

Detection and Identification of the Spotted Fever Group Rickettsial Agents from *Haemaphysalis* Ticks in Jeju Island, Korea

Bong-Chun Moon¹, Jae-Hee Jeong², Yeon-Joo Choi², Jung-Eun Kim², Hyun-Ji Seo², E-Hyun Shin³,
Bong-Gu Song³, Hee Il Lee⁴, Seung-Hyun Lee², Kyung-Hee Park² and Won-Jong Jang^{2*}

¹Institute of Environmental Resource Research of Jeju Special Self-Governing Province, Jeju,

²Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, Seoul,

³Department of Medical Entomology, ⁴Division of Biosafety Evaluation and Control, Korea Center for Disease Control and Prevention, Seoul, Korea

This study investigated the presence of nucleic acids of various *Rickettsial* agents in ticks collected in Jeju Island, Korea from June 2007 to August 2008, through the nested polymerase chain reaction (PCR) and sequencing analysis of partial citrate synthase (*gltA*), *Rickettsial* outer membrane protein B (*ompB*), and 17-kDa genes. Examination of the 1,584 ticks showed that the subspecies distribution of *Haemaphysalis longicornis* was 99.81% (n=1,581) and *H. flava* was 0.19% (n=3). A total 224 out of 250 pools from one to 15 ticks were found to be positive in *ompB*-PCR assay (minimal infection rate 141 ticks/1,000 tested). From the positive samples, 26 were analyzed by *gltA*- and 17-kDa-PCR assays. The nucleotide sequences of the *ompB*- and *gltA*-PCR products showed a high degree of similarity with those of the *Rickettsia japonica* (98.7~99.2% and 98.7~99.3%, n=25) and *R. monacensis* (99% and 99.7%, n=1). However, analysis of the nucleotide sequences of the 17-kDa-PCR amplicons showed that the sequences of the 25 PCR amplicons were more close to *R. marmionii* (99.4~100%) than *R. japonica* (98.6~99.1%). These findings suggest that various rickettsial diseases could be transmitted via the bite of tick vectors in Jeju Island, Korea.

Key Words: *Rickettsial* agents, Tick, Polymerase chain reaction, *gltA*, *ompB*, 17-kDa gene

서 론

리케차 (family *Rickettsiaceae*, order *Rickettsiales*)는 그 람 음성 간균으로 세포 내 기생하여 자라며 (1), 길이는 0.7~1.0 μm , 폭은 0.3~0.5 μm 이다. 리케차의 3층의 세포벽은 inner cytoplasmic membrane, periplasmic space, outer membrane으로 구성된다 (2~4). 리케차는 항원과 표현형을 기본으로 typhus group (티푸스군), spotted fever group (홍반열군), scrub typhus group (쓰쓰가무시군, 현재는 리

케차가 아닌 *Orientia*로 구분됨)과 같이 3개의 군으로 구분된다 (5). 최근에는 16S rRNA, genus-common 17-kDa antigen, citrate synthase (*gltA*), rickettsial outer membrane proteins A (*ompA*)와 B (*ompB*) 유전자를 사용한 polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), 염기서열 분석 기술을 통해 리케차를 구분할 수 있다 (6~10). 리케차는 자연에서 이, 진드기, 벼룩 등의 흡혈성 절지동물에 기생하고 이들을 매개로 하여 사람에게 전파되어 질환을 일으키며 (11), 주요 임상증세는 일반적으로 절지동물에게 물린지 6~10일 후에 나타나기 시작하며, 39.5~40.0°C의 고열과 두통, 오한, 근육통 및 발진의 전신증상을 보인다 (11, 12). 또한 병리학적으로 리케차 증식은 모세혈관의 내피세포에서 일어나며 이 세포내에서 혈관염을 일으킨다. 이 질병은 가볍거나 심각할 수 있지만 보통 2~3주간 지속된다 (12).

Received: October 29, 2009/ Revised: November 19, 2009

Accepted: November 23, 2009

*Corresponding author: Won-Jong Jang, Ph.D., Department of Microbiology, College of Medicine, Konkuk University, Gwangjin-Gu, Seoul 143-729, Korea.

Phone: +82-2-2030-7816, Fax: +82-2-2030-7845

e-mail: wjang@kku.ac.kr

리케차를 감염시키는 절지동물 중 진드기는 거미, 전갈 등과 같이 거미강 (*Arachnida*)에 속하며, 큰진드기 (ticks)와 좀진드기 (mites)로 구분된다. 큰진드기는 참진드기과 (*Ixodidae*, hard ticks)와 공주진드기과 (*Argasidae*, soft ticks)의 2파로 나눠진다. 좀진드기는 옴진드기과 (*Sarcoptidae*)와 먼지진드기과 (*Pyroglyphidae*)가 있다. 진드기는 세계적으로 널리 분포하며, 서식처의 다양성과 각기 다른 생활습성을 가지며 발달단계는 유충 (larvae)시기를 지나 자충 (nymph)시기를 거쳐 성충 (adults)이 된다 (13, 14). 우리나라에 서식분포하고 있는 큰진드기 종은 공주진드기과의 *Argas* 속에 3종, 참진드기과의 *Amblyomma* 속 1종, *Bophilus* 속 2종, *Dermacentor* 속 3종, *Haemaphysalis* 속 8종, *Ixodes* 속 10종 그리고 *Rhipicephalus* 속 1종 등 총 3과 7속 28종이다 (15). *Haemaphysalis longicornis* (작은소참진드기)와 *H. flava* (개피참진드기)는 *Haemaphysalis* 속에 속하는 종이다. *H. longicornis*는 전국적으로 분포하며, 발생밀도가 가장 높은 종으로 (16), 국내 환자들에서 교상 (biting)이 보고되고 있다 (17, 18). *H. flava*는 역시 국내에 분포하며, 그 교상이 30대 여자 환자에서 보고된 바 있다 (19). 이러한 진드기는 리케차의 주요 숙주이자 병원 소로서 리케차 감염증과 매우 높은 관련이 있다 (20).

