

국내 환자에서 분리된 *Orientia tsutsugamushi*에서 doxycycline 내성

대성병원 내과¹, 인하대학교 의과대학 임상의학연구소², 내과학교실³, 미생물학교실⁴
 김은실¹ · 김미경² · 이해명² · 길세희² · 정문현³ · 이진수³ · 강재승⁴

Doxycycline Resistance in *Orientia tsutsugamushi* Isolated from Korean Patients

Eun Sil Kim, M.D.¹, Mee Kyung Kim, Ph.D.², Hye Myung Lee, M.S.², Se-Hee Kil, M.S.²
 Moon-Hyun Chung, M.D.³, Jin-Soo Lee, M.D.³ and Jae-Seung Kang, M.D.⁴

¹Department of Internal Medicine, DaeSung General Hospital, Bucheon

²Clinical Research Center, ³Department of Internal Medicine, ⁴Department of Microbiology, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

Background : Doxycycline has been the drug of choice for the treatment of scrub typhus. However, scrub typhus with poor response to doxycycline was first reported in Thailand in 1996. To date, it is not known whether doxycycline resistant scrub typhus is present in Korea. To investigate the doxycycline resistance of scrub typhus in Korea, we performed an experiment to evaluate the degree of growth inhibition of *Orientia tsutsugamushi* at the minimal inhibitory concentration (MIC) of doxycycline.

Materials and Methods : 37 isolates of *Orientia tsutsugamushi* were collected from Korean patients with scrub typhus during 10 year period (from 1997 to 2007). 34 isolates consisted of Boryong serotype or related serotypes. These strains were stained with FS15, a monoclonal antibody against the linear epitope on the protein located at the outer membrane of *O. tsutsugamushi*. Three isolates were confirmed as serotype Gilliam, which was stained by anti-Gilliam antibody. The antibody-stainable 35 isolates were incubated in media containing 0.1 and 0.2 µg/mL of doxycycline for 3 days. Then the growth indices of *Orientia* were measured by flow cytometry. If the growth index was greater than 10%, the isolate was tentatively classified as an isolate resistant to doxycycline and its MIC was measured.

Results : Demographic and treatment data were similar to the results of previous reports. Infection was mainly observed in Incheon and the Chungcheongnam province. No patient showed delayed response to antibiotics. Of 35 hospitalized patients, 4 (11.4%) were managed at the intensive care unit, and 1 (2.9%) died of nosocomial pneumonia. All the 2 patients whose isolates were serotype Gilliam Yonchon/Ikeda-like strain were managed at the intensive care unit.

Six of the 34 isolates from Korean patients exhibited growth indices greater than 10% at the MIC of doxycycline; however, the MICs of these isolates did not exceed 0.2 µg/mL. One isolate of serotype Gilliam showed an MIC of 0.0125 µg/mL, which seemed to be underestimated due to weak fluorescence of the anti-Gilliam antibody.

Conclusions : Although the number of tested isolates is small, insensitivity of scrub typhus to doxycycline is not a major reason for treatment failure in Korea. Serotype Gilliam, especially Yonchon/Ikeda-like strain, may be associated with severe form of scrub typhus. More studies concerning the antibiotic susceptibility for serotype Gilliam are warranted.

Key Words : *Orientia tsutsugamushi*, Scrub typhus, Doxycycline, Resistance

Submitted : 20 August 2008, Accepted : 30 September 2008

Correspondence : Moon-Hyun Chung, M.D.

Department of Internal Medicine, Inha University Hospital Shinheung-dong,

Jung-gu, Incheon 400-712, Republic of Korea

Tel : +82-32-890-2202, Fax : +82-32-882-6578

E-mail : mhchungid@paran.com

서 론

쯔쯔가무시병 치료에는 여러 항균제가 사용되지만, 사용 경험, 치료 속도, 재발률, 부작용을 고려하면 독시사이클린

이 선택약이다. 1996년부터 타일랜드에서 독시사이클린 저감수성 *Orientia tsutsugamushi* 감염이 보고되고 이들에서 독시사이클린 치료 효과가 늦음이 보고되면서(1), 찌쯔가무시병 치료에 대해 다시 생각하게 되었다.

국내에서도 이런 저감수성 주의 감염이 우려되고, 독시사이클린에 반응이 느린 예들이 있기는 하지만(2), *O. tsutsugamushi*에서 독시사이클린의 항균제 감수성 검사가 이루어지지 않아, 일부 환자에서 보이는 지연 반응이 저감수성의 *Orientia* 감염 때문인지 다른 원인에 의해서인지는 구분이 어려웠다. 치료 전 증상 지속 기간, 합병증의 발생과 기저질환의 유무, 알코올 금단현상이나 스테로이드 중단에 따른 부신저하증으로 생긴 발열, 약물 상호 작용 등이 임상 반응에 영향을 미칠 수 있으며, 특히 주사용 독시사이클린을 사용하지 못하므로 찌쯔가무시병 초기에 투여한 경우 독시사이클린의 흡수율이 낮아 반응이 늦을 수 있다. 이를 구분하기 위해서는 많은 환자를 전향적으로 조사해야 하며 동시에 혈중 농도를 측정해야 하지만 현실적으로 어려움이 많으므로, 이보다는 *O. tsutsugamushi*의 최소억제농도를 측정하는 것이 더 빠른 해결 방법이다.

