



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](#)

2015년 8월
석사학위논문

진드기의 형태학적 동정과 분자생물학적 동정 (16S rDNA, 12S rDNA) 비교

조선대학교 대학원
의과학과

김 선 경

2015년 8월

석사학위논문

진드기의

형태학적 동정과

분자생물학적 동정

비교

김선경

진드기의 형태학적 동정과 분자생물학적 동정 (16S rDNA, 12S rDNA) 비교

Comparing Morphological identification and Molecular
identification(16S rDNA, 12S rDNA) in Ticks

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

의과학과

김선경

진드기의 형태학적 동정과 분자생물학적 동정 (16S rDNA, 12S rDNA) 비교

지도교수 김동민

이 논문을 이학 석사 학위 신청 논문으로 제출함

2015년 4월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

김 선 경

김선경의 석사학위논문을 인준함

위원장	광 주 광 역 시 보건환경연구원	질병조사과장	<u>정 책 근 (인)</u>
위 원	조 선 대 학 교	교 수	<u>김 동 민 (인)</u>
위 원	조 선 대 학 교	교 수	<u>김 춘 미 (인)</u>

2015년 5월

조 선 대 학 교 대 학 원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS.....	I
LIST OF TABLES.....	II
LIST OF FIGURES.....	III
ABSTRACT.....	IV
I . 서론.....	1
II . 재료 및 방법.....	4
1. 참진드기 채집.....	4
2. 사진촬영 및 세척과정.....	4
3. 참진드기 파쇄 및 DNA 추출.....	4
4. 16S rDNA 염기서열 분석을 위한 PCR.....	5
5. 12S rDNA 염기서열 분석을 위한 PCR.....	5
6. 전기영동 Gel에서의 DNA 추출.....	5
7. SFTS 병원체 검출을 위한 PCR.....	6
8. 리케치아 검출을 위한 PCR.....	6
III . 결과.....	8
1. 형태학적 분류 동정.....	8
2. 16S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정.....	9
3. 16S rDNA 염기서열 분석 및 상동성 분석.....	9
4. 12S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정.....	9
5. 12S rDNA 염기서열 분석 및 상동성 분석.....	10
6. 병원체 보유 실태.....	10
IV . 고찰.....	11
V . 요약 및 결론.....	14
VI .참고문헌.....	15

LIST OF TABLES

Table 1. Primers used in 16S rDNA.....	19
Table 2. Primers used in 12S rDNA.....	20
Table 3. Primer used in SFTS.....	21
Table 4. Primers used in Rickettsia-PanR8.....	22
Table 5. Homology of nucleotide 16S rDNA of Ticks.....	23
Table 6. Homology of nucleotide 16S rDNA of Ticks.....	26
Table 7. Strains of the Accession Numbers.....	27
Table 8. Result of Pan-Rickettsia 8 real time Q-PCR.....	28
Table 9. 16S rDNA identification result.....	29
Table 10. 16S rDNA identification result.....	32
Table 11. Ticks from USA.....	33
Table 12. 16S rDNA & 12S rDNA sequencing of destroyed Tick(2015-26 Tick)..	37

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA Sequence of Ticks.....	36
Fig. 2. Phylogenetic tree based on 12S rDNA Sequence of Ticks.....	37
Fig. 3. <i>Haemaphysalis longicornis</i> female.....	38
Fig. 4. <i>Haemaphysalis flava</i>	39
Fig. 5. <i>Ixodes nipponensis</i> female.....	40
Fig. 6. 16S rDNA PCR.....	41
Fig. 7. 12S rDNA PCR.....	42
Fig. 8. SFTS(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus) PCR.....	43
Fig. 9. <i>Ctenocephalides felis</i>	44
Fig. 10. Destroyed Tick (2015-26 Tick).....	45
Fig. 11. Phylogenetic tree based on 16S rDNA Sequence of 2015-26 Tick.....	47

ABSTRACT

Comparing Morphological identification and Molecular identification(16S rDNA, 12S rDNA) in Ticks

Kim Seon Gyeong

Advisor : Prof. Kim Dong Min

Department Biomedical Sciences

Graduate School of Chosun University

OBJECTIVE

Ticks are obligated blood sucking arthropods found in almost every region of the Asia and important vectors that transmit diseases to both the human being and animals.

This study was carried out to identify the tick species with morphological and molecular biological(16S rDNA, 12S rDNA) identification, comparing result of two methods. Also, I surveyed the exist of *Rickettsia spp.* and SFTS pathogens in the collected ticks.

METHOD

I examined ticks that collected by Flaggging and Dragging method in 5 regions of Gwangju suburb and captured rats. I gained 74 ticks. (30 of *H. longicornis*, 20 of *H. flava*, 24 of *I. nipponensis*) I classified ticks with development stage, morphological identification. The collected ticks were homogenized and DNA was extracted for Molecular biological identification.

The DNA sequences are compared with nucleotide sequences of ticks registered in the NCBI for sequence homology analysis and identification. Phylogenetic analysis of the isolates and some published sequences from 74

strains are carried out with Neighbor-Joining method by Clustal X program.

