



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

20 년 2 월	2020년 2월 석사학위 논문
석사학위논문 제1부	
광주광역시 근교에서 포획한 야생설치류에서 한탄바이러스의 분자역학적 연구	<p style="text-align: center;"> 광주광역시 근교에서 포획한 야생설치류에서 한탄바이러스의 분자역학적 연구 </p>
성 서 미 명	<p style="text-align: center;"> 조선대학교 대학원 의 과 학 과 서 미 희 </p>

광주광역시 근교에서 포획한 야생설치류에서
한탄바이러스의 분자역학적 연구

Molecular Epidemiological Survey of Hemorrhagic Fever with Renal
syndrome(HFRS) in Wild Rodents Captured in Gwangju Metropolitan
suburban area

2020년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

서 미 회

광주광역시 근교에서 포획한 야생설치류에서
한탄바이러스의 분자역학적 연구

지도교수 김 동 민

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 12월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

서 미 희

서미희의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 건 (인)

위 원 조선대학교 교수 김동민 (인)

위 원 조선대학교 교수 김춘미 (인)

※ 석사학위신청논문인 경우에는 위원장과 2명의 위원으로 한다.

2019년 11월

조선대학교 대학원

목차

Abstract

국문초록

I. Introduction

II. Materials and Methods

II-1. 포획장소 및 야생들쥐 포획방법

II-2. 야생설치류 채혈 및 부검

II-3. Indirect Immunofluorescence assay

II-4. 폐조직에서 핵산추출

II-5. Nested reverse-transcription polymerase chain reaction

II-6. 염기서열 분석

II-7. 야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별요인에 관한 단면연구

III. Results

III-1. 설치류의 계절별 개체수

III-2. 설치류 종에 따른 한타바이러스에 대한 분포

III-2-1. 야생설치류 종에 따른 한타바이러스 검출

III-2-2. 계절별 한타바이러스 검출 분포

III-3. 계통수

III-4. 야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별요인과의 단면연구

IV. Discussion

V. References

ABSTRACT

Molecular Epidemiological Survey of Hemorrhagic Fever with Renal syndrome(HFRS) in Wild Rodents Captured in Gwangju Metropolitan suburban area

Mihee Seo

Advisor : Prof. Dong Min Kim, Ph.D. M.D.

Department medical science,

Graduate School of Chosun University

Haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) caused by Hantavirus has been one of the principal acute febrile disease in Korea. Hantaviruses are carried by numerous rodent species throughout the world. Especially, the *Apodemus agrarius*, the host of the Hantaan virus, is the most common wild rat, accounting for 90 percent of the wild rats living in Korea.

In this study, A total 585 wild rodents of 3 species(*A. agrarius*, *Crocidura lasiura*, *Myodes regulus*) were trapped from 2 area (Buk-gu, Gwangsan-gu) of Gwangju metropolitan suburban area in Korea from January 2016 to December 2018.

Indirect immunofluorescent antibody(IFA) was performed for hantaviruses infections using different hantavirus antigens. Hantavirus antibodies were found in 35(6.8%) out of 512 *A. agrarius*, 1(4.2%) of 24 *M. regulus*, and serologic evidence for Hantavirus infection was not found in 21 *C. lasiura*. Nested reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) was performed from rodents lung extract. Hantaan virus antigens were found in 6(1.2%) *A. agrarius*, 3(6.1%) *C. lasiura*, 2(8.3%) *M. regulus*. Genetic sequence of 11 cases of Hantaanvirus L-segment was compared and analyzed, showing 95% homology with Soochong virus.

This epidemiological information relating to Hantavirus is first reported throughout the year for three years in Gwangju Metropolitan city, therefore it could provide prevalence of Hantavirus and backgrounds to establishment of protection against Hantavirus and development of vaccine.

국문초록

광주광역시 근교지역에서 포획한 야생설치류에서 한탄바이러스의 분자역학적 연구

한탄바이러스에 의한 신증후군출혈열은 한국에서 매년 발생하고 있는 대표적인 급성열성 출혈성 질환이다. 한탄바이러스는 전세계 수 많은 설치류 종에 의해 매개된다. 특히 한탄바이러스의 숙주동물인 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)는 가장 흔히 볼 수 있는 야생들쥐로써 국내에 서식하는 들쥐의 90%를 차지한다.

본 연구에서 3종의 야생 설치류(*A. agrarius*, *Crocidura lasiura*, *Mydes regulus*)는 광주광역시의 근교에서 한탄바이러스 보유율을 조사하기 위해 2016년 1월부터 2018년 12월까지 광주광역시 근교의 2개 지역(북구, 광산구)에서 포획하였다. 야생설치류에서 항체보유율을 파악하기 위한 혈청학적 검사는 간접면역형광항체법(IFA)을 이용하였고, 총 585마리의 들쥐 혈청 중 한탄바이러스 IgG 항체양성은 등줄쥐(*A. agrarius*) 6.8%(35/512), 비단털들쥐(*M. regulus*) 4.2%(1/24)이었고, 땃쥐(*C. lasiura*)에서는 한탄바이러스 항체가 발견되지 않았다.

또한, 야생설치류에서 한탄바이러스 감염율을 파악하기 위한 유전학적 검사는 설치류의 폐장 조직에서 RNA를 추출하여 Nested RT-PCR을 수행한 결과, 등줄쥐 1.2%(6/512), 땃쥐 6.1%(3/49), 비단털들쥐 8.3%(2/24) 검출되었다.

설치류에서 검출된 한탄바이러스 11건의 시퀀스들을 양방향으로 비교 분석한 결과 170902, 170906, 170910, 171110 4건의 시퀀스는 Soochong Virus와 95%이상의 상동성을 보였고, 161006, 171202, 171210, 171212, 171213, 181108 6건의 시퀀스는 Jeju Virus와 85%이상의 상동성을 나타냈으며, 161115 1건의 시퀀스는 Imjin Virus와 89%이상의 상동성을 보였다.

본 연구결과는 광주 지역에서 처음으로 신증후군출혈열의 매개체인 야생 설치류에서 한탄바이러스 감염양상과 유행 시기 및 다양한 한탄바이러스의 종이 분포하고 있음을 밝혔으며 우리 지역에서 신증후군출혈열 예방대책 수립에 유용한 자료가 될 것이다.

