2016년 아나플라즈마증 실험실 진단 검사 결과

질병관리본부 국립보건연구원 감염병연구센터 세균질환연구과 **이승훈, 이영선***
질병관리본부 감염병분석센터 세균분석과 **황선도**

*교신저자 : yslee@korea.kr, 043-719-8460

Abstract

Laboratory-based diagnosis test results of Human Granulocytic Anaplasmosis, 2016

Lee Seunghun, Lee Yeongseon*
Division of Bacterial Disease Research, Center for Infectious Disease Research, KNIH, KCDC
Hwang Seondo
Division of Bacterial Diseases, Center for Laboratory Control of Infectious Diseases, KCDC

Anaplasmosis is a zoonotic tick-borne disease caused by the bacterium *Anaplasma phagocytophilum* which is mainly transmitted to humans by tick bites. Typical symptoms occur within 1-2 weeks of a tick bite by fever, headaches, chills, and muscle aches.

This article shows the result of laboratory-based diagnosis test of Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) from Anaplasmosis-suspicious patient in South Korea. We performed both serological test of HGA using indirect immuno-fluorescent antibody assay (IFA) for 302 patient sera and PCR test using 16S rRNA target gene for 209 cases of patient blood. In serological tests using IFA, 16(5.3%) of the 302 cases tested positive for IgG or IgM for *A. phagocytohilum*(male 9, 56.3% vs. female 7, 43.7%) with higher proportion of those aged >= 50(12, 75.0%). 4(25.0%) of 16 cases having convalescent sera seroconverted. 6(2.9%) of the 209 cases revealed positive PCR test. This article provides a basis for laboratory diagnosis for febrile patients who had fever with a recent history of tick bites or outdoor activity.

아나플라즈마증(Human granulocytic anaplasmosis, HGA)은 인수공통감염병으로 알려져 있으며, 사람을 포함한 개, 소, 양, 염소, 말 그리고 야생동물에 감염되며, 원인병원체는 *Anaplasma phagocytophilum*이라는 세포내 절대 기생하는 박테리아이다. 1990년대 중반 미국에서 처음으로 아나플라즈마증의 인체 감염이 보고되었다[1]. 인체 감염을 일으키는 매개체는 참진드기로서 *Ixodes scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* 등이 있으며 각각 미국 중북부 및 동북부지역, 미국 태평양 연안지역, 유럽 서부지역에서 주된 감염을 유발하는 매개체로 알려지고 있다. 아나플라즈마 감염은 진드기에 의해 매개되며 약충 및 성충 시기의 진드기가 왕성히 활동하는 늦봄부터 가을까지 다발하는 것으로 알려져 있다. 2014년에 처음으로 국내 아나플라즈마증 환자 발생이 보고되었으며[2], 2002년 전국 각 지역의 가을철 원인불명환자에서 아나플라즈마증의 혈청학적 검사를 실시한

결과, 양성항체 보유율을 1.8%로 보고한 바 있다[3]. 2003년 매개체를 대상으로 수행한 유전자 검출 검사에서 *I. persulatus*와 *Haemophysalis longicornis* 진드기에서 *A. phagocytophilum*의 유전자 검출(9.9%)도 보고되었다[4]. 아나플라즈마증은 감염된 진드기에 흡혈된 후 7~10일 정도의 잠복기를 거쳐 39℃ 이상의 고열이 나타나는 급성열성질환이다. 주요 임상증상은 오한, 근육통, 심한두통, 식욕결핍, 관절통, 오심, 건성기침 등이며 doxycycline 등의 항생제로 치료가 가능하다. 적절한 항생제 치료를 받지 않은 경우에는 패혈증 등의 심각한 합병증을 초래하기도 하며, 일부 환자에서의 치사율은 1% 이하이다[5]. 아나플라즈마증 실험실검사의 혈액학적인 방법으로는 말초혈액도말을 통한 현미경관찰, 백혈구, 혈소판 검사 등이 있다. 혈청학적 방법으로는 간접면역형광항체법(Indirect immunofluorescence assay, IFA)과 웨스턴 블롯법 등이 있으며, 항원 검출 방법으로는 세포배양을 통한 원인균 분리와 중합효소연쇄반응을 이용한 유전자 검출법 등이 있다. 인수공통감염과에서는 아나플라즈마증에 대한 혈청학적인 실험실 검사방법으로 간접면역형광항체법을 실시하였으며, 항체가가 IgG 1:80 이상, IgM 1:16 이상이면 항체가 양성으로 판정하였다. 또한 회복기 혈청의 항체가와 급성기 혈청의 항체가 결과를 비교하여 4배 이상 증가 시 아나플라즈마증 항체가 양성으로 최종 판정하였다. 항체가 검사 의뢰 시 혈액을 송부한 경우 환자의 혈액에서 DNA를 추출하여 *A. phagocytophilum* 16S rRNA 유전자를 증폭하는 PCR을 통한 유전자 검사를 실시하였다.