국내에도 독시사이클린 저감수성 *O. tsutsugamushi* 주가 존재하는지 알기 위해 10년에 걸쳐 분리한 *O. tsutsugamushi*를 최소억제농도의 항균제가 포함된 배지에서 배양하여 성장 정도를 측정하였다. 동시에 *Orientia*가 분리된 환자들의 기본 인구 정보, 추정 감염 지역, 중환자실에서 치료 여부, 치료제 투여와 입원 기간을 조사하였다.

재료 및 방법

찌쯔가무시병에 합당한 증상이 있어 대학병원 외래에 온 또는 입원한 환자에서 혈액 2 cc를 무균적으로 뽑아 EDTA 튜브에 담아 응고를 막은 후, 0.3-0.5 cc를 사람 배꼽정맥 유래 내피세포주(human umbilical vein-derived endothelial cell line)인 ECV304 세포 단층에 접종하고 배양하였다. 이후 세포가 떨어져 나가거나 세포 모양에 변화가 있으면 세포를 떼어내 실험실에서 자체 제작한 다클론 항Boryong 항체를 이용한 면역형광법으로 *Orientia*를 확인하였다. 분리된 균주는 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다. *Orientia* 배양과 더불어, Boryong주를 항원으로 하여 간접형광항체법으로 항체 양성을 확인하였다.

53명의 환자에서 분리된 균주가 보관되었고, 이 중에서 37개가 다시 배양되었다. 1주는 충남대학교병원에서 의뢰된 검체로 임상상에 대해서 전화로 확인하였다(김연숙, 개인교신).

37건의 분리주에 대해 나이, 성별, 거주 지역과 추정 감염 지역, 치료제, 입원 기간과 항균제 투여 기간을 조사하였다. 중환자실에서 치료 여부를 중증도를 반영하는 인자로 사용하였고, 투약 기간과 입원 기간도 변수가 많은 인자이기는 하나 대략적으로 중증도를 반영하는 인자로 생각하였다. 담당의사의 판단을 중증도의 지표로 사용한 것으로 주관적이라는 단점이 있으나, 실제 임상에서는 이 지표가 더 유용할 것으로 생각하였다. 본원에서 항균제 사용 기간은, 해열이 되고 1-2일 더 사용하는 원칙이므로, 5일 사용은 빠르게 반응한 환자, 6-7일 환자는 다른 문제가 있거나 조금 늦게 반응한 환자, 8일 이상 사용한 환자는 합병증이 있거나 치료 효과 평가가 어려운 경우로 해석할 수 있다. 객관적 지표로 중증도를 보는 연구가 있지만(3, 4), 중증도보다는 검사 이상의 빈도이므로 이들 결과를 찌쯔가무시병의 중증도라고 하기는 어려웠다. 해외 논문에서 사용된 기준은(5) 너무 엄격하기에 국내에서 이런 환자를 진료하는 경우가 드물어 현실적으로 적용하기 어려웠다.

이들 37개 균주를 이전 조사에서(6, 7) 확인된 최소억제농도인 독시사이클린 0.1 µg/mL이 포함된 배지에 배양하였다. 0.2 µg/mL에서도 배양을 하였으며 이전 연구에서 보면(7) 최대로 억제제가 된 후에는 항균제 농도가 높아지면 오히려 성장지수가 약간 증가하는 현상을 보였기에, 0.1 µg/mL에서 성장 지수보다 0.2 µg/mL에서 성장지수가 더 높을 때에는 이미 최소억제농도 이후의 성장지수를 의미하고, 반대의 경우에는 더 억제제가 되고 있다고 해석할 수 있으므로 최소억제농도가 0.2 µg/mL이거나 그보다 약간 높은 농도가 될 가능성이 있다고 해석하였다. 이후 FS15 단클론항체를 이용하여 유세포분석법으로 독시사이클린에 대한 항균제감수성 검사를 시행하였다(6). FS15 단클론항체는 *O. tsutsugamushi* 외막의 56-kDa 단백질에 반응하는 단클론항체로, Boryong, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, AFSC-4주 등에 반응하고 Gilliam, TA678, TA716주에는 반응을 하지 않는 항체이다(6). 3주는 FS15 단클론항체에 반응하지 않았고, anti-Gilliam 항체(쥐에 접종하여 자체 제작한 다클론 항체)에 반응하여 Gilliam주로 동정하였다. Gilliam 1주(33-1998)는 Gilliam 주 원형과 유사하여 쉽게 동정이 되었으나 2주의 Gilliam주(30-2001주와 36-1997주)는 여러 단클론항체에(8) 대한 반응과 중합효소연쇄반응이(9) 거의 같았으며, 원형 Gilliam 주나 33-1998주와는 조금 달라 동정이 어려웠다. 두 환자 모두에서 피동혈구응집반응으로 3주까지 검사를 했으나 항체가 음성이었다. 염기순서 분석을 위한 실험 중 1주(36-1997)는 오염이 되어 더 이상 조사를 못하였고, 30-2001주는 염기서열이 Gilliam형 Yonchon주나 Ikeda주와 유사하