RESULT

The total sequencing success rate for 16S rDNA was 53.4%(39 out of 73 specimens). Each sequencing success rate for *H. flava* was 58.3%(14 out of 24 specimens), for *I. nipponensis* was 89.5%(17 out of 19 specimens), and for *H. longicornis* was 26.6%(8 out of 30 specimens). The total sequencing success rate for 12S rDNA was 96.7%(59 out of 61 specimens). Each sequencing success rate for *H. flava* was 95.6%(22 out of 23 specimens), for *I. nipponensis* was 94.1%(16 out of 17 specimens), and for *H. longicornis* was 100.0%(21 out of 21 specimens).

The rickettsial pathogens were detected with the rate 6.7%(5 out of 74 specimens), two of *I. nipponensis* and three of *H. longicornis*. However, the SFTS pathogens are not detected.

CONCLUSION

Two identification methods agreed perfectly. I didn't find *H. qinghaiensis* in this study. However, molecular biological identification is useful tool for the ticks that physically damaged, engorged with blood or in subadult stage.

I. 서론

참진드기는 의학적으로 위험한 바이러스(Virus), 리케치아(*Rickettsia*), 원충(*Protozoa*) 등의 질병을 사람과 동물에게 전파하는 질병매개체로 동아시아와 호주, 뉴질랜드까지 분포하고 있다(1, 23). 최근에 중국, 일본 및 우리나라에서도 중증열성혈소판감소증후군(SFTS)의 매개체가 작은소피참진드기(*H. longicornis*)인 것으로 밝혀지면서 참진드기 매개질병에 대한 관심이 높아지고 있다.

참진드기류는 분류학적으로 동물계(Kingdom Animalia), 절지동물문(Phylum Arthropoda), 거미강(Class Arachnida), 진드기목(Order Acari), 후기문아목(Suborder Ixodida), 참진드기과(Ixodidae)에 속한다(2). 한국동식물도감 제44권 동물편(진드기아강: 진드기상목)에 의하면, 진드기류는 Kramer(1877), Canestrini(1891), Baker and Wharton(1952) 등에 의하여 목 수준(ordinal rank)으로 간주되었고, Evans 등(1961)은 아강 수준(subclass rank)으로 조정하였으며 현재는 이 주장이 보편적으로 받아들여지기에 이르렀다고 한다. Evans(1992)는 Anaactinotrichida 상목(진드기 상목)과 Acinotrichida 상목(응애상목)으로 정리하였으며 진드기 상목에 Notostigmata, Holothyrida, Ixodida, Mesostigmatf 목을 포함시키고, 응애상목에 Prostigmata, Astigmata, Oribatida 목을 포함시켰다(3). Lindquist(1984)는 분기분석 방법을 통하여 진드기류를 Anactinotrichida에 Notostigmata, Holothyrida, Ixodida, Mesostigmata를 포함시켰고, Actinotrichida에는 Prostigmata, Astigmata, Oribatida를 포함하는 두 개의 통합군으로 결론지었다. Evans(1992)도 Kranz와 같이 2개의 상목(Anactinotrichida, Actinotrichida)과 7목을 설정하여 현재까지 사용하고 있다.(3)

진드기의 몸은 많은 부분이 퇴화되어 순환계, 다리의 근육, 신경계, 소화관 등이 단순화되었고 체절성도 잃었다. 그러나 구기를 비롯한 몇 가지 외부 형태는 독특하게 변형하여 다양한 환경에서 생활할 수 있다. 진드기의 몸은 입틀주름을 경계로 해서 턱부와 몸통으로 크게 나누며 진드기의 눈은 모두 단안이며 복안은 없는데, 참진드기는 대부분 눈을 가지고 있지 않다. 턱부는 가위모양으로 먹이를 붙잡는 역할을 하는 협각(chelicera)과 감각기관 역할을 하는 촉지(pedipalp)로 구성되어 있고 몸통(idiosoma)은 주요 부속지인 다리로 구성되어 있다. 참진드기의 몸통에는 경화된 배판은 방패모양이라하여 순판(scutum)이라고 표현하는 경화된 배판을 가지고 있는데, 대체로 암컷은 작거나 없고 수컷은 순판이 크다(3).

발달단계는 알(egg)-유충(larva)-약충 혹은 자충(nymph)-성체(adult) 단계로 이루어진다. 유충기는 3쌍의 다리를 가지고 약충기는 4쌍의 다리를 갖는 것이 특징이다. 약충은 다리 수가 성체와 동일하나, 성체와 다른 점은 몸이 작고 생식구가 갖추어지지 않았고 강모의 수가 적다는 점 등이다(3).

성장 단계에서 필수적으로 이루어지는 흡혈과정을 통해 참진드기 몸 안에 있는 병원체가 숙주로 옮겨가면서 질병을 유발하는데, 최근에 가장 문제가 되고 있는 *bunyaviridae* phlebovirus속 SFTS virus는 고열, 혈소판감소증, 위장관증상, 백혈구감소증 등의 증상을 보이는 중증열성혈소판감소증후군을 일으킨다. 이 질환은 최초 중국에서 나타난 감염성 질환으로 2007년 이후 중국의 Jiangsu, Henan, Hubei, Shandong, Anhui, Liaoning 6개 지방에서 보고되었으며 Yu 등에 의해 2011년 *Bunyaviridae*의 새로운 phlebovirus가 SFTS(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome)의 원인체로 보고되었다(4).