이 연구의 목적은 제주도에 서식하고 있는 진드기 종

의 분포를 알아보고, 분자생물학적인 방법으로 흥반열군 리케차의 감염여부와 감염된 리케차의 종을 분류하는데 있다.

재료 및 방법

진드기 채집 및 분류·동정

본 연구에 사용한 진드기는 2007년부터 2008년도에 걸쳐 제주도에서 1 m² flannel flag를 사용하여 dragging과 flagging 방법을 이용하여 채집하였다. 채집된 개체는 75% ethanol에 넣어 보관한 후 해부현미경을 이용하여 분류·동정하였다 (21). 진드기는 유충, 자충, 수컷성충, 암컷성충으로 분류하였다. 진드기는 채집 지역별, 진드기 종별로 고려하여 유충과 자충은 시료당 1~15마리를 기준으로 나누었으며, 암컷성충과 수컷성충은 시료당 1~5마리를 기준으로 하여 전체를 250개의 시료가 되게 나누었다 (Table 2).

진드기로부터 DNA 추출

분류·동정된 진드기로부터 DNA를 추출하기 위하여 각각의 진드기를 eppendorf tube에 넣고 filtered tip (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)으로 파쇄하여 30 μl의

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers and conditions used in this study

Target gene ^a	Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Products size	PCR condition				References
				Denaturation ^c	Annealing ^c	Extension ^c	Cycles	
<i>ompB</i>	WJ77 OF	GTAACCGGAAGTAATCGTTCGTAA	500 bp	94	54	72	40	23
	WJ80 ^b OR	GCTTTATAACCAGCTAACCCACC						
	WJ79 SFG IF	GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA	SFG 407 bp	94	56	72	35	
	WJ83 TG IF	AAGATCCTTCTGATGTTGCAACAA	TG 231 bp					
	WJ78 ^b SFG/TG IR	GGTTTGCCCCATATACCATAGG						
<i>gltA</i>	RpCS.877p OF	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381 bp	94	52	72	35	24
	RpCS.1,258n ^b OR	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA						
	RpCS.896p IF	GGCTAATGAAGCAGTGATAA	330 bp	94	54	72	30	
	RpCS.1,233n ^b IR	GCGACGGTATAACCCATAGC						
17-kDa	Rr17k. 1p OF	TTTACAAAATTCTAAACCAT	540 bp	94	47	72	35	25
	Rr17k. 539n ^b OR	TCAATTCAACAATTGCCATT						
	Rr17k. 90p IF	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	360 bp	94	47	72	30	
	Rr17k. 417n ^b IR	TTTCCGCCTATTACAACGTGTT						

^a *ompB*, specific outer membrane protein B gene; *gltA*, *Rickettsia* citrate synthase gene; 17-kDa, *Rickettsia* genus-specific outer membrane antigen gene,

^b Reverse orientation, ^c Temperature (°C).

phosphate buffered saline (인산완충식염수, PBS, pH 7.4)을 추가하여 부유시켰다. 이것을 Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) method (22)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)

진드기로부터 추출한 DNA에 리케차 DNA가 검출되는지 보기 위하여 *ompB*, *gltA*, 17-kDa 유전자에 특이적으로 반응하는 프라이머 (23~25)들을 사용하였다 (Table 1).

1, 2차 PCR 모두 0.5 U의 Taq DNA polymerase, 250 mM의 dNTPs, 50 mM의 Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM의 KCl, 1.5 mM의 MgCl₂, gel loading dye가 포함되어 있는 premixture (AccuPower PCR PreMix, Bioneer, Daejeon, Korea)에 한 쌍의 10 pmol 프라이머들을 넣어 총 20 μl의 반응액으로 맞춰 PCR을 수행하였다.

PCR은 Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하였으며, 1차 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 20초간 denaturation, 47~54°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 순으로 반응시켰으며, 최후 반응 72°C에서 3분간 반응 시켜 PCR 산물의 연장을 유도하였다. 이 때 증폭횟수는 35~40 cycle로 하였다. 2차 PCR 반응의 증폭횟수는 30~35 cycle로 하였으며, 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 20초간 denaturation, 47~56°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension 순으로 반응시켰고, 최후 반응 72°C에서 3분간 반응시켰다 (Table 1). PCR 수행 시

양성 대조군으로 *R. japonica* DNA (ATCC; American Type Culture Collection, VR-1363)를 template로 사용하였으며, 음성 대조군으로 template DNA 대신 종류수를 사용하였다. PCR 산물은 ethidium bromide (0.5 μg/ml)를 첨가하여 제작한 1.2% agarose gel에 전기영동하였으며, standard molecular weight marker 100 bp DNA Ladder (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 함께 증폭된 DNA 부분을 확인하였다.

