Journal of Bacteriology and Virology 2008. Vol. 38, No. 4 p.221 – 226

Rapid Identification of Rickettsiae using the Real-Time PCR

Hyo-Soon Park[1], Jung-Hee Lee[1], Kwang-Hoon Jin[1], Won-Jong Jang[1], Kyung-Hee Park[1], Yoon-Hoh Kook[2] and Seung-Hyun Lee[1*]

[1]Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, Chugju, Chungchungbuk-Do, Korea,
[2]Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Received : December 9, 2008
Revised : December 12, 2008
Accepted : December 12, 2008

In this study, new real-time PCR method based on the *groEL* gene was developed and investigated. Four spotted fever group (SFG) strains, four typhus group (TG) strains, and four scrub typhus group (STG) strains were easily differentiated as a distinct entity. This PCR assay was applied to detect *Rickettsia* DNA from 100 ticks. Twelve *Haemaphysalis longicornis* ticks were found positive and identified as spotted fever group *Rickettsia*. This real-time PCR method could simultaneously perform the rapid identification of rickettsiae and the differential diagnosis of SFG, TG, and STG in a single reaction.

Key Words: *groEL* gene; *Rickettsia*; Real-time PCR

서 론

*Rickettsia*는 세포내 기생하는 그람음성 세균으로써 크게 세 가지 군으로 나누어지는데, epidemic typus (발진티푸스)를 일으키는 *R. prowazekii*, murine typus (발진열)를 일으키는 *R. typhi*가 포함된 typhus group (TG), 약 20개의 균종이 포함된 spotted fever group (SFG), 쯔쯔가무시병을 일으키는 *Orientia tsutsugamushi*가 포함된 scrub typhus group (STG)이다 (10). *Rickettsia*는 이 (louse), 벼룩, 진드기 (mite, tick) 등의 절지동물 (arthropod)에서 살고 있다가 사람을 포함한 척추동물을 감염시킨다. *Rickettsia* 질환은 작은 동맥, 정맥, 모세혈관의 내피세포 (endothelial cell)에서 증식하며, 증상은 열이 나고 두통이 있으며 특징적인 피부발진을 동반한다 (10).

우리나라에서는 리케치아 질환 중, 그동안 쯔쯔가무시병, 발진열, 발진티푸스만 보고되어 왔다. 발진열은 1959년에 처음으로 보고된 이래 간헐적으로 보고되고 있고, 발진티푸스는 *R. prowazekii*에 의해 발생되는 질환으로 해방직후까지 큰 유행이 있었지만, 1952년 이후 유행적 발생은 없었다 (1). 쯔쯔가무시병은 한국, 일본, 중국 등을 포함한 동남아시아 전역에서 발생하고 있으며 열성질환자의 23%를 차지하고 있다 (14), 우리나라에서는 1951년 처음 보고된 이래, 우리나라 전역에서 발생하고 있으며 9월과 11월 사이에 많이 발생하고 있다. 특히, 우리나라 가을에 발생하는 환자의 27.7~51%가 쯔쯔가무시병으로 진단될 만큼 많은 환자가 발생되고 있다 (1,4,15). 최근 환자에게서 spotted fever group인 *R. japonica*가 분리됨으로써 국내 발생보고가 없었던 여러 리켓치아 질환이 우리나라에도 있을 가능성이 높다 (2).

쯔쯔가무시병의 증상은 typhus group과 spotted fever group을 포함하는 *Rickettsia* 균군들에 의한 리케치아증과 매우 유사해 임상적으로 감별하기는 매우 힘들다 (1,10). 따라서 *Rickettsia* 균군들과 *O. tsutsugamushi*의 감별 진단이 매우 중요하지만 가장 많이 쓰이는 면역형광항체법 (immunofluorescence assay; IFA), 면역효소법 등의 혈청학적 진단은 다른 박테리아와의 교차반응으로 위양성 반응

*Corresponding author: Seung-Hyun Lee. Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, Chugju, Chungchungbuk-Do 380-701, Korea.
Phone: +82-43-840-3725, Fax: +82-43-851-9329
e-mail: shlee@kku.ac.kr

**This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD) (KRF-2004-E00080).

이 많아 *Rickettsia* 균군들과 *O. tsutsugamushi*를 감별할 수 없다 (9,10,13).