발열과 발진을 야기하는 리케치아는 세포 내 기생성 그람 음성 단간균으로 절지동물 내 기생하며 DNA, RNA를 모두 가지고 있으며 이분법으로 증식한다. 리케치아과는 참진드기, 이, 벼룩, 참진드기 유충, 포유동물에서 다양하게 발견된다(5).

국내에서는 문 등에 의해 제주도에서 참진드기의 분포조사 및 병원체 동정이 이루어졌고(6), 강 등에 의해 5개도(전남, 전북, 경북, 충북, 제주도)의 가축으로부터 참진드기를 채집해서 병원체를 보유 실태를 확인하기 위해서 분자생물학적 기법(PCR)을 이용한 보고가 있었다(7). 중국에서는 *H. longicornis*와 *H. qinghaiensis*와의 형태학적 구분의 어려움을 16S rDNA 염기서열 분석을 이용해서 규명한 바가 있었으며(8), Jihou Lv 등 참진드기 종 동정을 위해서 cytochrome oxidase I (COI), 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA 등을 이용해서 분자생물학적으로 동정한 보고가 있었다(9).

분자생물학적 동정이 필요한 경우는 참진드기가 흡혈을 하게 되면 몸체가 심하게 변형되어 흡혈 전 참진드기와 다른 모습을 보이는 경우가 있는데, 형태학적으로 분류가 쉽지 않을 경우 분자생물학적 동정방법이 유용하다. 또한 참진드기의 채집과정에서 몸체가 파손되어 형태학적으로 구분이 어려운 경우 채집한 참진드기의 몸체에서 DNA를 추출해서 분자생물학적 동정을 하게 되면, 정확한 종 동정이 가능하다.

중국에서 분자생물학적으로 동정된 *H. qinghaiensis*가 우리나라에서도 존재하는지와 형태학적 분류가 제대로 이루어지고 있는가를 알아보기 위해 광주지역에서

식하는 참진드기를 채집해서 형태학적 분류 동정결과와 16S rDNA 및 12S rDNA 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 동정 결과를 비교해 보았다. 이러한 염기서열 분석을 이용해서 훼손된 참진드기, 흡혈해서 몸체의 변형이 심한 참진드기, 미성숙 단계의 참진드기 등의 동정에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 채집된 참진드기에서 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 병원체과 열성질환을 일으키는 리케치아 병원체 보유 실태도 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 참진드기 채집

1) 플래깅(Flagging)과 드래깅(Dragging)을 이용한 채집

광주지역의 야산 다섯 곳을 선정하고 참진드기 채집용 용을 수풀 위로 움직이면 서 용에 달라붙는 참진드기를 채집하였다. 채집된 참진드기는 잡은 장소와 날짜 및 시간을 표기한 채집용기에 옮겨 담고 형태학적으로 분류 동정하였다.

2) 쥐덫을 이용한 채집

광주지역 야산 두 곳을 선정하고 쥐덫(Sherman's live trap)에 비스킷에 땅콩버터를 발라서 미끼로 사용하였다. 하절기에는 해 질 무렵에 설치해서 다음 날 아침에 쥐덫을 수거했지만, 동절기에는 잡힌 쥐의 동사 우려가 있어서 오후 4시경에 설치해서 밤 10시 경에 수거하였다. 포획한 쥐를 마취한 뒤 혈액과 필요한 장기를 적출하고 물이 고인 용기 위에 거꾸로 매달아 참진드기를 수집하였다. 채집한 참진드기는 형태학적으로 분류 동정하였다.

2. 사진촬영 및 세척과정

플래깅과 쥐덫을 이용해서 채집한 참진드기 중 성체(adult)만을 분류 동정하고 사진 촬영을 해서 16S rDNA 염기서열 분석 동정과 일치하지 않을 경우에 대비하였다. 사진 촬영은 참진드기 한 마리당 등판과 배판을 찍은 후에 3~8%의 Sodium hypochlorite와 0.01~0.05% sodium hydroxide가 포함된 표백제를 10%로 희석해서 참진드기를 1분에서 2분간 세척하고, 다시 70%의 에탄올로 2~5분간 세척하였다. 다시 최종적으로 멸균된 증류수로 3분간 세척하였다. 참진드기의 크기가 약 3mm 정도였으므로 멸균된 Plate(U well)에 참진드기를 하나씩 넣고, 세척액을 교환하는 방식으로 세척을 진행하였다.

3. 참진드기 파쇄 및 DNA 추출

세척한 참진드기는 수분 흡수용 종이 위에 올려서 수분을 제거하고 Buffer 600 μ L의 2.8mm stainless-steel bead가 들어있는 분쇄용 용기에 넣고 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. Buffer는 멸균된 PBS에 10% FBS와 5%의 Penicillin과 Streptomycin을 넣어 조성하였다. Hard Tissue Grinding 분쇄 용기에 넣고 FastPrep-24(MP-Biomedicals, Irvine, USA)를 이용해서 6,000rpm, 25초, 2회 반복

으로 참진드기를 분쇄하였다.