클로닝 및 염기서열 분석

2차 PCR 반응 후 양성을 나타내는 산물은 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 추출하였으며, pGEM-T Easy Vector system I (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하였다. 클론들이 삽입유전자를 가지고 있음을 확인하기 위하여 plasmid DNA를 분리하고 EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)으로 절단하여 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. 염기서열은 (주)제노텍 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 분석된 염기서열들은 프라이머 부분을 제외하고 GenBank database의 다른 리케차의 해당 염기서열과 MegAlign software package (Windows version 7.1; DNA-STAR, Madison, WI, USA)의 multisequence alignment program을 이용하여 비교하였다. 'Neighbor-joining algorithm'과 'Jukes and Cantor matrix'를 이용하여 phylogenetic tree를 제작하고, tree의 안정성을 조사하기 위하여 bootstrap analysis를 수행하였다.

Table 2. Tick collected at Jeju Island, Korea, 2007~2008

Species	Stages	Collection								No. ticks	No. pools
		2007			2008						
		June	July	August	April	May	June	July	August		
<i>H. longicornis</i>	Larvae ^a	0	0	3	0	0	0	0	0	3	1
	Nymph ^b	614	223	36	26	130	115	20	9	1,173	104
	Adults male ^c	44	77	14	0	4	33	3	4	179	65
	Adults female ^c	49	99	26	0	1	36	8	7	226	77
<i>H. flava</i>	Larvae ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nymph ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Adults male ^c	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Adults female ^c	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2
Total		708	399	79	26	136	184	31	21	1,584	250

^a 1~5 larvae/pool, ^b 1~15 nymphs/pool, ^c 1~5 adults/pool

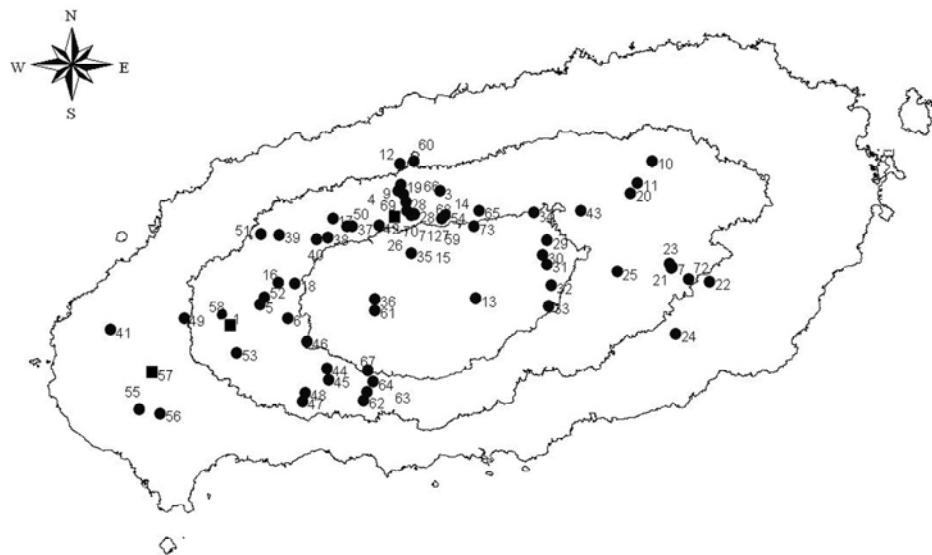


Figure 1. Map of Jeju Island, Korea showing the geographic distribution of ticks collected from 2007 to 2008. Dots indicate the collection area of the *H. longicornis* and squares indicate the collection area of *H. longicornis* and *H. flava*.

결과

진드기의 종별 분포

2007년 6월부터 8월까지와 2008년 4월부터 8월에 걸쳐 제주도에서 채집한 진드기는 총 1,584마리였으며, 해부현미경을 이용하여 분류한 결과 *H. longicornis*의 유충 단계가 3마리, 자충 단계가 1,173마리, 수컷성충 단계가 179마리, 암컷성충 단계가 226마리로 총 1,581마리 (99.81%)였다. *H. flava*는 수컷성충 단계가 1마리, 암컷성충 단계가 2마리로 총 3마리 (0.19%)였다 (Table 2). *H. longicornis*는 제주도 전 지역에서 채집되었고, 3마리의 *H. flava* 중 수컷성충 단계의 1마리는 동경 126°33'29.0'', 북위 33°25'36.4''에서, 암컷성충 단계가 2마리 중 1마리는 동경 126.17'15.8'', 북위 33°20'32.8''에서, 나머지 1마리는 동경 126°27'45.7'', 북위 33°20'56.8''에서 채집되었다 (Fig. 1).

진드기 DNA 추출물로부터 PCR 증폭산물을 확인

진드기는 성숙 단계를 기준으로 하여 1,581마리의 *H. longicornis*를 247개의 pooled sample (합동시료), 3마리의 *H. flava*를 3개의 진드기 시료로 나누어 전체 250개의 진드기 시료들로 만들었다 (Table 2). 250개의 시료들에서 추출한 각각의 DNA에서 *ompB* 유전자를 증폭시켜 검출한 결과, *H. longicornis* 시료들은 224개 [1,000마리 시험시 최소 감염율 142 (=224 양성합동시료수/검사한 1,581마리 진드기 × 1000)]에서 407 bp 크기의 증폭산물을 보

였으며, *H. flava* 시료들은 모두 음성반응을 보였다 (data not shown). 양성반응을 보인 224개의 시료들 중 26개의 시료를 선별하여 *gltA*, 17-kDa 유전자를 표적으로 하는 nested PCR을 수행하였다. *gltA* PCR 결과 26개 (100%)에서 330 bp 크기의 증폭산물을 나타내었으며, 17-kDa PCR 결과 25개 (96.2%)에서 360 bp 크기의 증폭산물을 나타내었다 (Fig. 2).