이 글에서는 2016년에 의뢰된 아나플라즈마증 의심환자를 대상으로 혈청학적 검사 및 유전학적 검사결과를 통하여 국내 아나플라즈마증에 대한 검사 결과를 보고하고자 한다. 2016년에 302건의 아나플라즈마증 의심환자에 대한 혈청학적 검사가 의뢰되었고, 이 중 209건은 혈액이 동봉되어 유전학적인 검사도 함께 병행하였다. IFA 방법을 이용한 아나플라즈마증 혈청학적 검사에서는 16건(5.30%)이 항체가 양성으로 나타났다. 그 중 회복기 혈청의 항체가 결과와 급성기 혈청의 항체가 결과를 비교해 4배 이상 증가한 경우는 4건 이었으며, 이들에 대해 최종 항체가 양성으로 판정하였다. 항체가 양성 중 남성과 여성의 건수는 각각 9건, 7건 이었다. 연령대는 20대가 2명, 30대가 2명 이었으며, 나머지는 모두 50대 이상 이었다. IgM에 대한 항체가 결과를 보면, 7건에서 양성을 보였고 이는 아나플라즈마 원인균에 최근에 감염된 것으로 추정 할 수 있었다. PCR을 통한 유전학적 검사 결과에서는 209건 중 6건(2.87%)에서 양성을 나타냈다(Table 1). 유전학적 검사 결과를 바탕으로, 환자의 혈액에 감염된 *A. phagocytophilum*의 계통학적인 분석을 실시하였다(Table 2).

국내 아나플라즈마증 환자의 혈액에서 검출된 *A. phagocytophilum*의 16S rRNA유전자와 국외, 국내, 숙주 그리고 매개체에서 연구된 유전자들과 비교·분석하였다. 그 결과 *Anaplasma*속의 다른 박테리아와는 뚜렷하게 구분되었으며, 중국(설치류), 한국(개, 임상환자)에서 검출된 유전자와 매우 유사하였다. 2014년 서울대학교병원에서 최초 보고한 임상환자에서 검출된 유전자와의 비교 결과는 유전적으로 매우 유사하였지만 미국(임상환자, 개, 토끼), 스웨덴(말), 일본(사슴)에서 보고된 유전자와는 유사도가 약간 낮았다(Figure 1).

질병관리본부는 2014년 10월부터 현재까지 아나플라즈마증 혈청학적 검사를 실시하고 있다. 본 자료는 2016년 한 해 동안 의뢰된 진드기에 물리거나 접촉하거나, 야외활동 후 급성열성질환, 원인모를 열성질환 등의 증상을 보이는 아나플라즈마증 의심환자들에 대한 실험실 검사 결과이다. 2014년에 처음으로

Table 1. Positivity of *A. phagocytophilum* serological test and PCR amplification from anaplasmosis-suspicious patients in South Korea

	Total	No. of positives*	Positivity (%)
IFA test	302	16	5.30
PCR test	209	6	2.87

Positives were determined as antibody titer over 1:80 anti-IgG or 1:16 anti-IgM by IFA (Indirect immunofluorescent antibody assay) according to manufactures criteria and PCR amplification for *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene.