분쇄된 참진드기의 DNA는 G-spin Total DNA Extraction Kit(iNtRON BIOTECHNOLOGY, Sunnam-si, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. 참진드기 분쇄액을 CL buffer(lysis buffer) 200 μ L, Protein K solution 20 μ L, RNase 5 μ L를 각각 첨가하여 10초간 섞은 후 56 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치하여 배양한 후 BL binding buffer 200 μ L 첨가 후에 부드럽게 위아래의 용액이 섞이도록 흔들어주었다. 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양한 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 불순물이 섞이지 않도록 조심해서 상층액 400 μ L를 취해 새로운 용기에 옮겨서 95% 에탄올 200 μ L를 첨가 후 부드럽게 위아래의 용액이 섞이도록 흔들어 주었다. 위 혼합액을 Spin column에 옮긴 후 상온에서 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후, 새로운 collection tube를 장착해서 Spin column에 WA buffer 700 μ L을 첨가하여, 상온에서 13,000rpm으로 1분간 원심분리하였다. Buffer액을 완전히 제거하기 위해 새로운 Collection tube를 장착 한 후, 상온 13,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 새로운 Tube에 spin column을 장착 후 CE buffer(elution buffer) 50 μ L를 첨가한 후 상온에서 1분간 배양한 후 13,000rpm 1분간 원심분리하여 templated DNA를 추출하였다.

4. 16s rDNA 염기서열 분석을 위한 PCR

Premix는 AmpliTaq Gold 360 Master Mix(AB applied biosystems, Foster city, USA)를 사용하였다. 1.0 μ L 당 50 μ mol/L PCR primer, 0.25U of rTaq DNA polymerase(TaKaRa, Otsu Shiga, Japan), MgCl₂ 농도는 2mmol/L 되도록 조성하였다. template DNA 2 μ L, 10pmol forward primer 1 μ L와 10 pmol reverse primer 1 μ L, Master mix 10 μ L, GC enhancer 2 μ L, 증류수 4 μ L를 넣어서 총 용량이 20 μ L이 되도록해서 PCR을 실시하였다.

PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 5분 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 45초 55 $^{\circ}$ C 1분 72 $^{\circ}$ C 90초 40cycle, 72 $^{\circ}$ C 5분 1cycle을 실시하였다. 1.2% Agarous Gel에 전기영동을 실시하였다. Primer의 서열은 Table 1과 같다.

5. 12s rDNA 염기서열 분석을 위한 PCR

Premix는 AccuPower PCR PreMix(BioNeer, Daejeon, Korea)를 사용하였다. template DNA 2 μ L, 10pmol forward primer 1 μ L와 10 pmol reverse primer 1 μ L,

증류수 16 μ L를 넣어서 총 용량이 20 μ L이 되도록해서 PCR을 실시하였다.

PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 5분 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 15초 53 $^{\circ}$ C 45초 30cycle, 72 $^{\circ}$ C 5분 1cycle을 실시하였다. 1.2% Agarous Gel에 전기영동을 실시하였다. Primer의 서열은 Table 2과 같다.

6. 전기영동 Gel에서의 DNA추출

16S rDNA 증폭 생성물의 전기영동이 끝난 Agarose Gel에서 염기서열분석을 위한 DNA를 추출하기 위해서 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하였다. 16S rDNA PCR 생성물 크기는 453 bp, 12S rDNA PCR 생성물 크기 320bp를 UV Transilluminators(TFX-20-M, MARNE LA VALLEE, France)에서 해당 Band를 잘라내 무게를 재고 QG : Gel = 3 : 1로 해서 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하면서 녹였다. 과정 중간에 Vortexing을 해서 Gel이 잘 녹도록 한 후 Isopropanol : Gel = 1 : 1로 섞은 뒤 위아래 용액이 잘 섞이도록 한 뒤 Spin column에 옮긴후 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였고, 이 과정에서 원심분리 하고자하는 용량이 800 μ L이상 일 경우 2번에 걸쳐 원심분리를 실시하였다. QG 500 μ L를 넣고 실온에서 2분간 방치한 뒤 13,000rpm에서 1분간 원심분리 한 후, PE 750 μ L을 넣고 실온에서 5분간 방치한 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 다시 여과물은 버리고 13,000rpm에서 1분간 실온에서 원심분리 한 후 새로운 EP tube에 column을 넣고 50 μ L Buffer EB(10mM Tris-Cl, pH 8.5)를 넣고 실온에서 13,000rpm 1분간 원심분리 한 후 여과된 EB(10mM Tris-Cl, pH 8.5)를 다시 column에 넣고 실온에서 5분간 방치한 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다.

7. SFTS 병원체 검출을 위한 PCR

참진드기를 분쇄한 용액 200 μ L를 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit(iNtRON, Sungnam-si, Korea)을 이용해서 RNA를 추출한 후 DiaStarTM 2X Onestep RT-PCR Pre-Mix(Solgent, Deajeon, Korea)를 이용하여 2X Onestep RT-PCR Pre-Mix 15 μ L, Primer Forward (10pmol/ μ L) 1 μ L, Primer Reverse (10pmol/ μ L) 1 μ L, templated RNA 5 μ L, 증류수 8 μ L로 총 용량 30 μ L가 되도록 한 후 PCR 조건 50 $^{\circ}$ C 30분 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 15분 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 20초 58 $^{\circ}$ C 40초 72 $^{\circ}$ C 30초 35cycle, 72 $^{\circ}$ C 5분 1cycle을 실시하였다. 2.0% agarouse Gel에서 전기영동하여 증폭산물을 560 bp에서 확인하였다(Fig. 8). Primer 서열은 Talbe 3과 같다.

