

Distribution and Detection of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks Collected from Jeollanam-do, Korea

Byung Joon Song¹, Hyun Cheol Lim¹, Doo Yung Jeon¹ and Hyeon Je Song^{2*}

¹Department of Microbiology, Jeollanam-do Institute of Health and Environment, Muan; ²Department of Clinical Pathology, Gwangju Health University, Gwangju, Korea

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is firstly reported in China in 2011. Thereafter it is reported an infectious disease in Japan and Korea. It is caused by bunyavirus, called SFTS virus (SFTSV). The main vector of SFTS is *Haemaphysalis longicornis* tick. We investigated the distribution and detection of SFTSV in ticks collected from the environment using the dragging method and dry ice fogging method from May to November 2014 in Jeollanam-do, Korea. Sampling was taken from the province Suncheon, Gokseong, Boseong, Goheung where patients have occurred in 2013 and Gurye as control. Among the total 3,048 ticks collected, 3,030 ticks were *H. longicornis* (99.4%) and 18 were *Amblyomma testudinarium*. *H. longicornis* was collected 1,330 ticks in Gokseong, 1,188 ticks in Boseong, 240 ticks in Suncheon, 150 ticks in Goheung and 140 ticks in Gurye. Developmental stages by month of *H. longicornis* were revealed that nymph (92%) was collected from May to June, adult (30%) and nymph (70%) in July, and 93% of larvae from September to October. These results showed the different dominant stage of ticks according to seasons. However, no SFTSV-specific gene was detected in 3,030 ticks of *H. longicornis*.

Key Words: Severe fever with thrombocytopenia syndrome, *Haemaphysalis longicornis*, Jeollanamdo

INTRODUCTION

우리나라 산림과 들에는 매우 다양한 참진드기, 털진드기, 쯤진드기 등이 서식하고 있다. 참진드기가 매개하는 병원체 중에는 Severe fever thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) 같은 바이러스와 *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia* 등이 있고, 참진드기 중에 따라서는 진드기마비증을 일으키는 것도 있다. 중증열성혈소판감소증후군(Severe fever thrombocytopenia syndrome; SFTS)은 주로 산이나 들판의 야외에서 서식하는 SFTSV 매개체인 작은소피참진드기 (*Haemaphysalis longicornis*)에 물려 감염되는 것으로 알려

졌다. 주요 증상으로는 38℃ 이상의 발열과 소화기 증상인 구토, 설사, 식욕부진 및 림프절 비대, 두통, 근육통, 자반증, 다발성 장기부전 등이 나타나며, 잠복기는 약 1주에서 2주이다. 치료제는 지금까지 없고, 치사율은 12%에서 30%에 달하는 것으로 보고된 바 있다 (1).

SFTS 환자 발생은 중국 중부 및 동북부 지역 중심으로 2011년~12년 사이에 2,047명의 환자 중 129명이 사망하여 6.3%의 사망률을 보였고 (2), 일본은 2013년 첫 감염자 사망 확인 후 43명이 발병, 18명이 사망하여 41.9%의 사망률을 나타냈다 (3). 우리나라의 첫 환자 발생은 2012년 8월에 고열과 심각한 혈소판감소증을 보인 의사환자가 4일 후 다발성 장기부전으로 진행하여 사망하는 사례가

Received: March 9, 2016/ Revised: April 25, 2016/ Accepted: May 27, 2016

*Corresponding author: Hyeon Je Song. Department of Clinical Pathology, Gwangju Health University, 429 Bukmoonde-ro, Gwangsan-gu, Gwangju, 62287, Korea.

Phone: +82-62-958-7622, Fax: +82-62-953-6085, e-mail: songha1@ghu.ac.kr

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

보고된 후 2013년에 36명의 환자 중 17명이 사망하여 48.6%의 사망률을 보였고, 그 중 전남지역에서는 환자 5명이 발생되어 1명이 사망하는 사례가 있었다 (4). 우리나라에서는 2013년부터 제4군 법정감염병으로 지정하여 관리하고 있다.

SFTSV를 매개하는 진드기로는 작은소피참진드기, 몽뚝참진드기(*Amblyomma testudinarium*), 일본참진드기(*Ixodes nipponensis*)가 있으며, 진드기는 주로 4월~9월에 채집되고, 작은소피참진드기가 92%에서 96%를 차지하는 것으로 보고되었다 (5). 작은소피참진드기는 자연계에 존재하는 SFTSV의 주된 매개체이며, 한국을 포함하여 중국, 몽골, 일본 등 동남아시아 전역에 오랫동안 서식해 온 참진드기로 알려져 있다 (6).