클로닝 및 염기서열 분석

각 partial *ompB*, *gltA*, 17-kDa 유전자의 증폭산물을 TA vector에 클로닝한 후 각 산물 당 1개의 클론의 염기서열 분석하여 GenBank database에서 얻은 다양한 리케차 염기서열과 비교하였다. Table 3은 GenBank database에서 얻은 다양한 리케차 *ompB* 염기서열들과 본 연구에서 얻은 224개의 *ompB*-PCR 산물 클론들 중 선별된 10개 클론들의 염기서열을 비교한 것이다. 10개의 클론들 중 9개의 클론들 (No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 cluster를 형성하였으며, 98.7~99.2%의 유사도를 나타냈다. 10개의 클론들 중 1개의 클론 (No. 226)은 *R. monacensis*와 독립적인 cluster를 형성하였으며, 99.0%의 유사도를 나타냈다. 각 클론들의 리케차 genus의 분류에서 genotype의 위치를 확인하기 위하여 *ompB* 유전자의 염기서열 분석에 근거하여 계통발생학적인 분석을 수행하였다. 9개의 클론들 (No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 유사도를 갖는 Group 1과 *R. monacensis*와 유사도를 갖는 1개의 클론 (No. 226)을 포함하는 Group 2

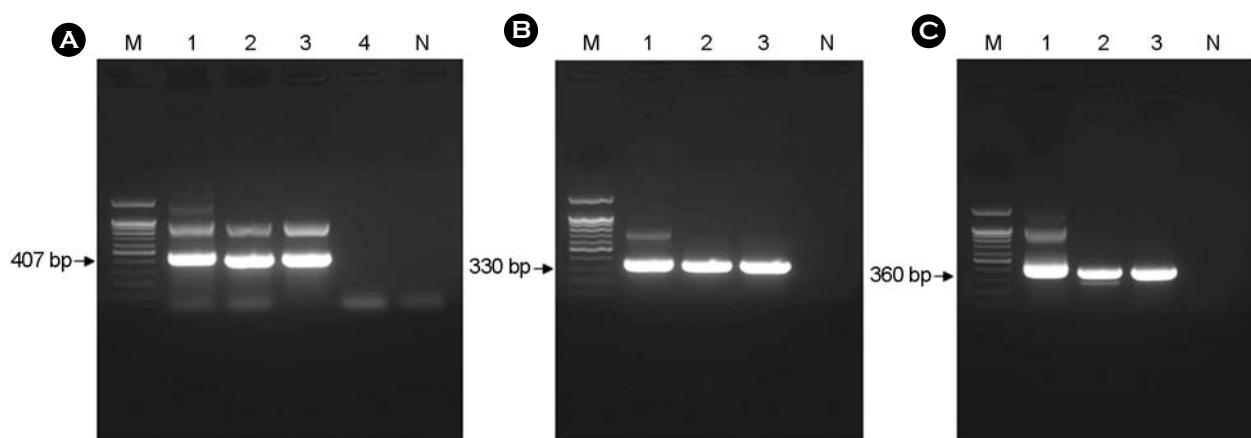


Figure 2. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by PCR targeted *ompB* (panel A), *gltA* (panel B), and the 17-kDa (panel C) antigen gene. (A) The size of amplified *ompB* product was about 407 bp. Lane 1, positive control (*R. japonica*); lane 2~4, each number of the amplified *ompB* products. (B) The size of amplified *gltA* product was about 330 bp. Lane 1, positive control (*R. japonica*); lane 2~3, each number of the amplified *gltA* products. (C) The size of amplified 17-kDa product was about 360 bp. Lane 1, positive control (*R. japonica*); lane 2~3, each number of the amplified 17-kDa products. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane N, negative control. The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) of the amplified PCR products.

Table 3. Similarity matrix between partial *ompB* gene sequence of various *Rickettsia* strains and nested PCR *ompB* products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	92.9	99.2	95.4	94.2	99	94.9	95.2	95.4	94.9	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4	93.2
2		-	92.9	89.8	91.9	92.1	89.3	89.5	89.8	89.3	89.5	89.8	89.8	89.8	89.8	90.6
3			-	95.7	94.8	98.7	95.2	95.4	95.7	95.2	95.4	95.7	95.7	95.7	95.7	93.7
4				-	91.7	95.4	98.7	98.9	99.2	98.7	98.9	99.2	99.2	99.2	99.2	90.3
5					-	93.7	91.2	91.4	91.7	91.2	91.4	91.7	91.7	91.7	91.7	99
6						-	94.6	95.2	95.4	94.9	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4	92.7
7							-	99.2	99.5	98.9	99.2	99.5	99.5	99.5	99.5	90.9
8								-	99.7	99.2	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	91.2
9									-	99.5	99.7	100	100	100	100	91.4
10										-	99.2	99.5	99.5	99.5	99.5	90.9
11											-	99.7	99.7	99.7	99.7	91.2
12												-	100	100	100	91.4
13													-	100	100	91.4
14														-	100	91.4
15															-	91.4
16																-

1, partial *ompB* of *R. africae* (AF123706); 2, *R. akari* (AF123707); 3, *R. conorii* (AF149110); 4, *R. japonica* (AB003681); 5, *R. monacensis* (EF380356); 6, *R. sibirica* (AF123722); 7, *ompB* PCR clone 1; 8, clone 5; 9, clone 14; 10, clone 35; 11, clone 45; 12, clone 81; 13, clone 85; 14, clone 97; 15, clone 100; 16, clone 226

로 clustering 되었다 (Fig. 3).