I. Introduction

신증후군출혈열은 쯤쯤가무시증, 렙토스피라증과 함께 국내 대표적인 매개체 감염병으로 발열, 두통, 복통 및 신부전과 출혈이 특징이고 특히 저혈압기와 핏뇨기 때 쇼크, 급성신부전, 급성 호흡곤란 및 출혈 등으로 사망률이 높은 감염병이다(1,2).

원인체는 *Bunyaviridae*에 속하는 *Hantavirus*로 이 바이러스는 80~110nm크기의 구형형태로, 외피가 있는 (-) sense RNA바이러스이다. 이 바이러스 내부에는 L(Large), M(Medium), S(Small)의 분절된 세 종류의 유전자가 있는데 L분절은 바이러스의 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)를 암호화하며, M분절은 외피 당 단백질인 G1, G2 glycoprotein을 암호화하고, S분절은 nucleoprotein을 암호화한다(3).

한타바이러스 속에는 21종류의 혈청형과 30종 이상의 유전형이 알려져 있고, 한타바이러스(Hantaan virus), 서울바이러스(Seoul virus), 푸말라바이러스(Puumala virus)가 있는데, 이 중 한타바이러스가 중증의 신증후군출혈열을 일으키고, 신농브레바이러스(Sin Nombre virus), 안데스바이러스(Andes virus)는 한타바이러스 폐증후군(Hantavirus pulmonary syndrome, HPS)를 유발한다(4). 국내에서는 기존의 한타바이러스와 서울바이러스 이외에 다른 유전자형인 수청(Soochong), 무주(Muju), 임진(Imjin)바이러스가 추가적으로 확인되었다(5,6).

한타바이러스속 바이러스들은 각각 다른 종류의 야생설치류를 숙주로 삼고 있다. 한타바이러스의 숙주동물인 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)는 붉은쥐 속(Genus *Apodemus*)에 속하고 경작지나 야산에 서식하는 가장 흔히 볼 수 있는 야생들쥐로써 국내에 서식하는 들쥐의 90%를 차지하고 있다(7). 등줄쥐와 같은 속(Genus)에 속하는 흰뺨적다리붉은쥐(*Apodemus peninsulae*)는 등에 줄이 없으며, 주로 고도가 높은 산림지역에 서식하고 있고, 대륙밭쥐(*Myodes rufocanus*)는 들쥐 중 세번째로 흔하며 주로 고산지대의 산림이나 돌더미속에서 서식하고 있다. 갈밭쥐(*Microtus fortis*)는 건조한 곳을 싫어하며 주로 습지에서 서식한다. 식충목(Order *Insectivora*)에 속하는 뿔쥐(*Crocidura laciura*)는 경작지 주변의 밭둑에서 살며 주로 무척추 동물을 잡아먹고 산다(8,9).

서울바이러스(Seoul virus)는 도시지역의 집쥐(*Rattus rattus*)와 시궁쥐(*Rattus norvegicus*)가 숙주이고(10), 대륙밭쥐(*Clethrionomys glareolus*)가 숙주인 푸말라바이러스(Puumala virus)(11), 갈밭쥐(*Microtus fortis*)가 숙주인 프로스펙트힐바이러스(Prospect Hill virus)가 대표적으로 알려져 있다(12).

신증후군출혈열의 전파경로는 감염된 설치류의 타액, 오줌, 분변 등을 통해 바이러스가 체외로 배출된 이후, 공기 중에 건조되어 먼지와 함께 공중에 떠다니다가 호흡기를 통해 사람에게 감염되며, 드물게 매개체를 통해 전파된다(13,14).

신증후군출혈열의 실험실적 진단은 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 고밀도입자응집법(high density composite particle agglutination, HDP) 및 간접면역형광항체법(immunofluorescent antibody assay, IFA)등이 이용되고 있다(15). 또한 Vero E6세포를 이용한 바이러스 분리와 아형구별을 위해 쥐의 부검 조직을 이용한 reverse

transcriptase-polymerases chain reaction(RT-PCR)방법 및 신속한 진단과 정량적 검출방법인 real time polymerases chain reaction(RT-PCR)도 이용되고 있다(16,17).

한국이나 중국과 같은 온대지방에서는 신증후군출혈열 환자가 연중 발생하나, 주로 건조한 시기인 10월에서 12월에 가장 많이 발생한다(18). 질병관리본부의 자료에 따르면 신증후군출혈열은 1998년 이후 점차 증가를 보이며, 2008년 이후에는 매년 300~500명 이상의 환자가 지속적으로 보고되었고, 광주, 전남지역에서도 2010년부터 2017년까지 35~105명의 환자가 꾸준히 발생하고 있다(19).

현재 국내에서 들쥐에서 한탄바이러스에 대한 조사는 경기도, 강원도, 충남, 경북, 경남, 전북, 전남 등에서 이뤄졌으나, 광주지역에서는 매년 꾸준한 환자발생에도 불구하고 야생들쥐에서 한탄바이러스에 대한 조사가 없었으며, 또한 국내에서도 연중 정기적으로 장기간(2016~2018;3개년) 수행된 조사는 거의 없는 실정이다(7,20,21).

이에 본 연구는 광주지역의 설치류에서 항체가 조사를 통하여 한탄바이러스 감염양상과 유행시기를 파악하여 사람에서 신증후군출혈열의 예방 및 관리에 필요한 방역대책의 기초자료를 제공하고자 매년 정기적으로 조사하였다. 또한 설치류의 폐장조직에서 검출된 한탄바이러스의 염기서열 분석을 통해 우리 지역 내 설치류에서 유행하는 한탄바이러스의 종류를 찾아내어 향후 백신후보물질에 필요한 기초자료로 활용코자 한다.

II. Materials and Methods

II-1. 포획장소 및 야생들쥐 포획 방법

야생들쥐 포획을 위해 야산과 들판, 농가지역이 있는 광주시 근교의 북구와 광산구 2개 지역에서 각 지역에 5곳(휴경지, 논둑, 숲과 밭 경계, 무덤주변, 수변지역)을 선정하였다(Fig.1). 그리고 야생들쥐 포획은 야생동물 보호 및 관리에 관한 법률(환경부령-784호)에 관련하여 매년 관할 구청인 북구청과 광산구청에서 야생동물포획허가서를 발급받은 후 수행하였다.