본 연구에서는 2014년 5월부터 11월까지 질병관리본부의 2013년 감염병 감시연보 (4)에 따라 전라남도에서 2013년에 SFTS 환자가 발생한 지역을 중심으로 진드기를 채집하였다. 채집한 진드기 종을 분류 동정하여 시기별 및 장소별 분포특성을 조사하고 SFTSV 보유여부를 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)로 확인하여 SFTS 질병 발생에 대비한 예방 기초자료를 제공하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

참진드기 채집

본 연구에 사용한 중증열성혈소판감소증후군 매개진드기는 2014년 5월부터 11월까지 채집하였다. 2013년 전라남도의 SFTS 환자 발생대상 지역인 순천(34°53'36.6"N 127°32'01.7"E), 곡성(35°16'24.5"N 127°11'40.5"E), 고흥(34°32'57.0"N 127°17'40.4"E), 보성(34°50'15.0"N 127°03'20.2"E) 지역을 선정하였으며, 환자 발생은 없었으나 산악지대인 구례(35°12'08.2"N 127°26'56.8"E) 지역을 대조군으로 선정하였다. 진드기 채집방법으로는 용으로 조사지역의 수풀을 끌어내는 방법(Flag method)과 Dry ice fogging을 이용하여 한 조사지역에서 60분 동안 채집하였다. 채집한 진드기는 습도를 유지하기 위하여 특수 제작한 Conical tube (50 ml)를 이용하여 물에 적신 솜을 넣고 실험에 사용할 때까지 냉장보관(4°C)하였다 (5, 6).

참진드기의 형태학적 분류와 생활사 구분

참진드기의 형태학적 분류는 실체현미경(Zeiss, Germany)

을 이용하여 Yamagutsi *et al.* (7)이 제시한 방법에 따라 다음과 같은 특징들을 참고하여 분류 동정하였다. 즉, 참진드기는 대부분 색반을 가지고 있지 않으며, 눈은 없으나 화채는 가지고 있다. 촉지는 짧으며 고깔형태인데 촉지의 2절은 뚜렷하게 양쪽으로 돌출되어 있다. 특히 작은소피참진드기의 특징으로는 수컷의 촉지 제 3절(palpal segment III)은 등쪽으로 거슬러 뻗은 가시돌기(dorsal retrograde spur)를 가지고 있으며, 촉지 제 2절(palpal segment II)은 위와 같은 돌기가 없고 복후방의 가장자리가 약간 볼록하다. 촉지 제 3절(palpal segment III)은 중앙에 등쪽으로 거슬러 뻗은 가시돌기(dorsal retrograde spur)를 가지고 있다. 암컷의 경우 촉지 제 3절(palpal segment III)은 수컷과 마찬가지로 등쪽으로 거슬러 뻗은 가시돌기(dorsal retrograde spur)를 가지고 있고 촉지 제 2절(palpal segment II)은 외측 양 옆으로 어느 정도 돌출되어 있다. 촉지 제 3절은 중간정도의 복측 가시돌기(ventral spur)를 가지고 있다. 흡혈하기 전의 암컷에 비해서 흡혈 후의 암컷의 크기는 100배 이상으로 커지는 반면 수컷은 3~4배 밖에 커지지 않는 특징이 있다는 Soulsby (8)의 방법에 따라 성장발육별 분류를 하였다.

참진드기 유제액 제조 및 RNA 추출

유제액은 2.8 mm stainless-steel bead가 들어있는 분쇄용 튜브에 600 µl의 buffer를 넣고, 참진드기의 유충은 최대 50개체, 약충은 최대 30개체, 성충의 경우 최대 5개체씩 성숙단계별, 종별로 구분한 후 pooling하였다. Buffer의 조성은 멸균된 phosphate-buffered saline (pH 7.0) + 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), penicillin (500 IU/ml, GIBCO BRL)과 streptomycin (500 µg/ml, GIBCO BRL)를 이용하였고, 분쇄용 tube는 Hard Tissue Grinding MK28R (Bertin Technology, Bretonneux, France)를 사용하였다. 분쇄기는 Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Bretonneux, France)를 이용하여 6,000 rpm으로 25초씩 2회 분쇄하고, 분쇄된 진드기 유제액은 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 시험액을 제조하였다. RNA 추출 방법은 Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, South Korea)를 이용하여 제조사의 방법으로 분리하였다. 즉, SFTSV의 특정 유전자인 Medium Segment 유전자를 확인하기 위하여 전 처리한 시료 200 µl를 1.5 ml tube에 옮겨 15초간 vortex하고 상온에서 10분간 방치 후 RNA를 분리하였다.