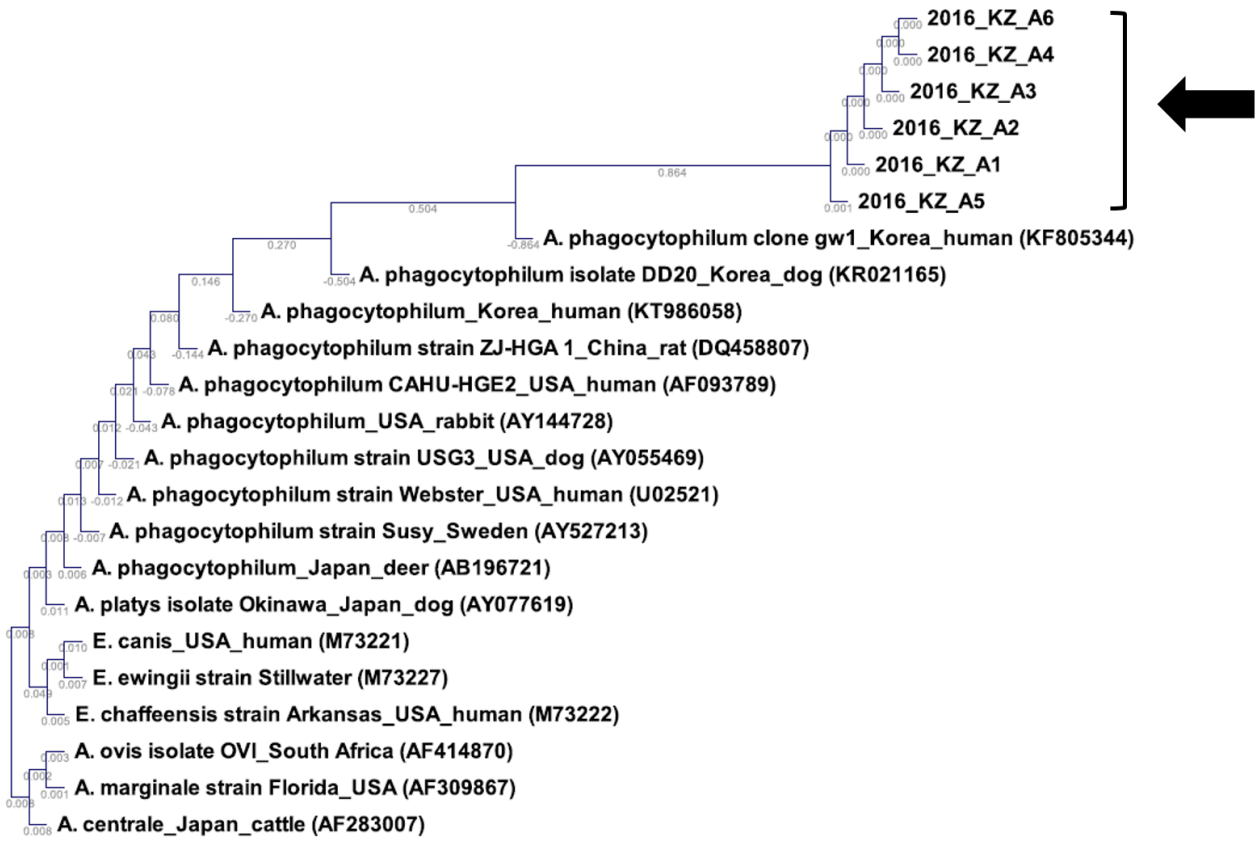
Table 2. Laboratory results of HGA using IFA, PCR, and clinical features from anaplasmosis-suspicious patients