포획기간은 2016년 1월부터 2018년 12월(3년)까지 매월 각각의 장소 당 10개의 Sherman live trap(3x3,5x9 inch, Bioquip, USA)를 설치해서 포획하였다. 야생들쥐의 먹이는 땅콩버터를 바른 건빵을 사용했고, 트랩설치는 오전 10시경부터 설치해서 트랩수거는 하절기(4월~10월)와 동절기(11월~3월)시기를 구분해 동절기는 밤 8시부터 수거하고 하절기에는 다음날 오전에 수거하였다.



Fig. 1. Map of wild rodent collection sites in Gwangju metropolitan suburban area.

1. Buk-gu(N35 ° 13' 51.7", E126 ° 54' 23.8"), 2. Gwangsan-gu (N 35 ° 09' 19.2", E 126 ° 45' 05.4").

II-2. 야생 설치류 채혈 및 부검

포획한 야생 설치류는 밀폐된 비닐용기에 넣고 클로로포름(Chloroform, Merck, NJ, USA)을 적신 솜을 함께 넣어 마취를 시킨 다음, 야생들쥐의 종 분류와 항체가 조사를 위하여 채혈하였다.

혈액채취는 마취가 된 야생들쥐 심장에서 주사기로 직접 0.5~1.0mL정도 채혈하고 혈청분리를 위해 원심분리(3,000rpm/5min. Eppendorf, Hamburg, Germany)한 후 4°C에 보관한 다음 실험에 이용하였고, 부검은 멸균된 수술용 가위와 핀셋을 이용해 무균적으로 폐장, 심장, 신장, 비장 및 림프절 등을 적출하여 실험에 이용하기 전까지 -70°C 초저온냉동고(ESCO, USA)에 보관하였다. 이러한 일련의 과정은 조선대학교 동물생명윤리위원회의 심의 후 승인받아 수행하였다(승인번호: CIACUC2016-S0003).

II-3. 간접면역형광항체법(Indirect immunofluorescent antibody assay, IFA)

한탄바이러스의 IgG항체 혈청학적 검사를 위해 간접면역형광항체법을 수행하였다. 한탄바이러스 IFA용 슬라이드는 질병관리본부로부터 분양받은 후, -70°C 초저온냉동고(ESCO, USA)에 보관하면서 실험에 사용하였고, 검사방법은 질병관리본부 감염병 진단지침에 따라 간접면역형광항체법으로 수행하였다(17).

즉, 한탄바이러스 항원 슬라이드의 각 well에 인산완충식염수(Phosphate buffered saline;PBS)로 1:16부터 1:2048까지 계단 희석한 혈청을 25 μ L씩 떨어뜨린 후 37°C에서 30분 반응시켰다. 이후 PBS와 증류수로 각각 5분간 세척한 후 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma, St. Louis, USA)용액을 25 μ L 떨어뜨리고 37°C incubator에서 30분 반응한 후에 세척하였다. 항원 슬라이드를 건조시킨 후 곧바로 항원 슬라이드에 mounting solution(sigma, St. Louis, Missouri, USA)을 25 μ L떨어뜨리고 cover slide를 덮어 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 400배에서 관찰하여 세포질 부분에 1:16배 이상부터 한탄 바이러스 특이 형광spot이 보이면 양성으로 판정하였다(Fig. 2)

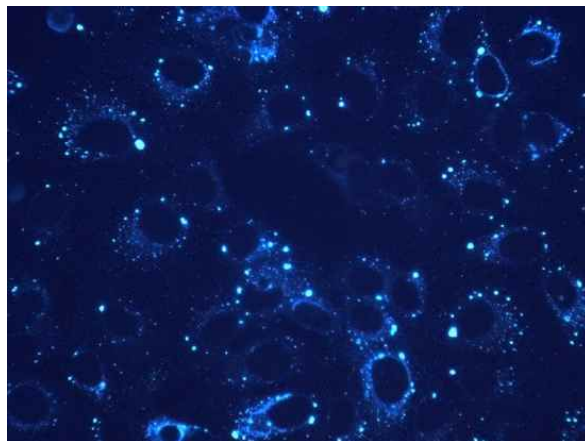


Fig. 2. IgG antibody detection of Hantaanvirus by immunofluorescent antibody(IFA) test to the wild rodents trapped in Gwangju metropolitan suburban areas.

II-4. 폐 조직에서 핵산추출

적출한 폐장 조직을 cell strainer(Becton Dickinson, USA)위에 올리고 DNase, RNase free syringe 막대를 이용하여 Biosafety cabinet(ESCO, USA)에서 무균적으로 처리한 후, PBS 500 μ L를 가하여 균질화 시킨 뒤, RNA추출 전까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 폐조직에서 RNA추출은 QIAamp Viral RNA Mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 즉, 폐장 유제액 140 μ L에 AVL buffer 560 μ L, carrier RNA buffer 5.6 μ L씩 첨가하여 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 10분 동안 반응시켰다. 여기에 Ethanol 560 μ L을 넣고 혼합한 후, 혼합액은 spin column으로 옮겨서 8,000rpm에 1분간 원심 분리(Eppendorf, Germany)하였다. 그리고 washing buffer1을 500 μ L첨가하고 8,000rpm에서 1분간 원심 분리한 후, 여기에 washing buffer2를 500 μ L넣고 14,000rpm에서 3분간 원심 분리하고 다시 14,000rpm에서 1분간 원심 분리하였다. Column에 새로운 collection tube를 장착하고 elution buffer 60 μ L를 넣어 1분 동안 정치시킨 후 8,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 추출된 60 μ L RNA중 8 μ L를 RT-PCR을 위한 cDNA합성에 사용하였다(Fig 3).