Table 1. The number of ticks collected from the five regions of Jeollanam-do, 2014

Regions	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	<i>Amblyomma testudinarium</i>	Total
Suncheon	240	0	240
Gokseong	1,320	10	1,330
Gurye	140	0	140
Goheung	150	0	150
Boseong	1,180	8	1,188
Total	3,030	18	3,048

PCR 반응액 제조 및 반응조건

M절편 유전자 검출방법으로 RT-PCR은 primer set (5'-GATGAGATGGTCCATGCTGATTCTAA-3', 5'-CTCATGGG-GTGGAAATGTCCTCAC-3')을 이용하여 DiaStar 2X OneStep RT-PCR Pre-Mix Kit (SolGent, Daejeon, South Korea)의 방법에 따라 수행하였다. 즉 2X OneStep RT-PCR Pre-Mix 15 µl, Primer Forward (10 pmol/µl) 1 µl, Primer Reverse (10 pmol/µl) 1 µl, Template RNA 5 µl, DW 8 µl, Final volume 30 µl로 PCR 반응액을 제조하였다. PCR 조건은 95°C (15 min)에서 Pre-denaturation 하고, Amplification을 35 cycle (95°C/20 sec, 58°C/40 sec, 72°C/30 sec)한 후, 72°C (5 min)에서 Final extension 을 하였다.

증폭산물 전기영동

증폭된 PCR 산물의 확인은 2% agarose 겔(1X TAE buffer)에 PCR 반응액 3 µl씩 6X loading buffer와 섞어 100 V로 40분간 전기영동한 후 밴드의 유무를 gel image analyzer인 MiniBis-Pro (Shimadzu, Kyoto, Japan)로 확인하였다. 산물의 크기는 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) 5 µl (500 ng)를 사용하였고, 음성대조는 반응물에 template DNA를 넣지 않은 것을 사용하였다.

RESULTS

참진드기의 지리적 분포

2014년 5월부터 11월까지 전라남도에서 2013년에 SFTS 환자가 발생한 4개 지역과 환자 발생이 없었던 1개 지역에서 총 3,048마리의 진드기를 채집하였다. 작은소피참진드기가 3,030마리로 대부분이었고(99.4%), 뭇뚱참진드기가

Table 2. Developmental stages of *Haemaphysalis longicornis* collected from the five regions of Jeollanam-do, 2014

Regions	Ticks number	Larvae	Nymph	Adult
Suncheon	240	50	150	40
Gokseong	1,320	1,000	280	40
Gurye	140	0	120	20
Goheung	150	100	20	30
Boseong	1,180	700	450	30
Total	3,030	1,850	1,020	160

18마리 채집되었다. 채집지역에 따라 곡성에서 1,330마리, 보성지역에서 1,188마리 채집되었고, 순천과 고흥에서 각각 240마리, 150마리 채집되었다. 환자 발생이 없었던 구례가 140마리 채집되었다(Table 1). 채집된 3,030마리의 작은소피참진드기는 성충 160마리, 약충 1,020마리, 유충 1,850마리로 동정되었다. 지역별로는 곡성에서는 1,320마리 중 성충 40마리, 약충 280마리, 특히 유충이 1,000마리 채집되었고, 보성에서 채집한 1,180마리 중 성충 30마리, 약충 450마리, 유충 700마리가 채집되었다. 순천에서 채집한 240마리에서는 성충 40마리, 약충 150마리 유충 50마리였으며, 고흥에서 채집한 150마리 중 성충 30마리, 약충 20마리 유충 100마리가 채집되었다. 구례에서 채집한 140마리를 분류한 결과는 성충 20마리, 약충 120마리였으며 유충은 채집되지 않았다(Table 2).

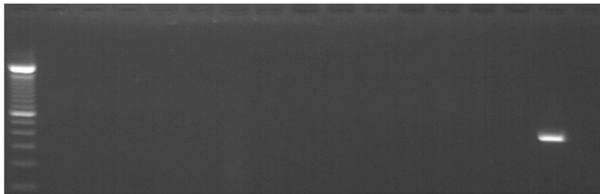
월별 진드기 분포

채집시기별 작은소피참진드기의 채집현황과 주변 환경 온도를 비교한 결과, 채집한 평균기온은 5월에는 26~27°C, 6월에는 30~33°C, 7월에는 32~34°C, 8월에는 잦은 우천으로 인하여 채집을 못하였으며, 9월에는 26~33°C, 10월에는 30~31°C, 11월에는 24°C를 나타냈다(Table 3). 계절별과 발육단계별로 채집 유형을 보면, 유충은 봄부터 여름까지 나타나지 않다가 9월에 나타나기 시작하여 10월까지 짧은 기간 동안 많은 개체수(1,800마리)가 집중적으로 채집되었다. 약충은 5월부터 9월까지 채집(998마리)되었으며, 특히 5월에 많은 개체수(650마리)를 나타냈다. 성충도 5월부터 9월까지 꾸준히 채집되었다(Table 3).