Table 4는 GenBank database에서 얻은 다양한 리케자 *gltA* 염기서열과 본 연구에서 얻은 *gltA* 클론 26개 중 10

개의 클론들을 비교한 것이다. 10개의 클론들 중 9개의 클론들 (No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 cluster를 형성하였으며, 98.7~99.3%의 유사도를 나

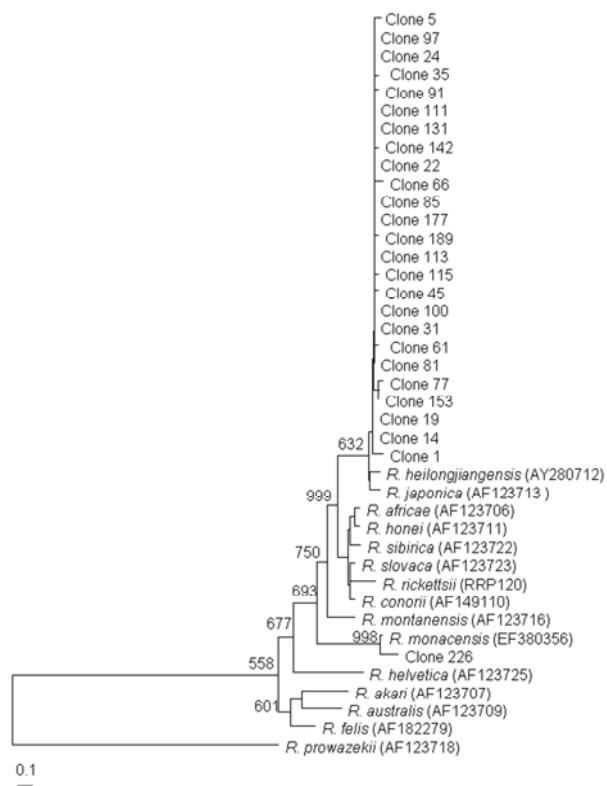


Figure 3. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *ompB* gene sequences (the size of about 407 bp) of various *Rickettsia* strain and PCR-amplified *ompB* products from tick. Phylogenograms were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

타냈다. 10개의 클론들 중 1개의 클론 (No. 226)은 *R. monacensis*와 cluster를 형성하였으며, 99.7%의 유사도를 나타냈다. 각 클론들을 계통발생학적인 분석을 수행한 결과, *R. japonica*와 유사도를 갖는 9개 클론들을 포함하는 Group 1과 *R. monacensis*와 유사도를 갖는 1개 클론을 포함하는 Group 2로 clustering되었다 (Fig. 4).

Table 5는 다양한 리케차 17-kDa 염기서열들과 본 연구에서 얻은 25개의 17-kDa 양성 클론들 중 9개의 클론들을 비교한 것이다. 9개의 클론들 (No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 모두 *R. marmionii*와 cluster를 형성하였으며 유전자 염기서열 유사도를 분석한 결과, 9개의 클론들은 *R. marmionii*와 99.4~100%의 유사도를 나타냈다. 각 클론을 계통발생학적인 분석을 수행한 결과, *R. marmionii*와 유사도를 갖는 9개의 클론들을 포함하는 Group 1으로 clustering 되었다 (Fig. 5).



Figure 4. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *gltA* gene sequences (the size of about 330 bp) of various *Rickettsial* strains and PCR-amplified *gltA* products from tick. Phylogenograms were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

고찰

리케차는 자연에서 이, 진드기, 벼룩 등의 흡혈성 절지동물에 기생하고, 이들을 매개로 하여 사람에게 전파되는 질환으로 인간에게 감염되면 심각한 질병을 야기한다 (8). 리케차 질환은 그 원인이 되는 리케차 종에 따라 여러 group으로 나뉘어진다. 현재까지 알려진 리케차는 약 25종이며 (26), 그 중 *R. japonica*는 Japanese spotted fever를 일으키는 원인체이며, 1984년 일본에서 처음 분리되었으며, 그 이후로 다수의 환자가 보고되었다 (27, 28). 국내에서는 *H. longicornis* 진드기에서 그 핵산이 존재가 확인되었으며 (29), 최근 환자에서도 분리된 바 있다 (30). *R. monacensis*는 독일의 English Garden에서 채집한 *Ixodes ricinus* 진드기에서 최초로 분리된 바 있으며, Slovakia와 Bulgaria의 *I. ricinus* 진드기에서 분리되었다 (31). 최근에는 Algeria에서 채집된 *I. ricinus* 진드기에서 분리되었으

Table 4. Similarity matrix between partial *gltA* gene sequence of various *Rickettsia* strains and nested PCR *gltA* products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	94.6	99.3	99.3	100	96	100	98.3	98	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
2		-	93.6	94.6	94.6	96	94.6	93.6	94	94	93.6	93.6	93.6	94	94	94	96.3
3			-	98.7	99.3	95	99.3	97.7	97.3	98	97.7	97.7	97.7	98	98	98	94.6
4				-	99.3	96	99.3	99	98.7	99.3	99	99	99	99.3	99.3	99.3	95.7
5					-	96	100	98.3	98	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
6						-	96	95	94.6	95.3	95	95	95	95.3	95.3	95.3	99.7
7							-	98.3	98	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
8								-	99	99.7	99.3	99.3	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
9									-	99.3	99	99	99	99.3	99.3	99.3	94.3
10										-	99.7	99.7	99.7	100	100	100	95
11											-	99.3	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
12												-	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
13													-	99.7	99.7	99.7	94.6
14														-	100	100	95
15														-	100	95	
16															-	95	
17																-	