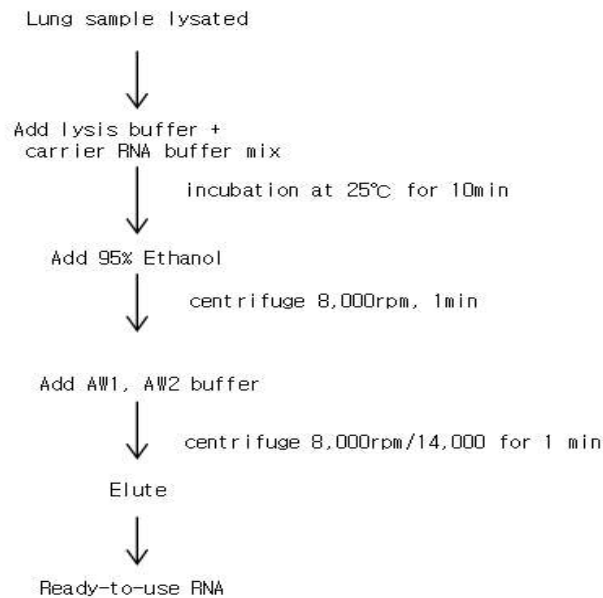


Fig 3. The process of extracting RNA from wild rodents lung tissue.

II-5. cDNA합성과 이중 역전사 중합효소연쇄반응(Nested reverse-transcription polymerase chain reaction, nested RT-PCR)

역전사 중합효소연쇄반응은 김 등이 제시한 방법으로 실험하였다(21). cDNA합성을 위해 추출한 RNA 8 μL를 SuperScript VIL0 MasterMix(Invitrogen, Massachusetts, USA)에 넣고, 25°C에서 10분, 42°C에서 30분, 85°C에서 5분간 역전사 반응 후 nested RT-PCR을 수행하였다. 1차 PCR을 위해 cDNA가 첨가된 반응액을 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)에 넣고, 95°C에서 5분간 1회 변성시킨 다음, 95°C 30초, 49°C 30초, 72°C 45초의 반응을 35회 반복하고 72°C에서 7분간 반응을 1회 실시하였다. 2차 PCR 반응은 2 μL의 1차 PCR산물에 1차 PCR과 동일한 조성으로 95°C 5분 열 변성 후, 94°C 20초, 54°C 20초, 72°C 30초의 반응을 35회 반복하고 72°C에서 7분간 1회 실시하여 한탄바이러스 유전자를 검출하였다(Table 1).

Table 1. Primers(L segment) for Hantavirus antigen detection and Nested RT-PCR condition.

Target gene	PCR	Primers name	Sequence	Product size(bp)	Reference
L segment	Nested RT-PCR (1st PCR)	HAN-L-F1 HAN-L-R1	5' -ATGTAYGTBAGTGCWGATGC-3' 5' -AACCADTCWGTGCCATC-3'	450	(28), 2006
	Nested RT-PCR (2nd PCR)	HAN-L-F2 HAN-L-R2	5' -TGCWGATGCHACIAARTGGTC-3' 5' -GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA-3'	380	

II-6. 염기서열 및 계통 분석

L분절의 전체 염기서열 및 아미노산 서열을 다른 한탄바이러스와 비교 분석하기 위해 GeneBank에 등록되어 있는 L분절의 염기서열을 사용하였다(22).

야생설치류 폐장에서 검출한 한탄바이러스 PCR 증폭산물은 정제 후 염기서열 결정을 위해 코스모진텍(Daejeon, Korea)에 보내어 염기서열 분석을 위해 ABI 3730 XL DNA Analyzer(Applied biosystems, Massachusetts, USA)와 PCR에 사용된 primers를 이용하여 양방향으로 그 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(National Institutes of Health)의 BlastN program(Bethesda MD, USA)를 이용하여 분석하였다. 또한, 계통수(Phylogenetic tree)작성은 Clustal W(DNAstar 5.0, USA)프로그램으로 정렬하여 MEGA 6.0 software(USA)를 이용하여 작성하였고, 생물 종(Species)간 분석에 사용되는 Neighbor-joining Minimum evolution method와 Kimura 2-parameter model(bootstrap 1,000 replication)을 사용하였다.

II-7. 광주지역 야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별요인에 관한 단면연구

야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별 위험요인과의 상관관계를 밝히기 위하여 2016년 1월부터 2018년 12월까지 신증후군출혈열 IgG 항체 양성으로 확인된 개체수를 SPSS 20(IBM, New York, USA) 프로그램을 이용하여 계절별 요인을 변수로 하여 로지스틱 회귀분석을 수행하였다.

III. Results

III-1. 포획 설치류의 계절별 개체 수

2016년부터 2018년까지 광주 2개 지역에서 포획한 야생 설치류는 총 585마리 중 계절별로 봄(3~5월) 164마리(28.0%), 여름(6~8월) 155마리(26.5%), 가을(9~11월) 123마리(21.0%), 그리고 겨울(12~2월) 143마리(24.4%)가 포획되었다(Table. 2).

야생 설치류의 형태학적 분류키(23)를 참조하여 설치류를 등줄쥐(*Apodemus agrarius*), 땃쥐(*Crocidura lasiura*), 비단털들쥐(*Myodes regulus*) 세 종류로 분류하였고(Fig 4), 광주 지역에서 포획된 총 개체수 585마리 중 등줄쥐 512마리(87.5%), 땃쥐 49마리(8.4%), 비단털들쥐 24마리(4.1%)였다(Table. 2).

Table 2. Seasonal distribution of wild rodents captured in Gwangju metropolitan suburban areas, from 2016 to 2018

Species of wild rodents	Season				
	Total(%)	Spring 3~5/month	Summer 6~8/month	Fall 9~11/month	Winter 12~2/month
Total(%)	585	164(28.0)	155(26.5)	123(21.0)	143(24.4)
<i>Apodemus agrarius</i>	512 (87.5)	146	154	94	118
<i>Crocidura lasiura</i>	49 (8.4)	11	1	26	11
<i>Myodes regulus</i>	24 (4.1)	7	0	3	14