였다(10). Gilliam형으로 동정된 균주는 항Gilliam항체로 반응시켜 같은 방법으로 성장지수를 측정하였으나, 형광 정도가 FS15에 비해 낮아 감수성 결과의 신뢰성이 낮을 것으로 생각하여 1주(33-1998주)에 대해서만 시행하였다.

6-well plate에 ECV304 세포를 배양한 후 10% 소태아혈청이 포함된 M199 medium으로 유지하다가, *O. tsutsugamushi* 균주를 접종하였다. 감염시킨 양을 일정하게 하려고는 하였으나 모든 실험마다 접종량을 같게 하기는 어려웠고, 경험적으로 감염되고 3일된 ECV304 monolayer를 떼어낸 후 유리구슬로 2번 갈아 얻은 상청액 9-10 mL 중에서 1 mL씩 접종하였다. 접종을 시키고 3시간 후, 항균제가 포함된 새로운 배지로 교환하였다. 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 3-5일 배양하였다.

유세포 분석법은 감염된 ECV304 세포주 단층을 트립신으로 처리한 후, 인산완충식염수(PBS)로 세척하고 300×g에서 5분간 원심분리하였다. 얼음 위에서 70% 에탄올로 1시간 고정한 후, 유세포 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 유세포 분석 시, 인산완충식염수로 세척 후 FITC-conjugated FS15로 반응시킨 후 flow cytometer (Becton Dickinson, Mansfield, MA, U.S.A.)로 분석하였다. 감염된 전체 균 수를 계산하기 위해 형광이 양성인 세포 수(infected cell, %)에 평균 형광 정도(mean fluorescence intensity)를 곱하여, 성장 지수(growth index)로 표현하였다. 항균제가 포함되지 않은 배지에서 키운 경우의 성장 지수를 100으로 하여 항균제 처리를 한 배지에서 보인 성장 지수를 비율로 환산하여 백분율(%)로 나타냈다. 성장 지수 10% 이하를 항균제로 완전히 억제된 것으로 정의하였다(6, 7). 유세포 분석법은 최소 억제농도 이상이 되면 성장 지수가 더 증가하는 단점이 있어(7), 성장 지수가 10% 이상이 나온 결과에 대해서는 항균제 농도를 저농도에서 고농도로 증가시켜 최소억제농도를 측정하였다(7). 간략히 기술하면, *Orientia*로 감염시킨 세포 단층에 독시사이클린 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.4 µg/mL을 첨가하여 *Orientia* 성장을 억제한 후 억제 정도를 유세포분석법으로 측정하였다.

통계 분석은 Epi Info (version 3.4.3, Centers for Disease Control and Prevention, U.S.A.)의 calc를 사용하여 chi-square 검정을 하였고, *P*값 0.05 미만을 통계적으로 의미가 있다고 정의하였다.

결 과

37건의 분리주에 대한 분리 연도, 나이, 성별, 추정 감염 지역, 치료제와 치료 기간, 입원 기간, 중환자실 치료 여부는

다음과 같다(Table 1). 외부 병원에서 중증으로 중환자실에서 치료받았던 환자 1명과 외래에서 치료를 한 환자 1명을 제외하고는 모두 입원한 환자였다. 외부에서 의뢰된 검체 1건을 제외하면, 남자 17명 여자 19명, 평균 나이는 58.7 (±18.22)세였다. 30대 이하 6명, 40대 6명, 50대 3명, 60대 7명, 70대 11명, 80대 2명, 90대 1명이었다. 감염 추정 지역은 인천 17명, 충청남도 13명, 충청북도 3명, 경상남도 2, 경기도 1명, 전라남도 1명이었다. 사용한 항균제는 독시사이클린 22명, macrolides 12명, fluoroquinolones 2명이었다. 독시사이클린 투여 기간은 5일 이하 투여는 11명, 6-7일 투여군 4명(외래 환자 1명 제외), 8일 이상 치료군 6명이었다. 6-7일 투여군에서 2명(7-2006과 32-2001)은 입원 기간이 투여 기간보다 더 짧아 퇴원 전에 이미 호전이 확실했던 것으로 판단하였고, 나머지 2명은 동반된 다른 질환의 진단 때문에 퇴원이 지연된 것으로 생각된다. 8일 이상 치료한 환자들은 1명을 제외하고는 모두 합병증이 생긴 환자들이고, 1명(8-2006)은 퇴원 시에도 독시사이클린이 처방된 것으로 실제 투여일은 4-5일의 의미이다. 5명이 중환자실에서 치료를 받았으며, 의뢰된 환자 1명과 외래에서 치료한 1명은 성격이 다르므로 제외하면, 35명 중 4명(11.4%)이 중환자실에서 치료를 받았고, 1명(2.9%)이 사망했다. 사망 환자는 만성알코올중독으로 경막하혈종이 있는 상태에서 쓰쓰가무시병에 의한 뇌염과 폐렴이 합병되었고, 중환자실에서 치료받다가 26병일에 원내 폐렴으로 사망하였다.