최근 저자 등은 *groEL* 유전자 염기서열을 이용하여 기존 분류법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 분류법을 개발했는데 (5), GroEL 단백은 chaperone으로써 모든 생물체에서 보존되어 있고, 세포 및 박테리아의 생존에 절대 필요하며 *Rickettsia* 균주들의 진화를 잘 반영하고 있다 (8).

본 연구에서는 *groEL* 유전자 일부 분절의 특이 염기서열을 토대로, 민감도가 높고 한 번의 실험으로 *Rickettsia*의 세 가지 군, 즉, TG, SFG, 쭈쭈가무시병을 일으키는 STG을 동정하고 구분할 수 있는 real-time PCR법을 개발하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 chromosomal DNA 분리

본 연구에서는 *Rickettsia* 8개 균주 (*R. sibirica* 246, *R. conorii* Indian Tick Typhus, *R. japonica* YH, *R. akari* MK, *R. typhi* Wilmington, *R. typhi* 87~91, *R. typhi* 87~100, *R. prowazekii* Brienl), *O. tsutsugamushi* 4개 균주 (*O. tsutsugamushi* Karp, *O. tsutsugamushi* Kato, *O. tsutsugamushi* Gilliam, *O. tsutsugamushi* Boryong)를 사용하였다 (Table 1).

우선 이 균주들의 배양을 위해 L929 (ATCC CCL-1)세포를 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum; FBS)이 포함된 Earl's minimum essential medium (EMEM: Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland) 배지로 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. L929 세포가 70% 정도 자랐을 때, SFG와 TG 균주들의 균액을 첨가하여 1시간 동안 감염시킨 후 균액을 제거하고, 4% FBS가 함유된 EMEM 배지를 첨가하여 SFG 균주들은 32℃, TG 균주들은 35℃에서 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. STG는 L929 cell monolayer에 감염시킨 후, 1% glucose와 2 mM L-glutamine이 함유된 Dulbecco modified Eagle's minial essential medium (Gibco BRL) 배지로 35℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. 매 3~4일 마다 배지를 갈아 주며 10~14일간 배양하여 세포의 70~90% 정도가 감염된 것을 확인하였을 때 세포를 수확하여 -70℃에 보관하여 사용하였다.

또한, 충주의 야산에서 100개의 *Haemaphysalis* 진드기를 채집하였다. 100개의 tick 중 89개는 *H. longicornis*로, 3개는 *H. flava*로, 그리고 8개는 *Haemaphysalis* sp.로 동정되었다. 이러한 tick의 중장액 (midgut)을 100 μl의 PBS (phosphate-buffered saline; pH 7.4)로 부유시켰다. DNA는 High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 분리하였다.

2. Real-time PCR

*Rickettsia*와 *O. tsutsugamushi* 균주들의 *groEL* 유전자 염기서열을 근거로, real-time PCR용 primer [SF1 (5'-

Table 1. Rickettsial strains used in this study

Species	Strain	Source	Geographic location	Origin (collection)[a]	GenBank Acession No.
					groEL
O. tsutsuga mushi	Karp	Human	New Guinea	ATCC VR-150	M31887
	Kato	Human	Japan	ATCC VR-609	AY191586
	Gilliam	Human	Burma	NIH, Korea	AY191585
	Boryong	Human	Korea	NIH, Korea	AY059015
R. typhi	Wilmington	Human	USA	ATCC VR-148	AY191590
R. typhi	87~91	Blood (human)	Korea		AY191591
R .typhi	87~100	Blood (human)	Korea		
R. prowazekii	Breinl	Human	Poland	ATCC VR-142	Y15783
R. akari	MK	Blood (human)	USA	ATCC VR-148	AY059013
R. japonica	YH	Blood (human)	Japan	ATCC VR-1363	AF432181
R. conori	Indian Tick Typhus	*Rhipiceohaluss anguineus*	India	ATCC VR-597	AY059012
R. sibirica	246	*Dermacentor nuttalli*	Russia	ATCC VR-151	AY059014