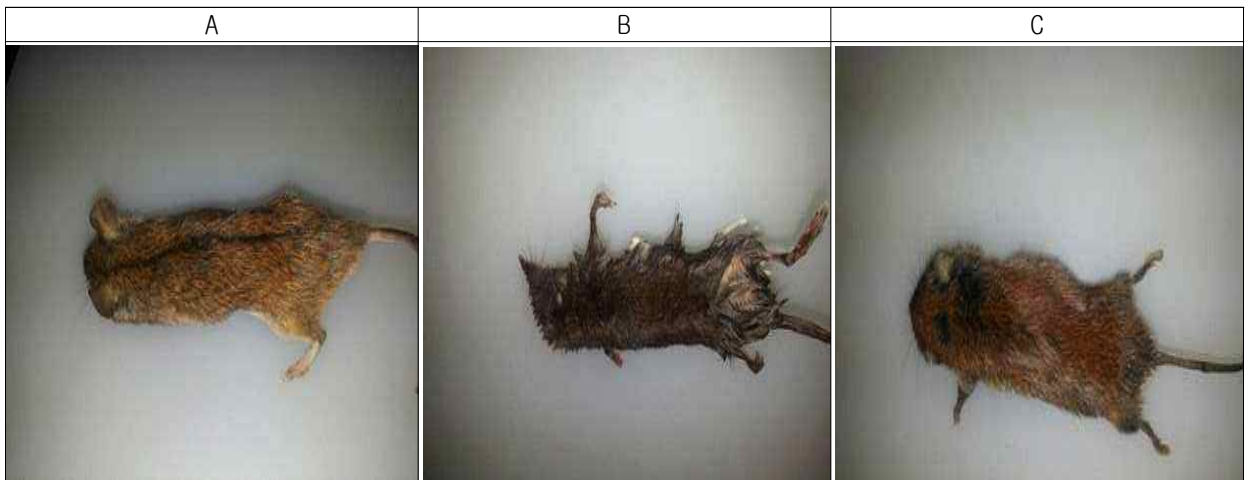


Fig. 4. Morphological classification of captured wild rodents in Gwangsan-gu and Buk-gu from 2016 to 2018 (A. *Apodemus agrarius*, B. *Crocidura lasiura*, C. *Myodes regulus*).

III-2. 야생 설치류 중에서 한타바이러스에 검출

III-2-1. 야생설치류 종에 따른 한타바이러스 검출

2016년부터 2018년까지 포획한 야생 설치류 585마리의 폐 조직에서 RNA를 추출하여 한타바이러스 L segment를 타겟으로 nested RT-PCR을 수행한 결과 11마리(1.9%)에서 한타바이러스 DNA를 검출할 수 있었다. 그 중 등줄쥐 512마리에서 6마리, 땃쥐 49마리에서 3마리 그리고 비단털들쥐 24마리에서 2마리가 한타바이러스 L절편에 해당하는 유전자를 검출할 수 있었다.

또한, 야생들쥐에서 분리한 혈청 585건에 대해 간접면역형광항체법으로 항체 유무를 조사한 결과 등줄쥐 35마리에서 한타바이러스에 대한 IgG 항체 양성을 나타내 항체 양성률은 6.8%였다. 비단털들쥐 1마리에서 한타바이러스에 대한 항체 양성을 나타내 4.2%였고, 땃쥐에서의 한타바이러스 항체가 검출되지 않았다(Table3).

Table 3. Prevalence of hantavirus infection of wild rodents in Gwangju metropolitan suburban areas, from 2016 to 2018.

Species	Rodents Total	No. Positive by RT-nested PCR(%)	No. Positive by IFA test(%)
Total	585	11(1.9)	36(6.2)
<i>Apodemus agrarius</i>	512	6(1.2)	35(6.8)
<i>Crocidura lasiura</i>	49	3(6.1)	0
<i>Myodes regulus</i>	24	2(8.3)	1(4.2)

III-2-2. 계절별 한타바이러스 검출 분포

야생 들쥐의 한타바이러스에 대한 계절별로 분석한 결과는 한타바이러스 유전자에 대해서는 총 11마리 중 가을에 7마리(5.7%)가 검출됨으로써 가장 많이 검출되었고, 겨울에 4마리(2.8%)가 검출되었다. 한편, 한타바이러스 IgG항체 검사결과는 봄에 12마리(7.3%)로 가장 많았고, 여름에 11마리(7.1%), 가을에 7마리(5.7%), 겨울에 6마리(4.1%)순이었다.

Table 4. Seasonal distribution of Hantavirus in wild rodents from 2016 to 2018.

Factor	Hantavirus antigen/antibody			
	Hantavirus IgG		Hantavirus Ag	
	Test	No. Positive by IFA test(%)	Test	No. Positive by RT-nested PCR(%)
Total	585	36(6.2)	585	11(1.9)
Spring	164	12(7.3)	164	-
Summer	155	11(7.1)	155	-
Fall	123	7(5.7)	123	7(5.7)
Winter	145	6(4.1)	145	4(2.8)

III-3. 계통수

야생 설치류에서 한타바이러스 L segment를 타겟으로 nested RT-PCR을 수행 후 11건의 PCR 양성 반응이 관찰되었으며, 이들의 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열들을 한타바이러스 L segment를 기반으로 국내외에서 검출되었던 염기서열들과 비교하여 분석하였다.

염기서열 분석된 11건의 한타바이러스 양성 중 Soochong virus와 가장 높은 상동성을 보인 4건의 시퀀스 중 3건(170902, 170906, 171110)은 등줄쥐, 1건(170910)은 비단털들쥐에서 검출되었다. Jeju virus와 가장 높은 상동성을 보인 6건의 시퀀스 중 3건(161006, 171202, 181108)은 땃쥐에서 검출되었고, 2건(171210, 171212)은 등줄쥐에서 그리고 1건(171213)이 비단털들쥐에서 검출이 되었다. 그리고 Imjin virus와 가장 높은 상동성을 보인 1건(161115)은 등줄쥐에서 검출되었다 (Fig.5).