No.	Sex	Age	Seropositive*		Seroconversion*		PCR	Clinical features
			IgG	IgM	IgG	IgM	16S rRNA	
1	Female	27	1:640	<1:16	1:640	<1:16	-	Outdoor camping
2	Female	78	1:5120	1:64	NT	NT	+	Tick bited, thrombocytopenia
3	Female	70	<1:80	<1:16	1:2580	1:128	+	Outdoor activity, fever, thrombocytopenia
4	Female	80	<1:80	1:64	NT	NT	-	Fever, skin eschar like legion,
5	Female	63	1:160	1:512	NT	NT	NT	High fever, thrombocytopenia
6	Male	28	1:160	1:32	NT	NT	-	High fever, thrombocytopenia, LFT ↑
7	Male	65	<1:80	<1:16	1:2580	1:128	+	High fever
8	Male	35	<1:80	1:16	NT	NT	-	Outdoor activity, fever
9	Male	60	1:80	<1:16	1:1280	<1:16	-	High fever
10	Male	33	1:80	1:16	NT	NT	-	Acute fever, rash
11	Male	51	<1:80	1:16	<1:80	<1:16	-	Cross reaction to scrub typhus +
12	Male	81	1:80	<1:16	NT	NT	NT	Fever, neutropenia
13	Male	78	1:160	<1:16	1:80	<1:16	-	Thrombocytopenia, LFT ↑
14	Female	71	1:80	<1:16	NT	NT	NT	Muscle pain, fever
15	Female	58	<1:80	<1:16	<1:80	1:256	+	Acute fever, farm worker
16	Male	53	1:80	<1:16	<1:80	<1:16	NT	Fever, scrub typhus +
17	Male	78	<1:80	<1:16	NT	NT	+	Tick bited, fever
18	Female	72	<1:80	<1:16	<1:80	<1:16	+	Fever, bicytopenia

* Serological titration was performed by IFA (Indirect immunofluorescent antibody assay) which were purchased from fuller laboratories(USA)
** NT; Not tested

국내 임상환자에 대한 보고로 아나플라즈마증에 대해 본격적으로 알려지게 되었다. 아나플라즈마증은 중증혈소판감소증과 유사한 임상증상을 나타내기도 하지만 대부분 증상이 경미하며, 치사율이 낮다. 2015년도 실시한 아나플라즈마증 실험실 검사 결과에서는 6.96%의 항체 양성률, 2.54%의 유전자 양성률 결과를 보였고, 2016년도 아나플라즈마증 실험실 검사결과는 5.30%의 항체 양성률, 2.87%의 유전자 양성률 결과를 보였다.

질병관리본부에서 수행한 결과를 살펴보면, 2013년 중증열성혈소판감소증후군(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 의심환자 검체를 이용한 아나플라즈마증 및 에르리키아증 감염 조사결과에서는 아나플라즈마증에 대한 감염률이 2.2%(6/271)로 2002년에 수행된 급성열성질환 환자의 아나플라즈마증 항체가 조사결과 1.8%(9/491)의 양성률 보다는 약간 높게 나타났다[3]. 국외 연구 결과를 살펴보면, 2008년 중국 텐진 지역 농업인을 대상으로 아나플라즈마증 항체가 조사 결과 8.8%가 양성이었고, 2007~2009년 중국 시골지역 주민들의 아나플라즈마증 항체가 조사 결과 15.4%에서 양성이었으며, 2012년 베이징 근교 농업인들에서 아나플라즈마증 항체가 조사결과 14.1%가 양성 이었다. 기타 해외 국가 아나플라즈마증 항체가 조사 결과, 오스트리아 9.0%(2003년), 폴란드 9.6~19.8%(2006년), 스페인 1.4%(2002년), 그리스 7.3%(2002년), 이탈리아 5.7%(2005년), 덴마크 21.0%(2001년), 독일 1.4~2.8%(1999년, 2006년)이었다.



The sequences of *A. phagocytophilum* obtained in this study are marked using arrows. The accession numbers of sequences obtained from GenBank are shown with the sequence names and countries of origin. Numbers on the branches indicate bootstrap support (1,000 replicates). Scale bar indicates a phylogenetic distances of 0.800 nucleotide substitution per position.

Figure 1. Phylogenetic tree constructed using Neighbor joining kimura 80 methods based on 16S rRNA nucleotide sequences of *Anaplasma phagocytophilum*

2009년 미국에서 아나플라즈마증 발생이 1,161건이었으며 사망률은 0.6~0.7%에 이르렀다. 중국에서는 항체가 조사를 통하여 간접적인 감염실태를 보고하고 있고 일본에서는 아나플라즈마증에 대한 감염환자 임상 결과(case report)들이 보고되고 있다.