FS15 단클론항체에 반응하는 주는 34주였고 반응하지 않은 환자가 3명이었으며 모두 Gilliam주로 판명되었다. 검사 의뢰된 1명과 외래 환자 1명을 제외하면, FS15반응 혈청형 감염자에서는 32명 중 2명이 중환자실에서 치료를 받은 반면 Gilliam형 감염자 3명 중에서 2명이 중환자실 치료를 받았다(two tailed *P*=0.03 by Fisher's exact test). Gilliam 원형과 유사한 1주(33-1998주)가 분리된 환자는 병실에서 3일간 독시사이클린으로 치료하고 6일째 퇴원하여 다른 환자와 다르지 않았지만, Yonchon/Ikeda 와 유사한 2주(30-2001주, 36-1997주)에 감염된 환자는 모두 중환자실에서 치료를 받았다.

FS15 단클론항체에 반응하는 34주와 항Gilliam항체로 조사한 1주에 대한 독시사이클린 0.1 µg/mL과 0.2 µg/mL에서 억제 정도는 다음과 같다(Table 2). 0.1 µg/mL에서보다 0.2 µg/mL에서 성장지수가 더 낮은 균주가 12예였지만, 반복 검사에서 반대로 나온 경우가 3예가 있어 두 농도(0.1 µg/mL와 0.2 µg/mL)에서 성장지수의 차이로는 큰 의미를 부여하기가 어려웠다.

독시사이클린에 저감수성으로 정의한 10% 이상 성장을

보인 예는 6예였고, 반복해서 검사를 했을 때 3주는 10% 이하로 나왔고, 5주에 대해서는 최소억제농도를 측정했을 때 모두 0.2 µg/mL 이하였다.

고 찰

이번 연구는 국내에서 처음으로 *O. tsutsugamushi*의 독

시사이클린에 대한 저감수성 여부를 조사한 것이다. 35주라는 적은 수이고, 한 개 대학병원에서 분리하였다는 지역적 한계가 있으나 환자가 감염된 지역은 보다 다양하므로 중서부 지역을 반영하는 결과라고 할 수 있다. 시기적으로 10년에 걸쳐 분리된 것이므로 시간적 변화도 알 수 있다.

독시사이클린 저감수성 쓰쯔까무시병에서는 임상적으로 해열까지 시간이 오래 걸린다(1). 통상 독시사이클린을 투여

Table 1. Demographic and Treatment Data of 37 Patients with Culture-Confirmed Scrub Typhus

No. year of patient	Sex/age	Areas infected	Antibiotics & duration (day)	Duration of hospitalization (day)	Comment*
1-2007	M/16	Inchon	Azithromycin 3 d	3 d	Primary pneumonitis
2-2007	F/82	Inchon	Doxycycline 14 d	7 d	Shock; care at ICU
3-2007	M/71	ChungcheongNam-do	Doxycycline 3 d	3 d	
4-2007	M/46	Inchon	Doxycycline 5 d	3 d	
5-2007	M/62	ChungcheongBuk-do	Doxycycline 3 d	3 d	
6-2007	M/44	ChungcheongNam-do	Doxycycline 10 d	6 d	Pneumonitis
7-2006	M/34	Inchon	Doxycycline 6 d	4 d	
8-2006	F/50	ChungcheongNam-do	Doxycycline 11 d	6 d	
9-2005	F/62	ChungcheongBuk-do	Telithromycin 3 d	3 d	
10-2005	M/34	ChungcheongNam-do	Telithromycin 3 d	3 d	
11-2005	F/26	GyungSanNam-do	Telithromycin 3 d	3 d	
12-2004	F/65	Inchon	Telithromycin 3 d	3 d	
13-2004	M/43	ChungcheongNam-do	Telithromycin 4 d	4 d	
14-2004	M/72	ChungcheongNam-do	Doxycycline → azithromycin IV 13 d	26 d	Alcoholism & SDH [‡] ; care at ICU; pneumonitis and encephalitis; died of nosocomial pneumonia
15-2004	F/28	ChungcheongNam-do	Telithromycin 3 d	3 d	
16-2004 [†]	NA	ChungcheongNam-do	NA	NA	Encephalitis; care at ICU
17-2004	F/77	JeollaNam-do	Telithromycin 3 d	3 d	
18-2003	M/69	ChungcheongNam-do	Doxycycline 7 d	8 d	Gastric cancer
19-2003	F/75	GyeongGi-do	Doxycycline 4 d	5 d	
20-2003	F/71	Inchon	Gatofloxacin 3 d	7 d	
21-2003	M/76	Inchon	Clarithromycin IV 6 d	11 d	Gastric ulcer bleeding
22-2003	F/39	ChungcheongNam-do	Doxycycline 7 d	-	Managed at out-patient clinic
23-2002	F/42	Inchon	Doxycycline 4 d	5 d	
24-2002	F/76	Inchon	Doxycycline 5 d	6 d	
25-2002	M/71	ChungcheongBuk-do	Doxycycline 8 d	9 d	
26-2002	F/62	ChungcheongNam-do	Doxycycline 3 d	5 d	
27-2001	M/56	Inchon	Doxycycline 4 d	5 d	
28-2001	F/60	Inchon	Doxycycline 5 d	5 d	Epiglottitis; steroid
29-2001	F/80	Inchon	Doxycycline 5 d	6 d	
30-2001	F/72	GyeongsangNam-do	Doxycycline 14 d	17 d	Encephalitis; care at ICU; serotype Gilliam [‡]
31-2001	M/74	ChungcheongNam-do	Doxycycline 7 d	12 d	Pernicious anemia
32-2001	M/66	Inchon	Doxycycline 7 d	6 d	
33-1998	M/41	Inchon	Doxycycline 3 d	6 d	Serotype Gilliam
34-1998	F/48	ChungcheongNam-do	Dirithromycin 3 d	4 d	
35-1998	M/90	Inchon	Ciprofloxacin 3 d	4 d	
36-1997	F/76	Inchon	Doxycycline 10 d	16 d	Pneumonitis; care at ICU serotype Gilliam [‡]
37-1997	F/56	Inchon	Clarithromycin 3 d	6 d	