Table 3. Monthly distributional studies of *Haemaphysalis longicornis* based on the developmental stages from the five regions of Jellanam-do, 2014

Month	Regions	Tick number	Larvae	Nymph	Adult	Temperature (°C)
May	Boseong	415	0	400	15	27
	Goheung	49	0	20	29	26
	Gokseong	240	0	230	10	27
June	Gurye	131	0	116	15	33
July	Suncheon	155	0	120	35	34
	Gokseong	60	0	30	30	34
September	Boseong	265	200	50	15	27
	Gurye	9	0	4	5	33
	Gokseong	600	600	0	0	26
	Suncheon	33	0	28	5	28
October	Gokseong	420	400	20	0	30
	Boseong	500	500	0	0	30
	Goheung	101	100	0	1	30
November	Suncheon	52	50	2	0	24
Total		3,030	1,850	1,020	160	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

**Figure 1.** The results of amplification of SFTSV RNAs by RT-PCR from the pooling ticks collected from Jellanam-do, 2014. Lane 1 show molecular weight marker, lane 2~15: PCR products from the pooling ticks, lane 16: positive control (410 bp), lane 17: negative control.

채집된 작은소피참진드기의 SFTSV 검사

적은 수가 채집된 뭇목참진드기를 제외하고 채집된 작은소피참진드기의 RNA를 추출하여 SFTSV를 확인하기 위하여 진드기를 103회 pooling하여 2X OneStep RT-PCR 방법으로 SFTSV 유전자를 탐지한 결과 양성은 확인되지 않았다(Fig. 1).

DISCUSSION

우리나라에는 8개 속 32개 종의 참진드기가 보고되었다 (9). 경기도의 동물과 수풀에서 5종의 진드기가 동정되었고 그 중 작은소피참진드기가 91.8%였고, 강원도에서 총 516마리의 진드기 중 95.7%가 작은소피참진드기로 동정되었다 (10). 충주지역 야산에서는 2002년과 2003년에 85%가 작은소피참진드기로 보고되었다 (11). 동물에서 참진드기를 채집하여 분류한 결과 54.4%가 작은소피참진드기로 동정되었으며 (12), 국내에서 주로 관찰되고 있는 진드기는 특히 방목장을 중심으로 작은소피참진드기가 우리나라 거의 전 지역에서 서식하는 것으로 보고하였다 (13~15). 본 연구에서도 작은소피참진드기가 99.4%로 대부분이었다. 지역적으로 곡성과 보성지역에서 1,000마리 이상 채집되었고, 순천과 고흥에서 150~250마리 채집되었다. 환자 발생이 없었던 구례가 140마리로 가장 적은 수가 채집되었으며(Table 1), 또한 구례에서 채집한 140마리에서 유충은 채집되지 않았다(Table 2). 이 결과는 구례지역에 2013년 환자 발생이 없었던 사실을 고려해 볼 때 서

식하는 작은소피참진드기가 적어서 환자 발생이 없었는지에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

참진드기는 알, 유충, 약충, 성충 등의 4가지 발육단계를 가지고 있으며, 유충은 흡혈한 후에 탈피하여 약충(nymph)으로 발육하고 다시 숙주에게 달라붙어 흡혈한 후 탈피하여 성충(adult)으로 발육한다. 계절에 따라 채집되는 진드기의 발육단계가 차이가 있는데, 유충은 9월과 10월에 집중적으로 채집되고 약충과 성충은 5월부터 9월까지 채집되다가 10월 이후에는 채집되지 않는 뚜렷한 계절적 차이를 보였다(Table 3). 다른 보고 (11, 12)에서 성충은 4월부터 8월까지 채집되었지만, 자충은 전 조사기간에 걸쳐 다른 발육단계의 개체보다 훨씬 높은 채집 비율을 보이며 5월에 최고치를 나타냈고, 유충은 8월에 나타나기 시작하여 10월까지 채집되었다는 결과와 비교하여 볼 때 본 조사에서도 같은 계절적 분포를 보였다.