아나플라즈마증 감염은 *Ixodes*속과 *Haemaphysalis*속의 진드기 등으로 전파가 가능한 것으로 알려져 있으며, 국내에서는 *I. persulatus, I. nipponensis*와 *H. longicornis* 등의 진드기 매개로 질병전파가 가능한 것으로 알려져 있다. 이들에 대한 유전자 검사결과 *A. phagocytophilum* 감염률은 1%(2008년)로 보고되었다[6]. 국내 가축에서의 아나플라즈마 발생과 관련된 조사에서 한국 고라니의 항체가 검사결과는 *A. phagocytophilum*이 63.6%(42/66)의 감염률을 나타내어, 상당히 많은 수가 감염되어 있는 것으로 보고되었다[7]. 아나플라즈마증에 대한 후향적 연구에서는 2003년부터 2012년까지 발열 및 혈소판 감소로 골수검사를 받은 환자의 혈액으로부터 16S rRNA 유전자 검사를 실시한 결과 7.14%(5/70)의 양성이 보고되었다. 이는 *A. phagocytophilum* 감염에 의한 아나플라즈마증이 2006년부터 발병되었던 것으로 추정할 수 있다[8].

2016년 아나플라즈마증 검사 양성 환자의 임상소견을 살펴보면 공통적으로는 급성 발열 증상을 갖고 있었고, 그 중 진드기에 물린 후 임상증상을 보인 경우가 2건 이었다. 공통적으로는 급성 발열 증상을 갖고 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 아나플라즈마증은

그동안 보고가 적고 잘 알려지지 않아, 진단이 제대로 이뤄지지 않았을 가능성이 높다. 향후에는 진드기에 물리거나 유사증상이 있을 시 아나플라즈마증에 대한 진단 또는 실험실 검사가 될 수 있는 진단 및 예방에 대한 인식이 확산되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구는 아나플라즈마증 의심환자에 대한 실험실 검사를 수행한 것으로 국내 아나플라즈마증 환자의 발생에 대한 근거 자료를 제공하고 급성열성질환으로 내원하는 환자의 아나플라즈마증에 대한 실험실 검사 자료를 제공하며 또한 유전학적인 검사법을 병행함으로써 아나플라즈마증의 현증 감염여부에 대한 자료를 제공하고자 한다. 아나플라즈마증 원인병원체의 국내 병원체 특성 파악과 더불어 국내, 국외, 임상환자, 매개체, 다양한 숙주에서 연구된 유전자 염기서열을 비교분석함으로써 국내 병원체의 유전적인 특성 및 예방관리를 위한 자료를 제공하고자 한다.

참고문헌

1. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulomcytotrophic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol. 1994;32:589–95.
2. Kim KH, Yi J, Oh WS, Kim NH, et al. Human graulocytic anaplasmosis, South Korea, 2013. Emerg Infec Dis. 2014;20::1708–11.
3. Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, et al. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in korean patients. J Clin Microbiol. 2002;40::3082–85.
4. Kim CM, Kim MS, Park MS, Park JH, et al. Identification of *Ehrlichia chaffeensis, Anaplasma phagocytophilum,* and *A.bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from korea. Vector Borne Zoonotic Dis. 2003;3:17–26.
5. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:236–47.
6. Chae JS, Yu DH, Shringi S, Klein TA, et al. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi–do near the DMZ, Korea. J Vet Sci.2008;9:285–93.
7. Kang JG, Ko S, Kim YJ, Yang HJ, et al. New genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* from Korean water deer(*Hydropotes inermis argyropus*). Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:929–38.
8. Yi J, Kim KH, Ko MK, Lee EY, et al. Human Granulocytic Anaplasmosis as a Caouse of Febrile Illness in Korea since at least 2006. Am J Trop Med Hyg. 2007 Jan 16. pii:16–309.