*All except 3 isolates were FS15-reactive serotypes, i.e., serotype Boryong, Karp, Kato, Kuroki, or Kawasaki.

[†]referred from the ChungNam University hospital; NA - not available

[‡]2 strains were *O. tsutsugamushi* serotype Gilliam Yonchon/Ikeda-like strain

ICU, intensive care unit; SDH, subdural hematoma

Table 2. Growth Indices (%) of 34 Clinical Isolates from Korean Patients

No./year of isolation	Concentration of doxycycline ($\mu\text{g/mL}$)		MICs of isolates ($\mu\text{g/mL}$)	
	0.1	0.2		
1-2007	2.64	8.3	0.1	
2-2007	10.60			
	0.63	0.48		
3-2007	4.71			
4-2007	8.35			
5-2007	8.65			
6-2007	3.34	5.25		
7-2006	5.62	7.52		
8-2006	1.41	1.05		
9-2005	7.44	8.69		
	1.60	0.98		
10-2005	4.36	4.74	0.05	
11-2005	6.56	4.45		
12-2004	0.67	0.63		
13-2004	1.74	2.72		
14-2004	2.52	3.47		
15-2004	10.83	10.60		
16-2004	11.36	14.53		
	2.15	1.34		
17-2004	14.38	13.84		0.2
	9.94	4.18		
18-2003	10.54	11.23	0.1	
19-2003	1.84	3.35		
20-2003	1.44	1.59		
21-2003	1.37	1.56		
22-2003	1.57	1.88		
23-2002	1.91	3.02		
24-2002	1.68	2.30		
25-2002	0.54	0.32		
26-2002	1.05	1.81		
27-2001	0.33	0.40		
	1.93	1.67		
28-2001	1.22	0.46		
29-2001	0.63	0.84		
31-2001	6.70	6.88		
32-2001	1.31	1.29		
34-1998	1.77	1.65	0.2	
35-1998	10.18	9.64		
37-1997	0.74	0.39		

하고 48시간이면 해열이 되며, 더 지연된다면 다른 병을 생각하라고 할 정도이지만(11), 항균제에 대한 저감수성 외에도 여러 원인에 의해 치료에 반응이 늦을 수 있으므로 임상적 소견 외에도, 항균제의 혈중 농도 측정과 *O. tsutsugamushi*를 분리한 후 최소억제농도를 측정하는 것이 필수적이다. 이 두 검사 모두 국내에서는 쉽지 않기에 아직 국내에서는 독시사이클린 저감수성 여부가 조사되지 않았다. 이번 연구 대상 환자에서 항균제 사용 시간을 보면 대개 3-5일 정도로, 해열이 되고 1-2일 정도 더 사용하는 원칙으로 투여되었고 퇴원은 해열이 된 다음날 하였으므로, 항균제에 지연

반응은 없었다고 할 수 있다. 몇몇 환자들이 늦게 퇴원하였는데 치료 지연보다는 다른 이유 때문이었다. 합병증이 있는 환자에서는 치료 기간에 제한을 두지 않아 대개 1주일 이상 치료하였고, 외래 환자에서는 경과를 관찰할 수 없으므로 5-7일 후 환자를 다시 볼 때까지 치료하였으므로, 이들에서는 투여 기간이 중증도를 판단하는 기준은 되지 못한다.