[a] ATCC; American type culture collection, Manassas, VA, USA, NIH; National Institute of Health, Korea

Table 2. Real-time PCR condition

Program Name	Cycles	Analysis Mode	Target [℃]	Hold [h:m:s]	Ramp Rate [℃/s]	Acquisition Mode
Pre-incubation	1	None	95	00:10:00	20	None
Amplification	40	Quantification	95	00:00:10	20	None
			56	00:00:05	20	None
			72	00:00:20	20	Single
Melting curve analysis	1	Melting curves	95	00:00:00	20	None
			65	00:00:15	20	None
			95	00:00:00	0.1	Continuous
Cooling	1	None	40	00:00:30	20	None

GATAGAAGAAAAGCAATGATG-3' positions 938 to 958 in the *R. rickettsii*R numbering), SR2 (5'-CAGCTATTTGAG-ATTTAATTTG-3' positions 1154 to 1133), TF1 (5'-ATATAT-CACAGTACTTTGCAAC-3' positions 687 to 707) and TR2 (5'-GTTCCTAACTTAGATGTATCAT-3' positions 1047 to 1029)]를 고안하였다.

각 primer 0.5 μM과 template DNA 50 ng, 10 X LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 2 μl, 4 mM $MgCl_2$를 섞어 증류수로 final volume 20 μl를 맞춘 후, first deanturation 95℃ 10분, 40 cycles로 denaturation 95℃ 10초, annealing 56℃ 5초, extension 72℃ 20초로 LightCycler system (Roche Diagnostics)을 이용하여 증폭한 뒤 melting curve analysis를 수행하였다 (Table 2). Melting curve analysis는 LightCycler Data Analysis soft ware version 4.0 (Roche Diagnostics)을 사용하였다.

3. Real-time PCR의 sensitivity 측정

Real-time PCR의 sensitivity 측정을 위한 플라스미드 제작을 위해서 *R. typhi* Wilmington 균주 *groEL* 유전자 DNA를 본 실험실에서 고안한 primer OF [5'-GTTGAAGTT-AGTTAAAGG-3']와 OR [5'-TTTTTCTTTTATCATAATC-3']를 이용하여 증폭하였다 (5). 각 primer 20 pmol과 증류수, 주형 DNA 50 ng을 섞어 final volume 20 μl을 맞춘 뒤, PCR mixture tube (AccuPower PCR PreMix, Bioneer, Daejeon, Korea)에 섞어, first denaturation 94℃ 5분, 30 cycle로 denaturation 94℃ 30초, annealing 44℃ 45초, extension 72℃ 45초, final extension 72℃ 5분으로 중합효소연쇄반응 (Perkin-Elmer Cetus, Model 9600 Thermocycler, Norwalk, CT, USA)을 수행하였다. 생산되어진 중합효소연쇄반응 산물 20 μl를 염색한 1.5% agarose gel에 100V 25분 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 추출하였다. DNA 20 ng과 pGEM-T 벡터를 42℃에서 5분간 반응시킨 뒤 1 μl의 T4 DNA ligase를 첨가하여 16℃에서 18시간 동안 반응시켰다. Ligation 혼합액을 $CaCl_2$ 방법으로 대장균 XL1-blue에 transformation하고, 50 μl/ml의 ampicillin이 함유된 Luria-Bertini 평판배지에 도말 후 37℃에서 16시간 동안 배양하고, ampicillin에 대해 내성이 있는 집작을 채취하여 플라스미드를 분리하였다. 분리된 플라스미드의 260 nm에서의 optical density를 측정하고, 측정된 농도 (ng/μl)를 single plasmid molecule (M) × 6.02 × 10^{23} (아보가드로수)으로 나눈 값이 1 μl당 copy 수이다. 계산된 copy 수는 10배 계단희석하였다. 10^6~10^0의 플라스미드는 SYBR Green I를 이용한 real-time PCR과 동일한 조건으로 증폭하였고, LightCycler Data Analysis soft ware version 4.0을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. *groEL* 유전자를 표적으로 하는 real-time PCR을 이용한 *rickettsiae*의 동정