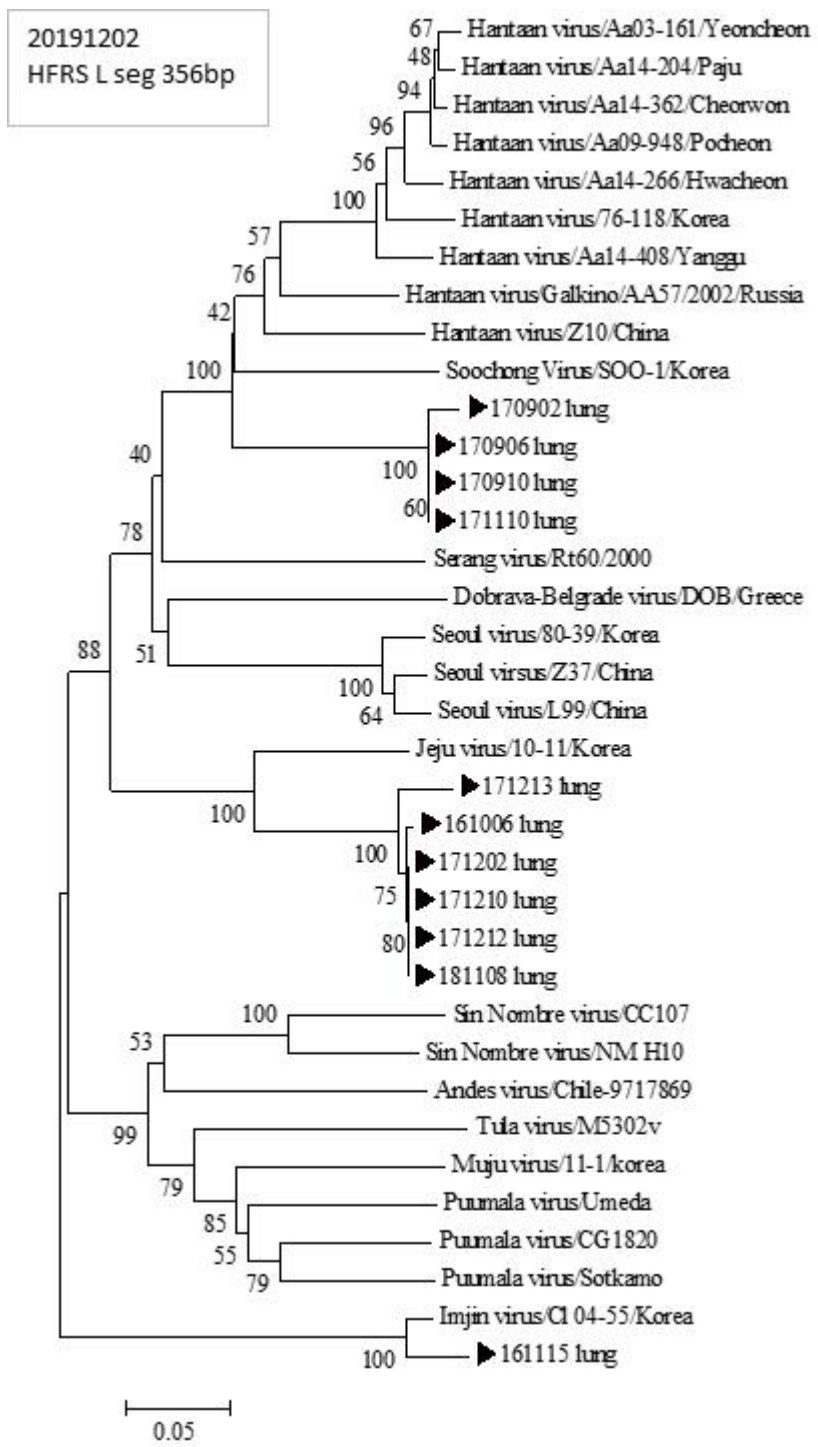


Fig. 5. Phylogenetic tree based on partial L segment sequences from GenBank and Hantavirus-positive wild rodent specimens captured in Gwangju metropolitan suburban areas, from January 2016 to 2018.

III-4. 야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별 요인과의 단면연구

광주지역 야생 설치류에서 신증후군출혈열 감염과 계절별요인과의 로지스틱회귀분석결과 야생설치류에서 봄(OR 1.369, CI 0.594-3.153, P>0.05)과 여름(OR 1.110, CI 0.511-2.409, P>0.05)에 위험성을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

Table 5. Hantavirus IgG seroprevalence with Monthly factors in wild rodents from January 2016 to December 2018. by logistic regression test using SPSS 20 program

Factor		Hantavirus IgG				
Month	Test	Positive	Odd Ratio (OR)	95% confidential interval	P-value	
Total	585	36				
Spring (March, April, May)	164	12	1.369	0.594-3.153	0.461	
Summer (June, July, August)	155	11	1.110	0.511-2.409	0.792	
Fall (September, October, November)	123	7	0.842	0.405-1.751	0.645	
Winter † (December, January, February)	145	6	-	-	-	

Winter † : Reference category

IV. Discussion

신증후군출혈열은 국내에서 매년 500명 이상 꾸준히 발생하는 대표적인 설치류 매개 발열성질환으로 특히 가을철에 주의가 요구되는 감염병이다. 사람에서 신증후군출혈열의 발생에 대한 예방대책 수립을 위해서는 설치류에서 신증후군출혈열의 원인체인 한타바이러스의 유행양상과 유전자형을 파악하는 것이 필수적이다. 그러나 광주 지역에서 야생 설치류에 대한 신증후군출혈열의 감염양상에 관한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 광주 지역 야생 설치류에서 한타바이러스 감염율과 유전자형을 밝히고 계절요인과 상관성을 규명하여 시민들에게 신증후군출혈열 예방을 위한 기초자료를 제공코자 하였다.

2016년 1월부터 2017년 12월까지 광주지역에서 채집한 야생 설치류의 포획결과는 총 585마리였으며 이 중 512마리(87.5%)가 등줄쥐로 우점종이었다(Table.2). 이러한 결과는 광주와 인접한 지역인 전남지역에서 수행했던 송 등(18)과 우 등(33)의 보고에서도 각각 88.0%와 87.7%로 등줄쥐가 우점종이라는 연구와 일치하였고, 3년간의 연구결과를 통하여 광주지역에서도 야생 설치류의 우점종이 등줄쥐라는 것을 확인하였다. 이와 달리 강원도의 경우 흰넓적다리붉은쥐(*Apodemus peninsulae*)가 40.3%로 우리나라에서 두번째로 흔한 들쥐로 고도 500미터 이상인 산악지역에서 흔히 볼수 있는 들쥐 종이다(34).