이번 연구에서 선별 기준으로 독시사이클린 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 과 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 를 사용하였다. 이전 연구에서 Boryong주의 최소억제농도가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 여서(6, 7) 이 농도를 기준으로 하였다. 아직까지 저감수성의 실험실 기준은 없지만, 반응이 빨랐던 환자에서 분리된 Karp주는 최소억제농도가 0.0625 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 저감수성 주인 AFSC-4주는 적어도 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 이상(0.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 추정)이고(12), 세포내 *Orientia*에만 반응하는 단클론항체를 이용하여 측정하면 Boryong주가 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 이고 AFSC-4주가 3.2 $\mu\text{g/mL}$ 이상이였으며(13), 독시사이클린 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 성장을 보이는 주가 있었으므로 (1), 이번 연구에서 사용한 기준인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 는 감수성과 저감수성을 구분하는 기준으로 무리가 없으리라 생각한다.

감수성의 기준을 최소억제농도에서 10%이하 성장 지수를 보일 때로 정의하였다. *Orientia*의 항균제 감수성 검사에 대해서는 어떤 규정도 없으므로 인위적으로 정할 수밖에 없었으며, 90% 억제 기준은 박테리아 항균제 내성을 조사할 때 흔히 사용하는 기준이고, 세포내 다른 미생물인 *Chlamydia trachomatis*에서 보면 변형된 모양의 chlamydia의 수를 10% 기준으로 내성 여부를 판단하고 있어(14), *Orientia*에서도 10%정도 기준이 적절할 것으로 생각하였다.

이번 조사에서 독시사이클린 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 14%까지 높은 성장지수를 보이는 주가 있어 독시사이클린 저감수성이 의심되었으나 다시 검사를 하였을 때 3주에서는 10% 이하를 보였고 5주에 대해서는 최소억제농도를 측정하였을 때 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 이하를 보여, 내성보다는 검사 방법의 차이로 생각된다. 세포배양을 해서 항균제 검사를 하는 다소 복잡한 방법이기때문에, 사용한 세포의 종류, pH, 접종량에 따라 검사마다 약간의 오차가 생길 수 있기 때문이다. 이 정도 변수를 보이는 검사라면, 10% 이하로 나온 결과라도 14%까지 높게 나올 수 있다고 해석할 수 있으며, 이를 감안해도 모든 분리주들의 성장 지수는 15%를 넘지 않는다고 할 수 있다. 최소억제농도에서 15%의 성장 지수를 보인다고 가정할 때, 이 정도가 임상적으로 어느 정도 의미를 갖는지 아직 정립되지 않았다. *Orientia*의 독시사이클린 내성에 대해서는 연구가 적어 심지어 독시사이클린 저감수성의 기준조차도 없는 상황이다. 독시사이클린 저감수성 주로 알려진 AFSC-4주도 최소억제농도에 대해서는 보고가 있지만 이 균주가 분리된

환자가 얼마나 느린 반응을 보였는지에 대해서는 알려져 있지 않아(12), 최소억제농도가 어느 정도 높아야 임상적으로 인식할만한 지연 치료 반응이 나올지 불분명하다. 유일하게 임상적 반응과 실험실 결과가 기술되어 있는 연구에서(1) C3주의 경우 독시사이클린 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 억제제가 이루어지지 않아, 최소억제농도가 이 정도는 되어야 임상적으로 반응이 늦을 것으로 생각한다. 따라서 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 15%의 성장 지수를 가질때도 최소억제농도는 0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 정도가 되리라 생각되며, 통상 임상에서 사용하는 양의 독시사이클린 투여 후 혈중농도는 2-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 10배에 해당하므로 임상적으로 지연 반응을 보이지는 않으리라 생각한다.

국내에 독시사이클린 저감수성 주가 없는 이유를 말하기에는 아직 연구가 부족하지만, 타일랜드와 국내의 여러 조건 차이에 의하리라 추정한다. 국내에서는 찌뜨가무시병이 가을철에 집중적으로 발생하므로 저감수성이 생긴다하더라도 다음 계절까지 지속되기가 어려운 상황이다. 동물에서 항균제 사용이 타일랜드에서 많은 듯하다. 타일랜드에서 동물에 얼마나 많은 항균제를 사용하는지는 알기 어렵지만, 저감수성이 독시사이클린에 대해 주로 발생하는 것을 보면 동물에서 사용되는 테트라사이클린 계열 항균제에 의해 저감수성 주만 선택되었을 가능성이 있다. 테트라사이클린은 개발된 지 오래되어 가격이 싸며 광범위 항균제이기에 동물 성장 촉진제로 많이 사용되어 왔으며, 타일랜드 동물에서 분리된 박테리아가 테트라사이클린이나 설펜아마이드에 내성을 보이는 것과(15-17) 일치하는 소견이다. 이렇게 투여된 항균제는 동물의 분변을 통해 자연계로 배설이 되고 자연계의 *Orientia*가 이런 항균제에 지속적으로 노출되면서 저감수성 *Orientia*가 선택적으로 살아남았다가 사람에게 감염되는 것으로 추정된다. 자연계에 남아 있는 항균제는 물에 의해 퍼질 것이지만, 국내에서는 가을철에 강우량이 많지 않으므로 자연계에서 퍼지지 않아 *Orientia*가 항균제에 노출되지 않는 것으로 추정되며 결과적으로 국내에서는 독시사이클린 저감수성 *Orientia*가 있다고 해도, 광범위하게 발생하지는 않을 것으로 추정한다. 앞으로 타일랜드와 국내의 차이에 대한 조사가 필요하다.