1, partial *gltA* of *R. africae* (RAU59733); 2, *R. akari* (RAU59717); 3, *R. conorii* (RCU59730); 4, *R. japonica* (RJU59724); 5, *R. marmionii* (AY737684) 6, *R. monacensis* (DQ100163); 7, *R. sibirica* (RSU59734); 8, *gltA* PCR clone 1; 9, clone 5; 10, clone 14; 11, clone 35; 12, clone 45; 13, clone 81; 14, clone 85; 15, clone 97; 16, clone 100; 17, clone 226

Table 5. Similarity matrix between partial 17-kDa gene sequence of various *Rickettsia* strains and nested PCR 17-kDa products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	93.6	99.1	98.3	98	94.2	99.1	97.4	98	98	98	98	98	98	98	98
2		-	94.2	93.9	93.9	93.3	94.2	93.3	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9
3			-	98.6	98.3	94.8	99.4	97.4	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
4				-	99.1	94.5	98.6	98.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1
5					-	94.2	98.3	99.4	100	100	100	100	100	100	100	100
6						-	94.8	93.6	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2
7							-	97.7	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
8								-	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
9									-	100	100	100	100	100	100	100
10										-	100	100	100	100	100	100
11											-	100	100	100	100	100
12												-	100	100	100	100
13													-	100	100	100
14														-	100	100
15															-	100
16																-

1, partial 17-kDa of *R. africae* (AF445383); 2, *R. akari* (AF445383); 3, *R. conorii* (AE008675); 4, *R. japonica* (RIR17KGCA); 5, *R. marmionii* (AY737683); 6, *R. monacensis* (EF380355); 7, *R. sibirica* (AF445384); 8, 17-kDa PCR clone 1; 9, clone 5; 10, clone 14; 11, clone 35; 12, clone 45; 13, clone 81; 14, clone 85; 15, clone 97; 16, clone 100



Figure 5. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial 17-kDa gene sequences (the size of about 360 bp) of various *Rickettsia* strain and PCR-amplified 17-kDa products from tick. Phylogenograms were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

며 (32), Spain에 환자의 혈액에서 균주가 분리되어 인체에 감염될 수 있음이 확인되었다 (33). *R. marmionii* (호주의 리케차 학자 'Marmion'의 이름에서 유래)는 Flinders Island spotted fever의 원인체인 *R. honei*의 genetic variant strain으로 알려져 있으며 (34), 호주의 동부지역에서 발견되었다 (20, 35).

본 연구에서는 제주도 지역에서 채집한 진드기의 동정을 통해 진드기의 종의 분포를 확인하는 한편, 리케차 특이 유전자를 PCR 방법으로 검출하여 그 염기서열을 분석하여 리케차의 존재 유무의 확인과 균종의 규명에 초점을 맞추었다. 2007년부터 2008년에 걸쳐 제주도에서 채집한 진드기는 총 1,584마리였으며, 종을 분석한 결과 *H. longicornis*가 1,581마리 (99.81%), *H. flava*는 3마리 (0.19%)였다. 따라서 제주도 지역은 *H. longicornis*가 우점종인 것으로 확인되었다.

ompB 유전자를 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 nested PCR을 수행한 결과 *H. longicornis* 시료들에서 최

소감염률은 142였으며 (1,000마리 검사기준), *H. flava* 시료들에서 최소감염률은 0이었다. 본 실험의 결과로 흥분열군 리케차의 감염이 일어 날 수 있다는 것을 알 수 있었다. 하지만 이번 실험에 사용한 *H. flava*의 개체수가 적어 감염률을 정확히 확인하기에는 부족한 면이 있다고 할 수 있다. 따라서 더 많은 *H. flava*의 개체 수를 확보하여 확인할 필요가 있다고 사료된다.

*H. longicornis*에서 추출한 247개의 시료 중 *ompB*-PCR에서 224개에서 양성반응을 보였으며, 이중 26개를 선별하여 PCR을 실시하여 그 산물을 클로닝하여 염기서열을 분석한 후 GenBank database에서 얻은 다양한 리케차 partial *ompB*, *gltA*, 17-kDa 유전자 염기서열과 비교, 분석하였다.

첫 번째로 기준에 알려진 다양한 리케차 partial *ompB* 유전자의 염기서열들과 *ompB*-PCR 산물 클론들의 염기서열을 비교하였다. 총 26개의 클론들 중 25개의 클론들은 *R. japonica*와 가장 높은 유사도 (98.7~99.2%)를 보였으며, *R. africae*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. monacensis*, *R. sibirica*의 염기서열과 각각 94.9~95.4%, 89.3~89.8%, 95.2~95.7%, 91.2~91.7%, 94.6~95.4%의 유사도를 나타내었다. 25개의 클론들 중 5개의 클론들 (No. 1, 35, 61, 66, 77)은 *R. japonica*와 98.7%, 7개의 클론들 (No. 5, 45, 91, 115, 142, 153, 226)은 *R. japonica*와 98.9%, 13개의 클론들 (No. 14, 19, 22, 24, 31, 81, 85, 97, 100, 111, 113, 131, 177)은 *R. japonica*와 99.2%의 유사도를 보였다. 그리고 26개의 클론들 중 1개의 클론 (No. 226)은 *R. monacensis*와 99.0%의 유사도를 보였다.