8. 리케치아 검출을 위한 Real-Time PCR

참진드기에서 추출한 DNA를 가지고 참진드기가 리케치아에 감염되었는지를 알아보기 위해서 리케치아를 검출하기 위한 Real-Time PCR을 실시하였다(22). LightCycler TaqMan Master(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 templated DNA 5 μ L, Forward primer 1 μ L, Reverse primer 1 μ L, Probe 1 μ L, Master mix 4 μ L, 증류수 8 μ L을 각각 넣어 총 용량 20 μ L가 되도록 하였다. PCR조건은 95 $^{\circ}$ C 10분 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 10 초 60 $^{\circ}$ C 30초 45cycle, 40 $^{\circ}$ C 30초 1cycle을 실시하였다. 리케치아-PanR8의 Primer 서열은 Table 4와 같다.

III. 결과

1. 형태학적 분류 동정

작은소피참진드기와 개피참진드기는 플래깅(Flagging) 또는 드래깅(Dragging)으로 채집되었고, 일본참진드기는 셔먼트랩(Sherman's live trap)에서 잡힌 야생 쥐로부터 채집되었다. 채집된 참진드기 중에서 성충만을 선별해서 형태학적으로 분류 동정하였다.

가장 많이 채집된 작은소피참진드기(*Haemaphysalis longicornis*) 암컷은 몸은 황갈색 내지 다갈색이고, 크기는 약 2.9× 1.8mm이었다. 눈은 없으며 화채는 있었고 배판은 적황색이며 원형에 가까웠다. 다공역은 크고 좌우의 간격이 넓고 이상체는 잘 발달하여 있었으며 촉지 제 2절이 턱 기절보다 돌출되어 있었고 촉지 제 3절 배면 중앙 부위에 큰 가시돌기가 후방으로 돌출되어 있었다. 구하체의 끝은 둥근 편이며 치열은 5/5이었다. 항문구는 항문후방에 Y자 모양을 이루었다. 31마리의 성충 중 수컷은 채집되지 않았으며 전부 암컷이었다(Figure 3).

개피참진드기(*Haemaphysalis flava*)는 눈이 없으며 화채는 있었다. 촉지의 제 2절이 턱기부보다 외측으로 돌출되어 있었다. 제 1각, 2각, 3각 기절의 내측돌기는 짧고 둔하고 거의 같은 크기이며 제 4기절의 내측돌기는 다른 기절의 돌기보다 약간 길었다. 배판 표면은 매끄러우며 매우 작은 구멍이 산재되어 있었고 경부구와 측석구가 있었다. 구하체의 끝은 둥근편이며 이의 형태가 꽃모양으로 배열되어 있고 치식은 4/4이었다. 생식판은 제 2, 3각 지절 사이와 평행하였다. 수컷의 크기는 약 3~4mm이었고 치열은 5/5이었다. 제 4각 기절의 내측돌기가 돌출하였으며 몸의 후연에 화채가 있었다. 생식판은 제 2각 기절과 평행하였다. 개피참진드기 24마리 중 수컷은 13마리, 암컷 11마리가 채집되었다(Figure 4).

일본참진드기(*Ixodes nipponensis*)는 눈과 화채가 없었으며 의두 측면에 이개(auriculae)가 발달되어 있었다. 제 1기절에 2개의 돌기가 있었으며 내측돌기가 더 길어 제 2기절의 전방 경계면까지 달아있었다. 구하체의 끝은 뾰족하고 치식은 4/4이었다. 항문구는 항문 전방을 돌아 복면후연에 달아있었다. 수컷은 촉지가 넓게 퍼졌으며 강모가 비교적 많고 다리의 기절에는 모두 내외측돌기가 있었으며 제 1각 기절의 내측돌기는 뾰족하고 뒤로 향해 있었다. 본 연구에서 채집된 일본참진드기 20마리 모두 암컷이었다(Figure 5).

야생쥐로부터 수많은 털진드기와 쥐이, 쥐벼룩으로 의심되는 생물들이 채집되었

는데 참진드기와 같이 염기서열 분석을 시도해보았는데, 쥐벼룩이라고 생각되는 생물은 *Ctenocephalis felis*로 동정되었다(Table 10, Figure 9). 쥐 이(Rat lice)와 털진드기(mite)로 의심되는 생물은 PCR 증폭이 되지 않았다(Table 9, Table 10).

2. 16S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정

16S rDNA 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 동정에서 개피참진드기는 14/24(58.3%), 일본참진드기 17/19(89.5%), 작은소피참진드기 8/30(26.7%)의 염기서열 분석 성공률을 보였다. 전체적인 염기서열 분석 성공률은 53.4% 이었다(Table 9, Figure 6).