groEL 유전자를 바탕으로 SYBR Green I을 이용한 real-time PCR을 실행한 후, melting curve analysis를 통하여 균주의 *T*m 값으로 균주를 동정하였다. SFG 균주 *R. japonica*, *R. conorii*, *R. akari*, *R. sibirica*의 *T*m 값은 각각 78.14℃, 78.17℃, 78.17℃, 78.19℃가 나왔고, TG 균주 *R. typhi*, *R. typhi* 87~91, *R. typhi* 87~100, *R. prowazekii*의 *T*m

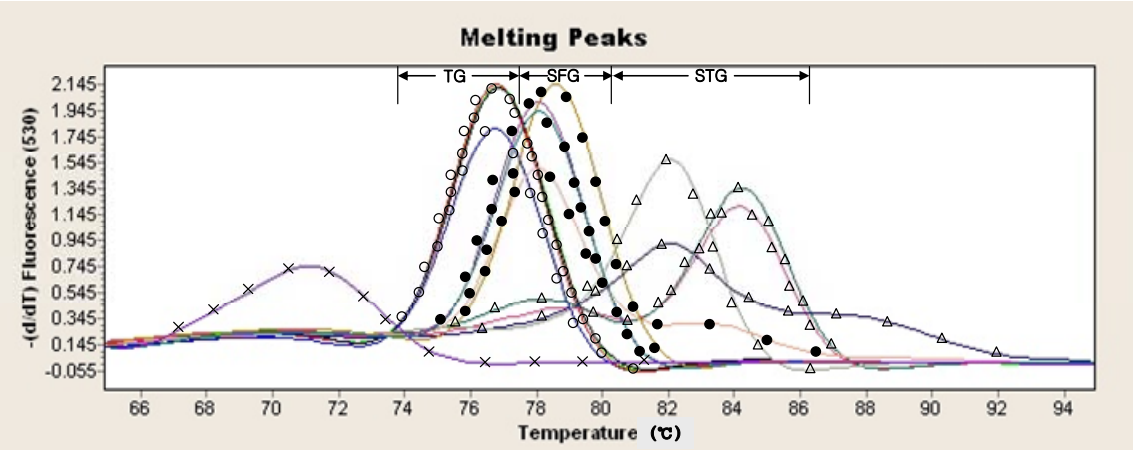

Figure 1. Amplification of *groEL* DNA from rickettsial strains using the real-time PCR. Lanes; —●—●— SFG (*R. japonica*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. akari*), —○—○—: TG (*R. typhi*, *R. typhi* 87~91, *R. typhi* 87~100, *R. prowazekii*), —△—△— STG (*O. tsutsugamushi* Karp, *O. tsutsugamushi* Kato, *O. tsutsugamushi* Boryong, *O. tsutsugamushi* Gilliam), —×—×— : DW