Gilliam 혈청형으로 동정된 1주(33-1998주)에 대해서는 FS15만큼 형광이 강한 단클론항체가 없어, 쥐에 접종하여 만든 다클론 항Gilliam 항체를 사용하여 검사해 보았다. 0.00125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 억제제가 되어 Boryong주에 비해 더 민감한 것으로 나왔지만, 사용한 항체가 다르므로 FS15로 조사한 결과와 직접 비교할 성격은 아니리라 생각한다. 형광이 낮으면 *Orientia* 억제제가 많이 된 것처럼 판독이 되어 항균제

에 민감한 것으로 해석되기 때문이다. FS15만큼 강한 형광을 보이면서 Gilliam주에 특이하게 반응하는 단클론항체의 개발이 선행되거나 항체를 사용하지 않는 방법의 개발이 필요하다.

동정이 어려웠던 2주의 *Orientia*는 Gilliam주로 동정이 되었고, 염기서열 분석까지 가능했던 1주는 염기서열이 Yonchon/Ikeda주와 유사하였다. 분리 당시에 분리주가 항 Boryong항체에 반응을 해서 *O. tsutsugamushi*일 것으로 생각했고, FS15에 반응이 없었고 항Gilliam항체에 반응을 하였다. 여러 단클론항체와 시발체를 사용한 중합효소연쇄반응에서 Gilliam 원형이나 33-1998주와도 조금 달랐다. 대조군주로 Boryong, Gilliam, Karp, Kato, Kuroki, *R. japonica*를 사용하였고, Yonchon주는(18) 보유하고 있지 않아 비교할 수 없었다. 흥미로운 것은 2주가 분리된 환자가 모두 중환자실에서 치료할 정도로 중증이어서, 이번 분리주가 임상적 중증도와 관련이 있을 수 있다. Yonchon주나 Ikeda주는 염기서열이 비슷하여 같은 type으로 구분하며(10), Yonchon주는 동물 실험에서 병원성이 강한 것이 증명되었기에(9) 이번 연구에서 중환자실 입원과 유전자형의 관련성이 우연이 아닐 수 있음을 시사한다. 균의 성격에 대해 연구가 더 이루어져야 하며, 저감수성으로 인한 치료 지연으로 중증이 되었을 가능성을 배제하기 위해 항균제 감수성 검사가 필요하다.

이번 연구의 대상 환자들은 실제보다 중증으로 편향되었을 가능성이 높다. 주로 입원을 한 환자에서 *Orientia* 배양을 하였고, 환자 중에서 중증인 환자만 입원 치료를 하기 때문이다. 중환자실 치료율은 경증의 외래 환자가 제외되므로 실제보다는 과장된 비율이다. 70대 환자가 제일 많은 것도, 기저질환이 많아지면서 더 중증으로 인식되기에 입원 치료를 일차적으로 권하기 때문으로 생각된다. 치료제는 외래에서는 독시사이클린을 주로 사용하였으므로 독시사이클린 사용 빈도가 낮게 나왔으리라 생각한다.

이번 연구의 단점은, 지역적으로 중서부 지방에서 분리된 균주가 많아 동부와 남부 지역 특히 강원도에서 상황을 반영하지 못하므로 이번 결과를 남한 전체로 확대하기에는 부족함이 있고, 주로 입원한 환자 중에서 배양 양성 환자가 대상이 되었으므로 중증 환자가 선택되었을 가능성이 있어 찌뜨가무시병 전체 환자를 반영하는 결과는 아니며, 중증 환자에서 분리된 2주의 Gilliam주가 있어 치료가 문제가 될 수 있는 환자에서 저감수성 상황을 정확히 알 수 없었으며, 결과에서도 보이듯이 같은 검체도 실험 조건에 따라 10%정도의 오차가 나므로 실험조건이 정량화가 되기 전까지는 어느 정도 오차를 감안을 해서 결과를 해석해야 하며, 유세포분석법은 발견 가능한 *Orientia*의 수에 한계가 있으므로 적은 수

에서 발생하는 저감수성을 발견 못할 가능성이 있으므로 다른 방법으로 검사를 하여 비교하는 것이 필요하다.