3. 16S rDNA 염기서열 분석 및 상동성 분석

작은소피참진드기, 개피참진드기, 일본참진드기에서 추출한 16S rDNA를 증폭해서 염기서열을 확인하였다. NCBI의 Blast로 염기서열을 확인한 결과 PCR 생성물 73개의 검체 중 39개만이 염기서열 분석에 성공하였다. 개피참진드기는 24개의 PCR 생성물 중 14개가 염기서열 분석에 성공했고 염기서열 상동성을 비교했을 때 97.8~100.0%의 상동성을 보였다. 일본참진드기는 19개 PCR 생성물 중 17개가 서열 분석에 성공해서 염기서열 상동성을 비교했을 때 97.7~99.4%의 상동성을 보였다. 작은소피참진드기는 30개의 PCR 생성물 중 8개가 서열 분석에 성공해서 염기서열 상동성을 비교했을 때 98.9~99.4%의 Table 5와 같은 상동성을 보였다. 39마리의 참진드기 유전자를 증폭해서 얻은 염기서열을 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 제공하는 Accession number(Table 7)와 비교했을 때, 형태학적으로 분류 동정한 작은소피참진드기, 개피참진드기, 일본참진드기와 각각 일치하였다. 염기서열 분석 성공률은 일본참진드기가 89.5%로 가장 높았고, 염기서열 상동성은 개피참진드기가 높았다(Table 5).

염기서열 분석계통도를 작성했을 때 *H. flava*, *H. longicornis*, *I. nipponensis*에 각각 Cluster를 형성하고 있으며 이를 벗어나는 종은 없었다(Figure 1).

4. 12S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정

12S rDNA 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 동정에서 개피참진드기는 22/23(95.6%), 일본참진드기 16/17(94.1%), 작은소피참진드기 21/21(100.0%)의 증폭

성공률을 보였다. 전체적인 서열분석 성공률은 96.7% 이었다(Table 10, Figure 7).

5. 12S 염기서열 분석 및 상동성 분석

작은소피참진드기, 개피참진드기, 일본참진드기에서 추출한 12S rDNA를 증폭해서 염기서열을 확인하였다. NCBI의 Blast로 염기서열을 확인한 결과 PCR 생성물 61개의 검체 중 59개 검체가 염기서열 분석에 성공하였다. 개피참진드기는 23개의 PCR 생성물 중 22개가 서열분석에 성공했고 염기서열 상동성을 비교했을 때 98.2~100.0%의 상동성을 보였다. 일본참진드기는 17개 PCR 생성물 중 16개가 서열분석에 성공했지만, NCBI에 일본참진드기에 대한 12S rDNA 염기서열 정보가 없어서 상동성을 비교 할 수 없었다. 작은소피참진드기는 21개의 PCR 생성물 중 21개가 염기서열 분석에 성공해서 상동성을 비교했을 때 99.7%의 Table 6와 같은 상동성을 보였다. 59마리의 참진드기 유전자를 증폭해서 얻은 염기서열을 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 제공하는 Accession number(Table 5)와 비교했을 때, 형태학적으로 분류 동정한 개피참진드기, 작은소피참진드기와 각각 일치하였다. 염기서열 분석 성공률은 작은소피참진드기가 100.0%로 가장 높았고, 염기서열 상동성은 개피참진드기가 높았다(Table 6).

염기서열 분석계통도를 작성했을 때 *H. flava*, *H. longicornis*는 각각 Cluster를 형성하고 있으며 이를 벗어나는 종은 없었고, *I. nipponensis*는 NCBI에 12S rDNA Nucleotide에 대한 정보가 없었지만, 염기서열분석 결과 동정된 검체들이 같은 Cluster를 형성함을 보여준다(Figure 2). 미국에서 구입한 참진드기를 12S rDNA를 이용해서 염기서열 분석을 했을 때, 자충과 성충의 결과가 같았다(Table 11, Figure 2).

6. 병원체 보유 실태

74마리 참진드기 중 Pan-리케치아 보유율은 6.7%(5/74)였다. 일본참진드기 2마리, 작은소피참진드기 3마리에서 검출되었다(Table 8). 그리고 채집한 74마리 참진드기 중 SFTS를 일으키는 병원체는 검출되지 않았다(Figure 8).

IV. 고찰

우리나라 전역에 서식하는 참진드기에 대한 이해를 높여서 참진드기가 옮기는 질병을 예방하고자하는 바람과 중국에서 분자생물학적 방법(16S rDNA 염기서열 분석)으로 동정된 *H. qinghaiensis*가 우리나라에서도 존재하는지(8)와 *H. longicornis* 외 다른 종들은 형태학적으로 제대로 분류하고 있는가를 16S rDNA와 12S rDNA 염기서열 분석법을 통해서 확인하고자 하였다. 그리고, 16S rDNA와 12S rDNA 염기서열 분석법을 숙주로부터 분리과정에서 훼손된 참진드기나 흡혈이나 형태학적으로 동정이 불가능한 참진드기의 정확한 동정에 이용하고자 하였다.

2014년 4월부터 11월까지 광주지역 도심 인근 야산과 공원 등 5곳을 선정해서 플래깅(Flagging)과 드래깅(Dragging)으로 채집한 참진드기는 작은소피참진드기(*H. longicornis*)와 개피참진드기(*H. flava*)가 주로 채집되었고, 같은 해 10월과 11월에 쥐 덫(Sherman 's live trap)을 이용해서 야생 설치류로부터 채집한 참진드기는 일본참진드기(*I. nipponensis*)였다. 이는 김 등의 연구에서와 같이 *H. longicornis*는 주로 야산의 수풀에서 채집되는 경우가 많았고, *I. nipponensis*는 야생 설치류에 많았다는 보고와 일치하였다(16, 17).