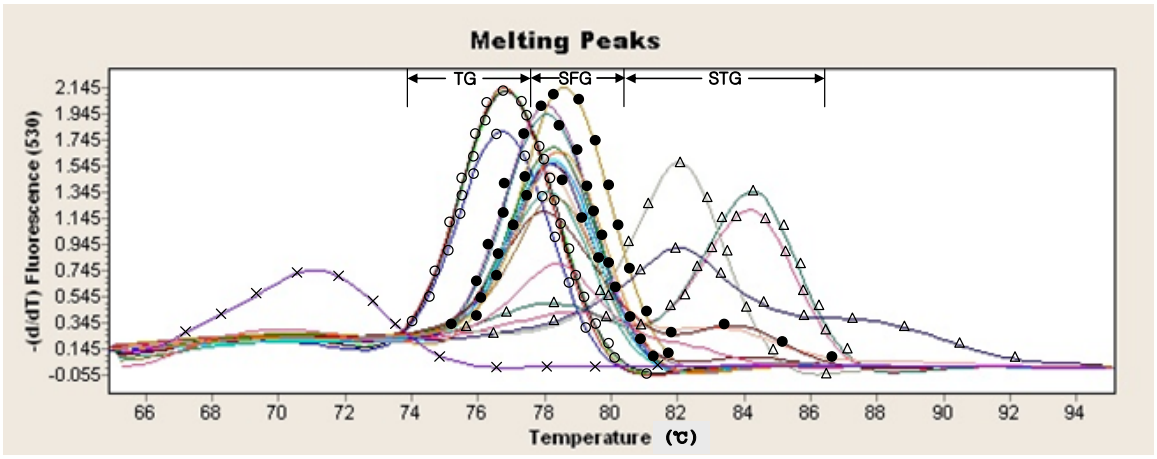

Figure 2. Amplification of *groEL* DNA from rickettsial strains and tick DNA using the real-time PCR. Lanes; —●—●— : SFG (*R. japonica*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. akari*), —○—○— TG (*R. typhi*, *R. typhi* 87~91, *R. typhi* 87~100, *R. prowazekii*), —△—△— : STG (*O. tsutsugamushi* Karp, *O. tsutsugamushi* Kato, *O. tsutsugamushi* Boryong, *O. tsutsugamushi* Gilliam), ———— : tick (Tick no. 22, 28, 33, 36, 48, 52, 55, 61, 65, 68, 77, 92) —×—×— : DW

값이 각각 76.83℃, 76.95℃, 76.88℃, 76.92℃가 나왔으며, STG 균주인 *O. tsutsugamushi* Karp와 *O. tsutsugamushi* Kato가 각각 84.28℃, 84.35℃, *O. tsutsugamushi* Boryong과 *O. tsutsugamushi* Gilliam이 각각 82.09℃, 82.18℃가 나왔다. SFG 균주는 *T*m 값의 범주가 78.14~78.18℃이고 TG 균주는 *T*m 값의 범주가 76.83~76.95℃이고, STG 균주의 *T*m 값의 범주가 82.09~84.35℃로 세 그룹 (SFG, TG, STG)의 melting peak가 cluster를 형성하여 잘 구분되고 있다 (Fig. 1).

각 그룹의 참조 균주들과 100개의 진드기 DNA를 함께 real-time PCR을 실행한 후, *T*m calling 분석을 이용하여 동정하였다. 그 결과 tick no. (22, 28, 33, 36, 48, 52, 55, 61, 65, 68, 77, 92)의 *T*m 값 (78.14~78.58℃)이 SFG 참조 균주의 *T*m 값 (78.14~78.18℃)과 비슷하게 나왔다 (Fig. 2). 이 중 4개의 진드기 DNA [tick no. (22, 36, 48, 77)]가 이전의 실험에서 SFG로 동정되었었다 (6). 즉, real-time PCR을 이용하여 *Rickettsia*와 *O. tsutsugamushi*와의 감별뿐 아니라 *Rickettsia*의 두 그룹 SFG와 TG 그룹도 쉽게 구분할 수 있었다.