두 번째로 기준에 알려진 다양한 리케차 partial *gltA* 유전자의 염기서열들과 *gltA*-PCR 산물 클론들의 염기서열을 비교하였다. 총 26개의 클론들 중 25개의 클론들은 *R. japonica*와 가장 높은 유사도 (98.7~99.3%)를 보였으며, *R. marmionii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. monacensis*, *R. sibirica*의 염기서열과 각각 98.0~98.7%, 98.0~98.7%, 93.6~94.0%, 97.3~98.0%, 94.6~95.3%, 98.0~98.7%의 유사도를 보였다. 25개의 클론들 중 2개의 클론들 (No. 5, 22)은 *R. japonica*와 98.7%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.0%의 유사도를 보였다. 25개의 클론들 중 14개의 클론들 (No. 24, 35, 45, 61, 66, 77, 81, 111, 113, 115, 131)은 *R. japonica*와 99.0%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.3%의 유사도를 보였다. 25개의 클론들 중 9개의 클론들 (No. 14, 19, 85, 91, 97, 100, 142, 153,

177, 189)은 *R. japonica*와 99.3%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.7%의 유사도를 보였다. 그리고 26개의 클론 중 1개의 클론 (No. 226)은 *R. monacensis*와 99.7%의 높은 유사도를 보였다.

마지막으로 기존에 알려진 다양한 리케차 partial 17-kDa 유전자의 염기서열들과 17-kDa-PCR 산물 클론들의 염기서열을 비교하였다. 총 26개의 클론들 중 양성반응을 보인 25개의 클론들은 *R. africae*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. japonica*, *R. marmionii*, *R. monacensis*, *R. sibirica*의 염기서열과 각각 97.4~98.0%, 93.3~93.9%, 97.4~98.3%, 98.6~99.1%, 99.4~100%, 93.6~94.2%, 97.7~98.3%의 유사도를 보였다. 위의 *ompB*, *gltA* 유전자의 분석결과와 달리 클론들의 17-kDa 유전자의 염기서열의 경우 *R. japonica*와의 유사도 (98.6~99.1%)보다 *R. marmionii*와 높은 유사도 (99.4~100%)를 보였다. 25개의 클론들 중 2개의 클론들 (No. 1, 113)은 *R. marmionii*와 99.4%의 유사도를 보인 반면, *R. japonica*와 98.6%의 유사도를 보였으며, 23개의 클론들 (No. 5, 14, 19, 22, 24, 31, 35, 45, 61, 66, 77, 81, 85, 91, 97, 100, 111, 115, 131, 142, 153, 177, 189, 226)은 *R. marmionii*와 100%의 유사도를 보인 반면, *R. japonica*와 99.1%의 유사도를 보였다.

GenBank database에는 *R. marmionii*에서 분석된 *ompB* 유전자의 염기서열이 등록되어 있지 않았으며, 등록된 *R. japonica*와 *R. marmionii*의 *gltA* 유전자 염기서열을 비교한 결과 2개의 염기가 달랐으며 (유사도 99.3%), 17-kDa 유전자 염기서열을 비교한 결과 3개의 염기 차이를 보였다 (유사도 99.1%). 25개 클론의 *gltA*, 17-kDa 유전자 염기서열과 *R. marmionii*의 *gltA*, 17-kDa 유전자 염기서열의 유사도를 비교한 결과 *gltA*에서 *R. japonica*와 98.7~99.3%, *R. marmionii*와 98.0~98.7%의 유사도를 나타내었으며, 17-kDa에서는 *R. japonica*와 98.6~99.1%, *R. marmionii*와 99.4~100%의 유사도를 나타내었다.

본 연구에서는 제주도에서 채집된 진드기의 DNA를 사용하여 PCR 방법을 통해 제주도에 분포하는 진드기가 가지고 있는 리케차를 알아보았으며, 대부분의 진드기가 홍반열군에 감염되어 있음을 확인하였다. 현재 제주도 지역의 진드기에서 리케차 검출에 관한 내용이 보고된 바가 없으나, 열성질환자를 대상으로 indirect immunofluorescence assay (IFA)를 사용하여 혈청역학 조사를 한 결과 제주도 지역의 환자에서 *R. japonica*에 대한 항체를 보유한 환자가 있음이 확인되었다 (36). 이러한 결과로 볼 때,

제주도에 서식하는 *H. longicornis* 진드기가 병원체의 매개체 역할을 할 것으로 예상된다.