채집된 참진드기 중 성충인 작은소피참진드기 30마리, 일본참진드기 20마리, 개피참진드기 24마리를 형태학적 동정방법과 분자생물학적 동정방법의 비교 연구에 사용하였다. 채집된 작은소피참진드기와 일본참진드기는 전부 암컷이었다. 강 등에 의하면 우리나라에서 참진드기 매개 병원체 분자생물학적 조사(2010~11)에서 국내 5개 지방에서 903마리의 참진드기를 채집했을 때도 90.6%가 암컷이었다는 보고가 있었다(7). 또 잡힌 참진드기에서 리케치아 병원체로 *E. canis* (22.3%), *A. platys* (20.0%), *E. chaffeensis* (19.4%), *E. ewingii* (19.3%), *Rickettsia* spp. (12.4%), *A. phagocytophilum* (5.5%), *E. muris* (0.5%)가 검출되었다는 보고가 있었지만(7), 이번 연구에서 채집한 참진드기의 리케치아 검출률은 5.6%로 낮았다. 강등의 연구에서 채집된 참진드기는 가축으로부터 채집된 것이고(7), 이번 연구의 재료로 사용된 참진드기는 야산의 수풀에서 채집된 참진드기이어서 리케치아 검출률이 낮지 않았나 생각된다. 채 등의 연구에서는 리케치아 병원체는 주로 *H. longicornis*, *H. flava* 와 *I. nipponensis*에서 검출되었지만(18), 이번 연구에서는 *H. flava* 두 마리와 *I. nipponensis* 세 마리에서 리케치아 병원체가 검출되었

다.

이번 연구에 사용한 16S rDNA와 12S rDNA는 rRNA를 만드는 유전자로 돌연변이가 잘 일어나지 않아 종 분류하는데 많이 사용되어지고 있다. 특히 16S rDNA 염기 서열 중에서 "hot spots"이라 불리는 부분은 모든 종에서 다르게 나타난다(27, 28, 29)는 점을 이용하였다. Zhangcheng Tian 등이 주장한 중국에 존재한다는 *H. longicornis*와 생김새가 같은 *H. qinghaiensis*는 16S rDNA 및 12S rDNA 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 동정에서 발견되지 않았다(7). Xue-Jie Yu 등에 의하면 중국에서 채집한 작은소피참진드기 186마리 중 10마리가 SFTS 병원체를 가지고 있었다는 보고가 있었고(4), Guoyu Niu 등에 의하면 중국내 가축에서의 SFTS 병원체의 양성률은 3.38% (103/3,039)였다고 보고하였으며, 초지에서 방목해서 기르는 양 69.5% (328/472), 소 60.5% (509/842)에서 특히 양성률이 높다는 보고가 있었지만(19), 이번 연구에서 채집된 참진드기에서는 SFTS 병원체는 검출되지 않았다. 하지만, Shuyi Liang 등이, 2011년 중국에서 Enzyme-linked immunosorbent assay 방법으로 Jiangsu 7개 지방에서 2,510개의 혈청을 가지고 혈청학적 유병률을 조사하였는데, 유병률은 0.44% (11/2,510)이었다고 한다. SFTS 바이러스에 대한 혈청학적 유병률이 연령이나 성별의 차이에 의해 증가하지는 않았지만, 목축업이나 농업에 종사하는 집단이 중증열성혈소판감소증후군 감염과 중요한 관련이 있다는 보고가 있었다(20). 신 등의 연구에 의하면 2013년 3월부터 2014년 4월까지 중증열성혈소판감소증후군 환자로 확진을 받은 환자 35명 중 26명의 거주 지역이 시골이고, 농업이나 임업에 종사하는 직업군이 25명으로 야외 작업 직업군에서 환자가 많이 발생한다는 역학적 특성과 1년 동안 확진자 35명 중 16명이 사망하여 사망률은 45.7%로 높게 나타났다고 보고하였다(21). 이는 참진드기의 산란된 알이 부화하면 유충은 식물이나 숙주 동지로 기어올라서 숙주를 기다렸다가 숙주를 만나 부착하면 흡혈하고 떨어졌다가 은신처에 숨어 탈피하고 약충이 되면 다시 새로운 숙주를 기다리고, 새 숙주를 만나면 부착하여 흡혈하고 분리 탈피하여 성체가 되는 3숙주 참진드기 생활사 중 흡혈습성과 밀접한 관련이 있음을 보여준다.

이번 연구에서는 성충만을 대상으로 연구가 진행되었지만, 성숙되지 않은 어린 유충과 자충을 포함했을 때 광주지역 인근 초지에 가장 흔하게 서식하는 참진드기는 작은소피참진드기(*H. longicornis*)였다. 노 등이 제주도과 강원도에서 채집한 참진드기 1,267마리 중 작은소피참진드기는 1,040마리로 다른 참진드기 종 보다 많은 개체수가 존재한다는 점은 일치하였다(24). 또한 이번 연구로 깊은 산 속이

아닌 도심 근처의 야산이나 공원 등에서 채집한 참진드기에서도 리케치아 병원체를 확인할 수 있었다. 이는 도심 근처 야산이나 공원에서의 야외활동 시 참진드기를 조심할 필요성이 있다고 말할 수 있다.