야생 설치류에서 한타바이러스 감염율을 확인하기 위하여 간접면역형광항체법으로 항체보유율을 조사한 결과 한타바이러스 IgG에 대한 항체양성률은 양성판정기준을 1:16이상으로 하였을 때, 월청 총585건 중 36마리(6.2%)에서 한타바이러스 IgG항체 양성을 확인하였다(Table 3,4). 이러한 항체보유율 결과는 국내에서 보고되었던 송 등(18)의 13.4%, 남 등(29)의 7.9%와 비교하여 볼 때 약간 낮거나 유사하게 나타났다. 한타바이러스 IgG항체 양성보유율의 계절별 분포는 봄·여름에 63.8%, 가을·겨울철에는 36.1%로 낮게 나왔는데 노 등(35)의 10월~12월의 항체가 양성률 41.3%와 비교하였을 때 차이가 나는 이유는 들쥐에서의 항체가 조사가 아닌 신증후군출혈열 환자의 항체가 조사이기 때문이고 또, 항원 검사가 아닌 IgG 항체를 검사해 가을·겨울에 감염되어 봄과 여름이 더 항체 양성률을 보였을 것이라 생각된다.

그리고 야생 설치류에서 분포하는 한타바이러스의 유전자형을 밝히기 위하여 포획한 설치류의 폐조직에서 RNA를 추출하여 nested RT-PCR을 수행한 결과, 총 개체수 585마리 중 등줄쥐 512마리(87.5%)중 6마리(1.2%), 땃쥐 49마리(8.4%)중 3마리(6.1%), 비단털들쥐 24마리(4.1%)중 2마리(8.3%)로 이렇게 모두 11마리에서 한타바이러스 L segment에 해당하는 유전자를 검출할 수 있었다(Table. 3,4). 한타바이러스 유전자에 대해 계절별 분포는 9~11월 사이에 7건(5.7%), 12월에 4건(2.8%)이었고, 봄과 여름에는 검출되지 않았다. 이 시기에 신증후군출혈열이 많이 발생하는 이유는 한타바이러스의 주요 숙주동물인 등줄쥐가 가을 번식기에 많은 활동을 하며, 특히 임신한 등줄쥐는 일반 등줄쥐에 비해 2배 이상의 배설물을 분비하여 이 배설물 속의 한타바이러스가 사람의 호흡기를 통해서 전파될 확률이 높을 수 있다는 보고가 있다(30). 야생 설치류의 종별로는 등줄쥐, 땃쥐, 비단털들쥐에서 모두 한타바이러스 유전자가 검출되었고(Table. 3,4), 광주지역에서도

이러한 야생설치류 3종이 사람들에게 한타바이러스를 옮길 수 있는 종으로 판단된다.

광주지역 설치류에서 검출한 한타바이러스 11건 중 4건(170902, 170906, 170910, 171110)은 2006년 한국에서 보고된 흰넓적다리붉은쥐에서 검출된 한타바이러스의 일종인 수청바이러스(DQ056292)와 98%이상의 상동성을 보였고, 이 수청바이러스는 한타바이러스와 함께 아시아에서 유행하는 대표적인 한타바이러스의 일종으로 보고되었다(31,35). 6건(161006, 171202, 171210, 171212, 171213, 181108)은 2012년 한국에서 보고된 땃쥐에서 확인된 제주바이러스(HQ834697)와 85%이상의 상동성을 보여주었으며(36), 나머지 1건(161115)은 2009년 한국에서 보고된 땃쥐에서 검출된 임진바이러스(EF641807.1)와 95%이상의 상동성을 보였다(Fig.5). 이러한 결과는 광주 지역에서는 국내 설치류에서 보고된 한타바이러스와 같은종류의 한타바이러스가 존재함을 보여주었다(37).

광주지역 야생 설치류에서 신증후군출혈열과 계절별요인과의 한타바이러스 IgG 항체가 단면연구결과는 겨울을 기준으로 봄에는 1.3배, 여름에는 1.1배, 가을에는 0.8배 높았으나 P-value값이 0.05 이상이므로 통계적으로 의미가 없어 어느 특정계절에 유의한 결과는 보여주지 않아 신증후군출혈열을 예방하기 위해서는 연중 야생설치류에 주의해야할 것으로 판단되었다(Table.5). 이에 대한 보완으로 계절별로 더 많은 설치류를 포획하여 한타바이러스에 대해 조사하여야 할 것이다.

본 연구결과는 야생 설치류에서 특정기간에 한정되어있는 다른 연구와 비교해봤을 때, 3년에 걸쳐 연중 월별로 수행하였기 때문에 시민들에게 신증후군출혈열 예방을 위하여 신뢰성있는 데이터를 제시해줄 수 있다고 사료되며, 본 연구결과에서 확인한 광주지역 야생설치류의 한타바이러스 감염율과 확인된 다양한 한타바이러스 종들은에 대한 정보는 국내 신증후군출혈열에 대한 백신 후보물질 개발 및 예방대책수립에 중요한 자료가 될 것이다.

V. References

- 1) Lednicky JA. Hantaviruses. a short review. Arch Pathol Lab Med 127:30-5, 2003.
- 2) Kim HY, M.D. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. 2009.
- 3) Baek LJ, Soochong virus: An antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from Apodemus peninsulae in Korea. 2005.
- 4) Song JW, Puumala-related novel hantavirus from *Eothenomys regulus*. The 4th Interational Conference on HFRS and Hantaviruses, Atlanta, Georgia, USA, abstract 196 pp, March 5-7, 1998.
- 5) Lee HW, Baek LJ, Doo CD: The study on breeding season of Apodemus agrarius, the natural host of Korean haemorrhagic fever. Kor J Virol 11: 1-8, 1981.
- 6) Johnson KM. Hantaviruses: history and overview. Curr Top Microbiol Immunol 256:1-14, 2001.
- 7) Baek LJ, Song KJ, Chung KM, Kho EY, Park KS, Lee YJ: Seroepidemiological Study on Hantavirus Infection of Wild Rodents Captured in the Mountainous Areas of Korea. Journal of Bacteriology and Virology. p287 - 293, 1999.
- 8) Song KJ, Yun HS, Kho EY, Chung KM, Park KS, Lee YJ, Song JW, Baek LJ: Isolation of Apodemus peninsulae-borne Hantavirus and Comparison of Molecular Biological Characteristics. Journal of Bacteriology and Virology. p19-28, 2000.
- 9) Lee HW, Baek LJ, Johnson K,M: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats. J. Infec. Dis., 146 : 638-644.
- 10) Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara R, Goldgaber D, Gibbs CJ Jr: New hemorrhagic fever with renal syndrom-related virus in indigenous wild rodents in United States. Lancet ii: 1405, 1982.
- 11) Padula PJ, Edelstein A, Miguel SDL, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD: Hantavirus Pulmonary syndrome outbreak in Argentina: Molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323-330, 1998.
- 12) 김성권, 장숙희, 김연수, 허우성, 임춘수: Nuclotide Sequence Analysis and Establishment of Molecular Epidemiology of Hantaviruses Isolated from Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Korea, 90:27-30, 1997.
- 13) 질병관리본부 국립보건연구원. 감염병 실험실 진단 일반시험법. p138-141, 2003.
- 14) Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, Lee JS, Lee PW. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the Seoul virus. Nephron 71:419-27, 1995.
- 15) Lee HW. Epidemiology and epizootology. In: Lee HW, Calisher C, Schmaljohn C, eds. Manual of Hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. p39, Seoul, ASAN Institute for Life Sciences, 1999.