본 연구에서 검출한 홍반열군 리케차 핵산들을 분석한 결과 *ompB*, *gltA* 유전자 특성으로는 *R. japonica*에 가까우며, 17-kDa 유전자 특성으로는 *R. marmionii*에 가까운 것으로 나타났다. 이러한 것으로 미루어 보아 제주도에 분포하는 리케차가 새로운 종일 가능성을 배제할 수 없다. 본 연구에서 분석한 *ompB*, *gltA*, 17-kDa 유전자의 크기가 500 bp 미만의 길이였다. 따라서 제주도에 분포하는 홍반열군 리케차를 정확히 분류하기 위해서는 보다 신뢰성 있는 길이의 유전자를 분석하는 것이 필요하며, 이를 위해서는 균주를 분리하는 것이 반드시 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:2145-65.
- Anacker RL, Pickens EG, Lackman DB. Details of the ultrastructure of *Rickettsia prowazekii* grown in the chick yolk sac. J Bacteriol 1967;94:260-2.
- Pang H, Winkler HH. Analysis of the peptidoglycan of *Rickettsia prowazekii*. J Bacteriol 1994;176:923-6.
- Silverman DJ, Wisseman CL Jr. Comparative ultrastructural study on the cell envelopes of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, and *Rickettsia tsutsugamushi*. Infect Immun 1978; 21:1020-3.
- Drancourt M, Raoult D. Taxonomic position of the rickettsiae: current knowledge. FEMS Microbiol Rev 1994;13:13-24.
- Anderson BE, Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. J Bacteriol 1989; 171:5199-201.
- Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann N Y Acad Sci 2009;1166: 1-11.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the members of

- the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1449-55.
- 9) Sekeyová Z, Fournier PE, Reháček J, Raoult D. Characterization of a new spotted fever group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *J Med Entomol* 2000;37:707-13.
 - 10) Williams SG, Sacci JB Jr, Schriefer ME, Andersen EM, Fujioka KK, Sorvillo FJ, Barr AR, Azad AF. Typhus and typhus like rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 1992;30:1758-62.
 - 11) Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001; 32:897-928.
 - 12) Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 694-719.
 - 13) 김관천, 이진종, 김종선, 조영관. 위생곤충학. 펴주: 신광문화사, 2007.
 - 14) 이순형, 채종일, 홍성태. 임상기생충학 개요. 서울: 고려과학, 1996.
 - 15) 한국동물분류학회. 한국동물명집. 서울: 아카데미서적, 1997.
 - 16) Noh YT. A Taxonomical Study on Ticks in Korea. *한국생물상에 관한 연구. 과학기술처 R-72-82* 1972:140-60.
 - 17) Kim JE, Park HJ, Lee JY, Cho BK, Lee IY, Lee WK, Koh CJ. Three cases of tick bites by *Haemaphysalis longicornis*. *Korean J Dermatol* 2003;41:1198-201.
 - 18) Roh DK, Jang IG, Cho BK, Son SJ, Lee IY, Lee WK. Tick bite by *Haemaphysalis longicornis* Neumann: Laboratory observation of the causative tick. *Korean J Dermatol* 1999; 37:631-6.
 - 19) Yoon SY, Kim KH, Suhr KB, Cho BK, Nam IH, Lee WK, Lee JH, Park JK. A case of tick bite caused by *Haemaphysalis flava*. *Korean J Dermatol* 1996;34:326-30.
 - 20) Unsworth NB, Stenos J, Graves SR, Faa AG, Cox GE, Dyer JR, Boutlis CS, Lane AM, Shaw MD, Robson J, Nissen MD. Flinders Island spotted fever rickettsioses caused by "marmionii" strain of *Rickettsia honei*, Eastern Australia. *Emerg Infect Dis* 2007;13:566-73.
 - 21) Yamaguti N, Tipton VJ, Keegan H, Toshioka S. Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu islands. *Brigham Young University Science Bulletin* 1971;15:1-126.
 - 22) Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS, Choi MS, Kim IS, Jang WJ. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:759-63.
 - 23) Choi YJ, Jang WJ, Kim JH, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005;11:237-44.
 - 24) Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991; 173:1576-89.
 - 25) Leitner M, Yitzhaki S, Rzotkiewicz S, Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67: 166-9.
 - 26) Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. *In vitro* susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1537-41.
 - 27) Gaywee J, Sunyakumthorn P, Rodkvamtook W, Ruang-arerate T, Mason CJ, Sirisopana N. Human infection with *Rickettsia* sp. related to *R. japonica*, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:671-3.
 - 28) Mahara F, Koga K, Sawada S, Taniguchi T, Shigemi F, Suto T, Tsuboi Y, Ooya A, Koyama H, Uchiyama T, T. Uchida. The first report of the rickettsial infections of spotted fever group in Japan: three clinical cases. *Kansenshogaku Zasshi* 1985;59: 1165-71.
 - 29) Lee JH, Park HS, Jung KD, Jang WJ, Koh ES, 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* 2003;47:301-4.
 - 30) Chung MH, Lee SH, Kim MJ, Lee JH, Kim ES, Lee JS, Kim MK, Park MY, Kang JS. Japanese spotted fever, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1122-4.
 - 31) Weller SJ, Baldrige GD, Munderloh UG, Noda H, Simser J, Kurti TJ. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1305-17.
 - 32) Dib L, Bitam I, Bensouilah M, Parola P, Raoult D. First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. *Clin Microbiol Infect* 2009 May 27 [Epub ahead of print].

- 33) Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, García-Amil C, Rodríguez-Moreno I, Anda P. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1405-7.
- 34) Unsworth NB, Stenos J, Faa AG, Graves SR. Three rickettsioses, Darnley Island, Australia. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1105-7.
- 35) Graves S, Stenos J. Rickettsioses in Australia. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1166:151-5.
- 36) Jang WJ, Kim JH, Choi YJ, Jung KD, Kim YG, Lee SH, Choi MS, Kim IS, Walker DH, Park KH. First serologic evidence of human spotted fever group rickettsiosis in Korea. *J Clin Microbiol* 2004;42:2310-3.