작은소피참진드기가 자연계에 존재하는 SFTSV의 주된 매개체라고 알려져 있고 (16), SFTSV를 진단하는 다양한 방법 중 SFTSV의 L, M 및 S segment 모두의 highly conserved region을 이용한 OneStep RT-PCR이 사용되어지고 있고, 민감도와 특이도는 각각 98.6%와 99.0%라고 보고되었다 (17). Park *et al.* (14)은 우리나라 9개 지역에서 11,856마리의 작은소피참진드기를 채집하여 SFTSV를 확인한 결과 0.46% (55 pools)의 최소감염률을 보고하였다. 한편 Yun *et al.* (16)은 261마리의 참진드기를 채집하여 SFTSV 양성률이 평균 6.9%, 특히 작은소피참진드기는 5.7%를 나타냈다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 채집된 진드기를 pooling하여 2X OneStep RT-PCR 방법으로 유전자를 분석하였으나 SFTSV 유전자 검출이 되지 않았다 (Fig. 1). 이와 같이 진드기에서 바이러스의 검출률이 다른 보고와 차이를 보였는데, 앞으로 조사지역에 따라 진드기의 바이러스 감염률이 차이가 있는지를 알아볼 필요가 있어 지속적인 조사가 요구된다.

REFERENCES

- 1) Kim KH, Oh MD. Severe fever with thrombocytopenia syndrome. Korean J Med 2014;86:271-6.
- 2) Ding F, Zhang W, Wang L, Hu W, Soares Magalhaes RJ, Sun H, *et al.* Epidemiologic features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-2012. Clin Infect Dis 2013;56:1682-3.
- 3) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, *et al.* The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. J Infect Dis 2014;209:816-27.
- 4) Korean Center for Disease Control and Prevention. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Korean (Internet). Osong: Korean Center for Disease Control and Prevention. Available From: http://www.cdc.go.kr/CDC/info/CdcKrInfo0302.jsp?menuIds=HOME001-MNU1132-MNU1138-MNU0038&fid=32&q_type=&q_value=&cid=27068&pageNum=
- 5) Kim HC, Han SH, Chong ST, Klein TA, Choi CY, Nam HY. Ticks collected from selected mammalian hosts surveyed in the Republic of Korea during 2008-2009. Korean J Parasitol 2011;49:331-5.
- 6) Kim KH, Yi J, Kim G, Choi SJ, Jun KI, Kim NH, *et al.* Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. Emerg Infect Dis 2013;19:1892-4.
- 7) Yamaguti N, Tipton VJ, Keegan HL, Toshioka S. Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu Islands. Brigham Young Univ Sci Bull Biol Ser 1971;15:1-226.
- 8) Soulsby EJJ. Helminths, arthropods, & protozoa of domesticated animals, 7th Edition, Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1982. p.456-67.
- 9) Kim CM, Yi YH, Yu DH, Lee MJ, Cho MR, Desai AR, *et al.* Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. Appl Environ Microbiol 2006;72:5766-76.
- 10) Shin SH, Seo HJ, Choi YJ, Choi MK, Kim HC, Klein TA, *et al.* Detection of *Rickettsia monacensis* from *Ixodes nipponensis* collected from rodents in Gyeonggi and Gangwon Provinces, Republic of Korea. Exp Appl Acarol 2013;61:337-47.
- 11) Lee JH, Ahn SJ, Park HS, Jeong EJ, Choi HG, Jang WJ, *et al.* Prevalence of Spotted Fever Group *Rickettsia* from *Haemaphysalis* Ticks in Chungju Province. J Bacteriol Virol 2005;35:203-7.
- 12) Kim HC, Han SH, Chong ST, Klein TA, Choi CY, Nam HY, *et al.* Ticks Collected from Selected Mammalian Hosts Surveyed in the Republic of Korea During 2008-2009. Korean J Parasitol 2011;49:331-5.
- 13) Lim CS, Lee WK. Acari Attracted to Carrion of Chicken and Cattle, Korean J Sail Zool 2005;10:16-21.

- 14) Park SW, Song BG, Shin EH, Yun SM, Han MG, Park MY, *et al.* Prevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in *Haemaphysalis longicornis* ticks in South Korea. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:975-7.
 - 15) Kim BJ, Kim H, Won S, Kim HC, Chong ST, Klein TA, *et al.* Ticks Collected from Wild and Domestic Animals and Natural Habitats in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 2014;52:281-5.
 - 16) Yun SM, Lee WG, Ryou J, Yang SC, Park SW, Roh JY, *et al.* Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in Ticks Collected from Humans, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1358-61.
 - 17) Sun Y, Liang M, Qu J, Jin C, Zhang Q, Li J, *et al.* Early diagnosis of novel SFTS bunyavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol* 2012;53:48-53.
-