정리하면, 방법과 대상에서 제한점이 있고 쓰쓰가무시병에서 저감수성에 대한 정의 부재로 연구 결과 해석에 어려움이 있으나, 이번 연구 결과를 보면, 국내에서는 독시사이클린 저감수성 증가 없기 때문에, 쓰쓰가무시병의 치료 시 발생하는 치료 지연이나 실패의 주 원인은 독시사이클린 저감수성이 아닐 것으로 생각한다. 이번 조사에 포함되지 않은 강원도와 남부 지방에서 분리되는 중서부 지역에서 분리되는 주와 다를 가능성이 있고, Gilliam형에 대해서는 적절한 항균제 감수성 검사가 되지 않았으므로, 지역을 확대해서 조사하고 Gilliam주에 대해서는 다른 방법으로 항균제 감수성 검사를 하는 것이 필요하다.

참 고 문 헌

- 1) Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Jongsakul K, Teja-Isavadharm P, Bhodhidatta D, Corcoran KD, Dasch GA, Strickman D. Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand. *Lancet* 348:86-9, 1996
- 2) Na DJ, Han SH, Moon KM, Kim DJ, Lee YD, Cho YS, Han MS, Yoon HJ. A case of possible doxycycline-resistant scrub typhus. *Tuberc Respir Dis* 62: 545-8, 2007
- 3) Park JH, Shim SG. Upper gastrointestinal endoscopic features and predictable factors for clinical severity in the patients with tsutsugamushi disease. *Korean J Med* 69:518-27, 2005
- 4) Chanta C, Triratanapa K, Ratanasirichup P, Mahaprom W. Hepatic dysfunction in pediatric scrub typhus: role of liver function test in diagnosis and marker of disease severity. *J Med Assoc Thai* 90:2366-9, 2007
- 5) Kantipong P, Watt G, Jongsakul K, Choenchitra C. Infection with human immunodeficiency virus does not influence the clinical severity of scrub typhus. *Clin Infect Dis* 23:1168-70, 1996
- 6) Kim MJ, Kim MK, Kang JS. Improved antibiotic susceptibility test of *Orientia tsutsugamushi* by flow cytometry using monoclonal antibody. *J Korean Med Sci* 22:1-6, 2007
- 7) Kim ES, Kim MK, Lee HM, Chung MH, Lee JS, Park JE, Kang JS. In Vitro Antibiotic susceptibility of *Orientia tsutsugamushi* strain Boryong measured by flow cytometry. *Infect Chemother* 40:212-7, 2008
- 8) Kang JS, Chang WH. Antigenic relationship among the eight prototype and new serotype strains of *Orientia tsutsugamushi* revealed by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* 43:229-34, 1999
- 9) Ree HI, Kim TE, Lee IY, Jeon SH, Hwang UW, Chang WH. Determination and geographical distribution of *Orientia tsutsugamushi* serotypes in Korea by nested polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 65:528-34, 2001
- 10) Tamura A, Yamamoto N, Koyama S, Makisaka Y, Takahashi M, Urabe K, Takaoka M, Nakazawa K, Urakami H, Fukuhara M. Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. *Microbiol Immunol* 45:439-46, 2001
- 11) Brown GW, Saunders JP, Singh S, Huxsoll DL, Shirai A. Single dose doxycycline therapy for scrub typhus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72:412-6, 1978
- 12) Strickman D, Sheer T, Salata K, Hershey J, Dasch G, Kelly D, Kuschner R. In vitro effectiveness of azithromycin against doxycycline-resistant and -susceptible strains of *Rickettsia tsutsugamushi*, etiologic agent of scrub typhus. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2406-10, 1995
- 13) Kim MK, Odgerel Z, Kim MJ, Chung MH, Lim BU, Kang JS. Application of monoclonal antibody, specific for intracellular *Orientia tsutsugamushi*, to immunofluorescent antibody test for determining antibiotic susceptibility. *Microbiol Immunol* 48:655-60, 2004
- 14) Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 47:636-42, 2003
- 15) Hald T, Lo Fo Wong DM, Aarestrup FM. The attribution of human infections with antimicrobial resistant *Salmonella* bacteria in Denmark to sources of animal origin. *Foodborne Pathog Dis* 4:313-26, 2007
- 16) Stafford R, Kirk M, Selvey C, Staines D, Smith H, Towner C, Salter M. Outbreak Investigation Team. An outbreak of multi-resistant *Shigella sonnei* in Australia: possible link to the outbreak of shigellosis in Denmark associated with imported baby corn from Thailand. *Euro Surveill* 12:E070913.1, 2007
- 17) Lewis H, Ethelberg S, Lisby M, Madsen SB, Olsen KE, Rasmussen P, Kjelsø C, Vestergaard LS, Qureshi K, Howitz M, Mølbak K. Outbreak of shigellosis in Denmark associated with imported baby corn, August 2007. *Euro Surveill*. 12:E070830.1, 2007
- 18) Seong SY, Park SG, Kim HR, Han TH, Kang JS, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype. *Microbiol Immunol* 41:437-43, 1997