목되고 있는 *Bartonella clarridgeiae*의 감염률을 조사하여 그 감염실태를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

대상

서울대학교 수의과대학 부속 동물병원에서 동물과 빈번한 접촉이 있는 진료에 참여하는 수의사 30명의 혈액, 침 그리고 손톱의 시료를 채취하였다.

시료채취

모든 시료는 연구의 내용과 채취 시에 일어날 수 있는 모든 부작용에 대하여 설명 이후 동의 하에 실시했다. 혈액은 3 ml를 채혈하여 EDTA가 포함된 상용화된 용기에 담아 DNA분리 전까지 냉장 보관하였으며, 침은 멸균 면봉을 이용하여 채취 후 DNA 분리를 위하여 500 µl PBS 용액에 담아 PCR 분석 전까지 냉장 보관하였다.

PCR

채취된 sample로부터의 DNA 분리는 상용화된 kit (G-spin Genomic DNA Extraction kit, Intron biotechnology)를 사용하였다.

기존의 단일 PCR 분석이 민감도가 낮은 것을 고려하여 nested PCR 분석법을 이용하였으며(13), 오염에 의한 위 양성을 막기 위해 1차, nested PCR 및 전기영동의 과정을 분리된 공간에서 실시하였으며, 매 과정 전 상용화된 DNAase 제재를 이용하여 모든 실험기자재의 소독을 실시하면서 진행하였다.

Primer design (Table 1)과 PCR조건 등의 nested PCR 분석법은 Rampersad 등이 2005년도에 발표한 논문의 방법을 따랐다(13). 즉, 1차 PCR primer로 P-phenfa와 P-benr1를 nested PCR primer로 N-bhenf1a와 N-bhenr을 이용해 다음과 같은 온도와 시간으로 실시하였다. 1차 PCR에서 DNA 1 µl 를 0.2 mM dNTP, 3 mM MgCl2 reaction buffer, Taq polymerase 0.5 U, 각 primer 0.5 pmoles/µl 를 혼합하였고, nested PCR에서는 1차 PCR 산물 1 µl를 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl2 reaction buffer, Taq polymerase 0.5 U, 각 primer 0.5pmoles/µl 를 멸균 증류수로 총량이 25 µl가 되도록 하였다. 이후 검체는 personal thermocycler를 이용해 1차 PCR에서 94ºC에서 5분간 1회 반응시킨 후 94ºC 15초, 48.2ºC 30초, 72ºC 30초 순서로 40회 반복 후 최종적으로 72ºC에서 7분간 반응 시켰으며, nested PCR에서 94ºC에서 5분간 1회 반응시킨 후 94ºC 15초, 56ºC 30초, 72ºC 30초 순서로 40회 반복 후 최종적으로 72ºC에서 7분간 반응 시켰다(13). 전기영동은 2% agarose gel을 ethidium bromide로 염색 후 ultra violet light로 확인하여 1차 및 nested PCR 과정에서 각각 *Bartonella heselae*에서 186 bp, 152 bp 그리고 *Bartonellar clarridgeiae*에서 168 bp, 134 bp 위치에 양성 band가 존재하는지를 확인하였다.

결 과

인수공통 질환인 CSD의 *Bartonella henselae*균 감염 실태조사 결과는 Table 2, 3과 같다. *Bartonella* 1차 PCR 기법에서 혈액, 침 그리고 손톱에서 모두 음성이었으며, nested PCR 기법을 통하여, 혈액으로부터의 샘플에서 *Bartonella henselae* 균은 152bp위치에서, *Bartonella charridgeiae*균은 134bp위치에서 양성을 확인하였다(Fig 1). 침과 손톱 시료에서는 어떠한 균도 검출되지 않았다.

고 찰

근래 가속화되고 있는 핵가족화와 더불어 애완동물에 대한 관심 증가에 힘입어 반려동물과 함께 생활하는 가정이 지속적으로 증가하는 현실에서 반려동물 유래의 인수공통 전염병의 연구 필요성이 공중 보건학적 측면에서 제기 되어 지고

Table 2. Results of *Bartonella henselae* PCR assay in field veterinarians

Group (Number of veterinarians)	Number of positive (%)	
	Primary PCR	Nested PCR
Blood	0 (0%)	3/30 (10%)
Saliva	0 (0%)	0 (0%)
Nail	0 (0%)	0 (0%)

Table 1. Primers used for PCR assay

Primer	Primer direction and sequence	product size (bp)
P-bhenfa	5'-TCTTCGTTTCTCTTTCTTCA- 3'	186 (Bh)
P-bhenr1	5'-CAAGCGCGCGCTCTAACC- 3'	168 (Bc)
N-bhenf1a	5'-GATGATCCCAAGCCTTCTGGC- 3'	152 (Bh)
N-bhenr	5'-AACCAACTGAGCTACAAGCC- 3'	134 (Bc)