2. Real-time PCR의 sensitivity 측정

R. typhi Wilmington의 copy 수를 10배 계단희석한 후

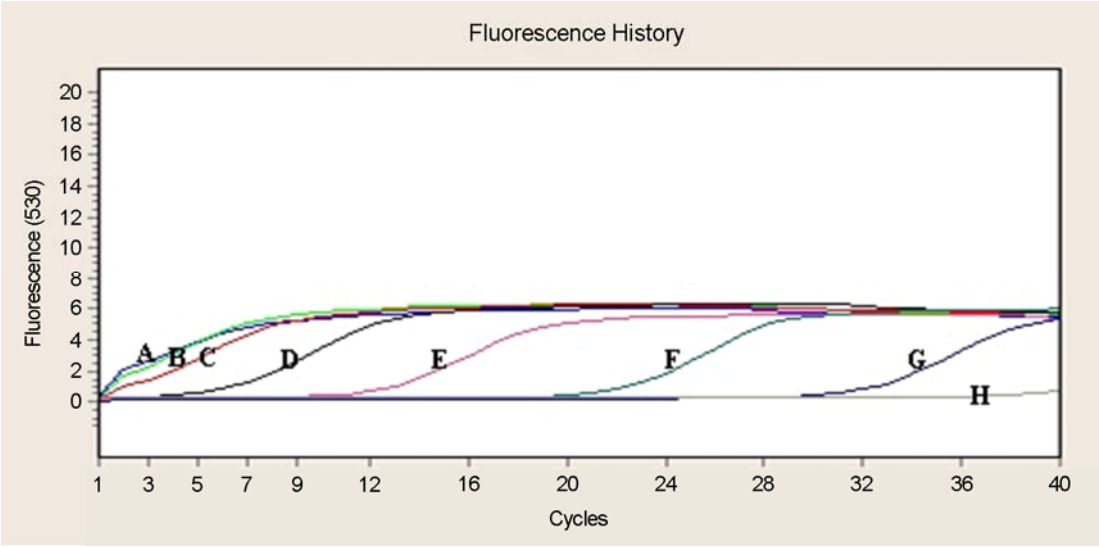

Figure 3. The sensitivity of real-time PCR using the *R. typhi* plasmid. Lanes; (A) *R. typhi* 10^6, (B) *R. typhi* 10^5, (C) *R. typhi* 10^4, (D) *R. typhi* 10^3, (E) *R. typhi* 10^2, (F) *R. typhi* 10^1, (G) *R. typhi* 1, (H) Negative control.

real-time PCR을 수행한 결과, 1×10^6 copy/μl부터 1×10^0 copy/μl까지 검출할 수 있었다. 음성대조군은 증폭되지 않았다 (Fig. 3).

고 찰

Rickettsia 질환의 대부분은 Wei-Felix test, IFA, Western blot과 같은 혈청학적 방법으로 진단하고 있다. 그러나 혈청학적 진단은 특이도나 민감도가 떨어지고 위양성 반응이 많을 뿐 아니라 *Rickettsia* 배양이 어렵고 검사시간이 많이 걸리는 단점이 있다 (9,10,13).

이런 단점들을 보완하기 위하여 PCR을 이용한 진단이 많이 이용되고 있다. *Rickettsia* 분류에 가장 많이 사용하고 있는 16S rRNA 염기서열을 이용하는 방법은 염기서열이 너무 유사해, 균종 구분은 되지만 같은 균종 내 구분에는 적합하지 않아 citrate synthase (*gltA*)와 rOmpA (*ompA*) coding gene의 염기서열을 이용하는 방법들을 많이 사용하고 있다 (3,10,14). 하지만, *ompA* gene의 염기서열을 이용하는 방법은 동정에 아주 유용하나, 일부 균종 (*R. akari*, *R. australis*, *R. helvetica*, *R. bellii*, *R. canada*, *R. typhi*, *R. prowazekii*)에서는 사용할 수 없어 (3,10,12), *gltA*와 *ompA* 유전자의 염기서열을 모두 사용해야 하는 번거로움이 있었다.

본 실험에서 real-time PCR의 표적으로 *groEL* 유전자를 선택한 이유는 *groEL* 유전자는 STG 균주에도 존재해 TG와 SFG의 *rickettsia* 균주들과 잘 구분되고 있고, *groEL* 유전자 염기서열을 이용해서 *rickettsia* 균주들을 동정할 수 있기 때문이다 (5).

1997년 real-time PCR에 melting curve analysis가 처음으로 도입되었다. 그 원리는, 마지막 PCR 주기가 끝난 후 온도를 천천히 올려 증폭산물의 두 가닥의 DNA (double-stranded DNA; dsDNA) 증폭산물이 한 가닥의 DNA (single-stranded DNA; ssDNA)로 변성되면 형광신호가 사라지게 되고, 형광신호가 반으로 줄어드는 온도를 melting 온도로 보는 것이다 (11). 이 분석은 특이적인 증폭산물을 primer-dimer나 다른 비 특이적인 증폭산물로부터 구별하여 확인할 수 있으며, DNA의 단일 염기변화를 검출할 수 있어 미생물의 동정에 유용하다 (7). Real-time PCR은 기존의 PCR 방법에 비해 PCR 시간이 1시간 이내로 단축되고 핵산 정량을 간단하게 할 수 있으며 폐쇄관 분석 (closed-tube system)하에서 시행되어 증폭산물에 의한 오염을 줄일 수 있다. 또한 민감도가 높아 신속한 결과 확인이 필요하거나 배양 기간이 길고 일반 배양방법으로 검출이 어려운 병원균 검출에 더욱 유용하다 (7).