- 16) 이호왕, 이평우: 한국형출혈열 1. 원인항원 및 항체증명. 대한내과학회잡지 19: 371-383, 1976.
- 17) 질병관리본부;Korea Centers for Disease Control, 2017.
- 18) Song HJ, Lee DY, Kim CM, Shin YH : Epidemiological Survey of Hantaan Virus Infection of Wild Rodents Trapped in Jeollanam-do, 2003~2004. Journal of Bacteriology and Virology, Vol. 36(3), p.205 - 210 2006.
- 19) Chung SY, Song KJ, Song JW, Moon SS, Kim EJ, Park KS, Kee SH, Baek LJ: Serological Characterization of Soochong and Muju Virus as New Serotype of Hantavirus. Journal of Bacteriology and Virology, 35(3), 249-255, 2005.
- 20) Baek LJ, Song KJ, Song JW, Chung KM, Kho EY, Park KS, Lee YJ: Seroepidemiological Study on Hantavirus Infection of Wild Rodents Captured in the Moutains of Kangwon Province in Korea. J. Korean. Soc. Virology, Vol.28(3): 287-293, 1998.
- 21) Galeno H, Mora J, Villagra E, et al: First human isolate of hantavirus (Andes virus) in the Americas.
- 22) KIM EJ, Moon SS, Song KJ, Song JW, Park KS, Baek LJ: Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of M and L Segment of Soochong Virus. Journal of Bacteriology and Virology. Vol 37(2):111-118, 2007.
- 23) Jeon SP Ecology and Control of Rodents, 1 edition, Seominsa, p54-55. 1987.
- 24) www. cfsph.iastate.edu: Hantavirus Disease, 2018.
- 25) 질병관리본부 국립보건연구원. 감염병 실험실 진단 일반시험법. 2017.
- 26) Iowa state university. Hantavirus Disease. The center for Food Security & Public health 1-11, 2018.
- 27) Laenen lies, Vergote V, Kafetzopoulou LE, Wawina TB, Vassou D, Cook JA, Hougot JP, Deboutte W, Kang HJ, Witkowski PT, Koppen-Rung P, KrugerDH, Lickova M, Stang A, Strieskova L, Szemes T, Markowski J, Hejduk J, Kafetzopoulos D, Ranst MV, Yanagihara R, Klempa B and Maes P. A novel hantavirus of the European Mole, Bruges virus, is involved in frequent Nova virus Coinfections. Genome Biol. Evol. 10(1): 45-55,2017.
- 28) Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompt E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. Emerg Infect Dis. 2006;12:838-40
- 29) Nam JH, Yu CH, Hwang KA, Chun JE, Choi TK, Choi WY, Kim IB, Lee CH, Ju YR, Park KY: Serologic and Genetic Characterization of Hantavirus from Apodemus Mice Captured in Kyonggi-do and Gangwon-do, 2001.J Bac Vriol 32:83-92, 2002.
- 30) Lee HW, Park SB, Chu Yk : Seroepidemiological Study of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome from 1980 to 1987 in Korea . J Kor Soc of Virol 18: 131-142, 1988.
- 31) Arai,S., Gu,S.H., Baek,L.J., Tabara,K., Bennett,S.N., Oh,H.S., Takada,N., Kang,H.J.,

- Tanaka-Taya,K., Morikawa,S., Okabe,N., Yanagihara,R. and Song,J.W.: Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology* 424(2):99-105,2012
- 32) Woo YD, Chu YK, Longzhu Cui, Lee HW: Seroepidemiological Survey of Hantavirus Infection of Wild Rodents Trapped from 1994 to 1998 in Korea *J Bac Virol* 33: 51-57, 2003.
- 33) 백락주, 강주일, 송기준, 고은영, 정기모, 박광숙, 이용주, 송진원: 한국 산악지역에서 채집한 야생들쥐의 한타바이러스 감염에 대한 혈청역학적 연구. *대한바이러스학회지* 29(1):1-9, 1999.
- 34) Noh YT, Cho JE, Han MG, Lee NY, Kim WY, Chu CS, Lee HD, Nam JH, Park KY, Shin YH, Cho HW, Song HT, Ju YR: Seroepidemiological Characteristics of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome from 1996 to 2005 in Korea. 2006. *J Bac Virol* 36:263-269.
- 35) Baek LJ1, Kariwa H, Lokugamage K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kang JI, Moon SS, Chung SY, Kim EJ, Kang HJ, Song KJ, Klein TA, Yanagihara R, Song JW: Soochong virus: an antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J Med Virol*. 2006 Feb;78(2):290-7.
- 36) Satoru Arai,a,1 Se Hun Gu,b,1 Luck Ju Baek,b Kenji Tabara,c Shannon Bennett,d Hong-Shik Oh,e Nobuhiro Takada,f Hae Ji Kang,d Keiko Tanaka-Taya,a Shigeru Morikawa,g Nobuhiko Okabe,a Richard Yanagihara,d and Jin-Won Songb: Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*. 2012 Mar 15; 424(2): 99-105.
- 37) Song JW , Hae Ji Kang, Se Hun Gu, Sung Sil Moon, Shannon N. Bennett, Ki-Joon Song, Luck Ju Baek, Heung-Chul Kim, Monica L. O' Guinn, Sung-Tae Chong, Terry A. Klein, and Richard Yanagihara: Characterization of Imjin Virus, a Newly Isolated Hantavirus from the Ussuri White-Toothed Shrew (*Crocidura lasiura*). *JOURNAL OF VIROLOGY*, June 2009, p. 6184-6191.