Table 3. Results of *Bartonella charridigeae* PCR assay in field veterinarians

Group (Number of veterinarians)	Number of positive (%)	
	Primary PCR	Nested PCR
Blood	0 (0%)	1 /30 (3.3%)
Saliva	0 (0%)	0 (0%)
Nail	0 (0%)	0 (0%)

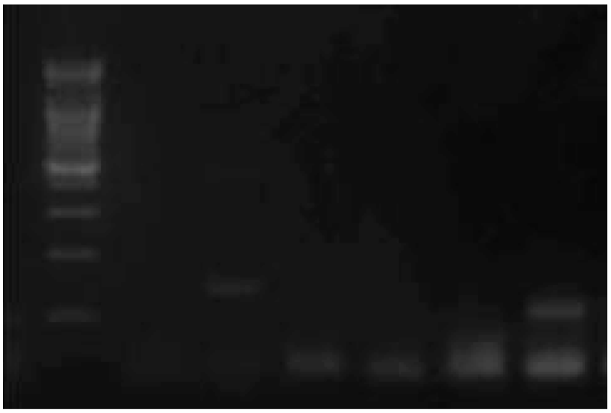

Fig 1. *Bartonella henselae* and *Bartonella charridigeae* nested PCR amplification band from human (lane 1: 100 bp ladder, lane 2: negative control, lane 3: *Bartonella henselae*, lane 7: *Bartonella charridigeae*).

있다. 얼마 전에 보고된 CSD의 원인체인 *Bartonella henselae* 균의 국내 고양이 및 개의 감염실태 조사에서 많은 수의 동물이 nested PCR법에서 양성을 보였으며(9), 이번 연구를 통해 실시한, nested PCR 기법을 이용한 수의사 감염실태 조사에서 30명 중 3명이 *Bartonella henselae* 양성을, 1명이 *Bartonella charridigeae* 양성을 보였다. 이들은 진료시에 고양이나 개에게 할퀌을 당한 적이 있었으며, 미열과 림프절 종대의 증상을 경험하기도 했다. 비교적 최근에 학계에 밝혀진 인수공통질병으로서의 CSD와 이의 원인체인 *Bartonella henselae*를 가볍게 간과할 수 없으며, 지속적인 연구과 관찰, 예방 등의 관심이 필요하다고 여겨진다. 흥미로운 점은, 고양이나 개에 있어서는 침과 발톱에서의 검출율이 혈액에서의 검출율과 비슷하거나 높았으나(9), 사람에서는 침과 손톱에서는 검출되지 않았다.

CSD 진단은 PCR법이나 직접배양법, Brown-Hopp tissue gram stain이나 Warthin-Starry silver stain 같은 특수 염색, 간접 형광항체법 (IFA), ELISA와 같은 혈청학적 검사와 병리조직학적 검사에 의한다(5,8,15,17). 발병후 6주 이후에는 혈액샘플에서 nested PCR기법으로 detection이 어려울 수도 있으므로 (18), 병력, 임상증상과 혈청학적 검사와 병행하여 진단하는 것이 추천된다.

Nested PCR 양성이 반드시 active infection을 의미하는 것은 아니다. 즉, *Bartonella henselae* 감염시, 치료로 항생제 사용이 모든 경우에 꼭 필요한 것은 아니나, 심하거나 전신 질병을 보일 경우, 지시된다. 특히, 면역부전인 환자들은 항생제 치료가 필수적이다. *Bartonella henselae*는 penicillin, amoxicillin, nafcillin에 저항성을 보이며, trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampicin, fluoroquinolones, gentamicin, ciprofloxacin에는 민감하여 이러한 항생제를 이용하는 것이 효율적이라고 알려져 있다(11).

예방적 측면에서는, 수의사나 보호자가 면역억제제를 장기간 복용하거나, 면역력이 떨어졌다고 판단되는 시기에는 애완 고양이나 개에 의한 창상이 생기지 않도록 더욱 주의를 기울여야 할 것이며, 창상이 생긴 이후에는 관심을 가지고 경과를 살피며 적절한 대처를 하여야 할 것이다. 또한 *Bartonella spp.*가 고양이 벼룩 (*Ctenocephalides felis*)을 통해 전파되므로(3), 이러한 벼룩을 관리하는 것이 이의 전파를 막는 근본적인 예방책이 될 수 있을 것이다. Insect growth regulators나 insect development inhibitors등은 곤충에게만 있는 수용체에 작용하므로 포유류에는 안전하므로 이를 이용한 장기간의 벼룩 관리나 애완동물 주거환경에 대한 청결에 대한 안내와 보호자 교육이 필요하다고 생각한다.