따라서 기존 *rickettsiae* 동정법의 단점을 보완하기 위해 real-time PCR법을 이용하였다. *groEL* 유전자를 표적으로 SYBR Green I을 이용한 real-time PCR을 실행한 후, melting curve analysis를 통하여 균주를 동정한 결과, SFG 균주는 *T*m 값의 범주가 78.14~78.58℃이고 TG 균주는 *T*m 값의 범주가 76.83~76.95℃이고, STG 균주의 *T*m 값

의 범주가 82.09~84.35℃로 세 그룹 (SFG, TG, STG)이 서로 melting peak가 cluster를 형성하여 잘 구분되고 있다. 또한 *R. typhi*의 plasmid copy 수를 10배 계단희석 후 real-time PCR을 수행한 결과, 1 copy까지 검출하여 민감도도 높았다.

새로운 real-time PCR법을 통하여 우리나라 열성질환 중 가장 많은 질환 중의 하나인 쭈쭈가무시병과 다른 두 그룹의 리케치아 질환을 잘 구분할 수 있을 뿐만 아니라, TG, SFG도 쉽게 구분할 수 있어 새로 발생하고 있는 SFG도 쉽게 진단할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1) **Chung HY:** Rickettsial Infections. *Infect* **17:** 89-92, 1985.

2) **Chung MH, Lee SH, Kim MJ, Lee JH, Kim ES, Kim MK, Park MY, Kang JS:** Japanese spotted fever, South Korea. *Emerg Infect Dis* **12:** 1122-1124, 2006.

3) **Fournier PE, Roux V, Raoult D:** Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* **48:** 839-849, 1998.

4) **Kim KA, Lee SH, Jang WS, Oh MD, Kim I, Choe K:** Two cases of tsutsugamushi disease in the spring. *Korean J Infect Dis* **31:** 46-49, 1999.

5) **Lee JH, Park HS, Jang WJ, Koh SE, Kim JM, Shim SK, Park MY, Kim YW, Kim BJ, Kook YH, Park KH, Lee SH:** Differentiation of rickettsiae by *groEL* gene analysis. *J Clin Microbiol* **41:** 2952-2960, 2003.

6) **Lee JH, Park HS, Jung KD, Jang WJ, Koh SE, Kang SS, Lee IY, Lee WJ, Kim BJ, Kook YH, Park KH, Lee SH:** Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol Immunol* **47:** 301-304, 2003.

7) **Lee MK:** Real-time polymerase chain reaction (PCR) in microbiology. *Infect Chemother* **36:** 105-113, 2004.

8) **Marston EL, Sumner JW, Regnery RL:** Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (*groEL*) of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* **49:** 1015-1023, 1999.

9) **Raoult D, Dasch GA:** Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus* spp. and *Legionella* spp. in patients with Mediterranean spotted fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11:** 13-18, 1995.

10) **Raoult D, Roux V:** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **10:** 694-719, 1997.

11) **Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT:** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245:** 154-160, 1997.

12) **Roux V, Fournier PE, Raoult D:** Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* **34:** 2058-2065, 1996.

13) **Roux V, Raoult D:** Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res Microbiol* **146:** 385-396, 1995.

14) **Roux V, Rydkina E, Eremeeva M, Raoult D:** Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* **47:** 252-261, 1997.

15) **Song HJ, Seong SY, Huh MS, Park SG, Jang WJ, Kee SH, Kim KH, Kim SC, Choi MS, Kim IS, Chang WH:** Molecular and serologic survey of *Orientia tsutsugamushi* infection among field rodents in southern Cholla Province, Korea. *Am J Trop Med Hyg* **58:** 513-518, 1998.