더 나아가 반려동물과의 관계를 통해 인간에게 발생할 수 있는 인수공통 질병을 선정하고 이들의 감염실태 기초 역학조사 연구를 시작으로 감염경로에 대한 추적조사 및 예방방법과 진단법을 확립해 나가는 연구를 진행해 질병예방환경을 조성하고, 반려동물을 기르는 보호자 및 이들과의 접촉이 빈번한 수의사에 대한 공중보건학적 주의사항에 대한 지표를 확립해 주는 연구들이 계속되어야 하겠다.

결 론

고양이 긁힘병(Cat scratch disease)은 그람 음성 간상균인 *Bartonella henselae*에 의해서 발생되는 인수공통전염병이다. 고양이에게 물리거나 할퀴어서 전파되며, 주로 어린이나 어린 성인에 많이 발생하며, 국소 림프절병증을 일으킨다. 반면, 면역력이 떨어진 사람의 경우, 세균혈증을 일으킬 수 있으며, 세균성 혈관종증, 세균성 간자색반병, 비장염을 일으킬 수 있다. Nested PCR 기법을 이용한 수의사 감염실태 조사에서 30명 중 3명이 *Bartonella henselae* 양성을, 1명이 *Bartonella charridigeae* 양성을 보였다. *Bartonella henselae*를 가볍게 간과할 수 없으며, 지속적인 연구과 관찰, 예방 등의 관심이 필요하다고 여겨진다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 (KRF-2006-005-J02902)으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Anderson BE, Neuman MA. Bartonella spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 203-219.

2. Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of Bartonella infections: II. Cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 163-179.
3. Chang CC, Lee CC, Maruyama S, Lin JW, Pan MJ. Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. Vet Res 2006; 37: 565-577.
4. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. Bartonella henselae prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. J Clin Microbiol 1995; 33: 2445-2450.
5. Chung JY, Han TH, Kim BE, Kim CK, Kim SW, Hwang ES. Human metapneumovirus infection in hospitalized children with acute respiratory disease in Korea. J Korean Med Sci 2006; 21: 838-842.
6. Guptill L, Slater L, Wu CC, Glickman LT, Lin TL, Welch DF, Crippen JT, HogenEsch H. Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with Bartonella henselae. Vet Immunol Immunopathol 1999; 71: 233-243.
7. Kabeya H, Sase M, Yamashita M, Maruyama S. Predominant T helper 2 immune responses against Bartonella henselae in naturally infected cats. Microbiol Immunol 2006; 50: 171-178.
8. Keret D, Giladi M, Kletter Y, Wientroub S. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. J Bone Joint Surg Br 1998; 80: 766-767.
9. Kim YS, Seo KW, Lee JH, Choi EW, Lee HW, Hwang CY, Shin NS, Youn HJ, Youn HY. Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in Cats and Dogs in Korea. J Vet Sci 2009; 10: 85-87.
10. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. JAMA 1994; 271: 531-535.
11. Kordick DL, Papich MG, Breitschwerdt EB. Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2448-2455.
12. Kunz S, Oberle K, Sander A, Bogdan C, Schleicher U. Lymphadenopathy in a novel mouse model of Bartonella-induced cat scratch disease results from lymphocyte immigration and proliferation and is regulated by interferon-alpha/beta. Am J Pathol 2008; 172: 1005-1018.
13. Rampersad JN, Watkins JD, Samlal MS, Deonanan R, Ramsubeik S, Ammons DR. A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of Bartonella henselae and B. clarridgeiae: an examination of cats in Trinidad. BMC Infect Dis 2005; 5: 63.
14. Resto-Ruiz S, Burgess A, Anderson BE. The role of the host immune response in pathogenesis of Bartonella henselae. DNA Cell Biol 2003; 22: 431-440.
15. Sander A, Zagrosek A, Bredt W, Schiltz E, Piémont Y, Lanz C, Dehio C. Characterization of Bartonella clarridgeiae flagellin (FlaA) and detection of antiflagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. J Clin Microbiol 2000; 38: 2943-2948.
16. Slater LN, Welch DF, Min KW. Rochalimaea henselae causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. Arch Intern Med 1992; 152: 602-606.
17. Tsuneoka H, Umeda A, Tsukahara M, Sasaki K. Evaluation of indirect fluorescence antibody assay for detection of Bartonella clarridgeiae and Seroprevalence of B. clarridgeiae among patients with suspected cat scratch disease. J Clin Microbiol 2004; 42: 3346-3349.
18. Manfredi R, Sabbatani S, Chiodo F. Bartonellosis: light and shadows in diagnostic and therapeutic issues. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 167-169.