형태학적으로 동정한 참진드기와 16S rDNA 및 12S rDNA 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 동정결과는 일치하였다. 염기서열 분석 성공률이 참진드기의 종에 따라 차이가 있었다는 점은 염기서열 분석 성공률을 높일 수 있는 방법이나 보완할 방법을 생각할 필요가 있다고 생각된다. 또한, 참진드기에서 확인된 리케치아 존재를 세포배양을 통해서 리케치아의 종을 확인 동정할 필요가 있다고 생각된다. 그리고, 참진드기에 의해 매개되는 질병으로 알려진 라임병(Lyme borreliosis), Anaplasmosis, Ehrlichiosis, Bartonellosis, 홍반열(Tick-borne relapsing fever), 바베시아증(Babesiosis) 등의 질병을 유발하는 원인 병원체인 *Borrelia spp.*, *Bartonella spp.*, 기생성인 리케치아(*Rickettsia spp.*), *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, 바이러스인 진드기매개뇌염 바이러스(Tick-borne encephalitis virus), SFTS 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus), 원충인 *Babesia spp.* 등에 대한 실태조사가 필요하다고 생각된다.

형태학적으로 동정된 미국 참진드기 *Ixodes pacificus* adult와 *Ixodes pacificus* nymph의 염기서열 분석과 결과가 일치함을 볼 때, 약충이나 자충과 같이 미성숙 단계의 참진드기의 동정에 염기서열 분석법은 유용한 동정 수단이 될 수 있다. 또, 야생쥐에서 쥐 이(Rat lice), 쥐 벼룩(Rat flea), 털진드기(mite)로 추정되는 생물에 대해서 12S rDNA로 염기서열 분석에서 쥐 벼룩으로 추정되는 생물이 *Ctenocephalides felis*로 동정되었다(Table 10, Figure 9). 연구기간 중에 환자의 몸에서 흡혈 중인 참진드기를 분리하다가 심하게 훼손된 참진드기를 염기서열 분석법(16S rDNA와 12S rDNA)을 이용해서 *Ixodes nipponensis*로 동정한 예가 있었다(Table 12, Figure 10). 이는 연구자나 실험자가 동정이 힘든 생물이나 훼손된 생물에 대한 종 동정에 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다.

형태학적으로 동정된 참진드기와 16S rDNA 및 12S rDNA를 이용한 염기서열 분석법을 이용한 동정 결과가 일치하였고, 중국에서 발견된 *H. qinghaiensis*는 발견되지 않았지만 16S rDNA 및 12S rDNA 염기서열 분석법은 훼손된 진드기나 흡혈로 형태가 심하게 변형된 진드기 등 형태학적으로 동정이 불가능한 진드기에 대하여 유용한 동정방법이라 생각된다.

V. 요약 및 결론

배경

참진드기는 흡혈을 하는 절지동물로 우리나라 대부분 지역에서 발견되고 사람과 동물에게 질병을 옮기는 매개체로 중요하게 여겨진다. 이번 연구는 참진드기의 형태학적 분류 동정과 16S rDNA 및 12S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정을 비교했다. 또한 참진드기가 옮기는 병원체에 대해서도 조사했다.

방법

광주지역 5개 지역에서 플래깅(Flagging)과 드래깅(Dragging) 및 야생 쥐에서 참진드기를 채집한 후 실체현미경에서 사진 촬영을 하고 세척 후 분쇄해서 DNA를 추출하고 16s rDNA 및 12S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정을 수행했다. 전기영동 후 PCR 생성산물의 위치를 확인하고 Gel에서 DNA를 추출하는 과정을 거쳐서 DNA 서열을 분석하고, NCBI에 등재되어 있는 참진드기 종 서열과 상동성 및 계통도를 비교분석하였다. 또한 참진드기로부터 SFTS virus, 리케치아 병원체 감염유무 등을 같이 조사하였다.

결과

광주지역 야산에서 채집된 참진드기는 작은소피참진드기, 개피참진드기, 일본참진드기 3종이었고, 작은소피참진드기가 월등히 많이 서식하고 있었다. 참진드기의 형태학적 분류 동정과 16S rDNA 및 12S rDNA를 이용한 분자생물학적 동정은 100.0% 일치하였다. 74마리의 리케치아 보유 비율은 약 5.9% 이었고, SFTS 병원체를 가지고 있는 참진드기는 발견되지 않았다. 참진드기에 대한 형태학적 분류 동정결과와 16S rDNA 및 12S rDNA를 이용한 염기서열분석에 의한 동정 결과는 100.0% 일치하였다.

결론

분자생물학적 동정(16S rDNA 및 12S rDNA 염기서열분석법)은 채집과정에서 훼손된 참진드기나 흡혈을 해서 형태가 변한 참진드기와 미성숙단계의 참진드기 동정에 유용한 방법이다

VI. 참고문헌

1. Gai ZT, Zhang Y, Liang MF, et al. 2012. Clinical progress and risk factors for death in severe fever with thrombocytopenia syndrome patients. J infect Dis. 206(1):1095-102
2. Walker AR, Bouattour A, Camicas J-L, Estrada-Pena A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Bioscience Reports. Edinburgh. p.21
3. Illustrated Encyclopedia of FAUNA & FLORA OF KOREA VOL. 44 Acari : Anactinotrichida 한국동식물도감 제 44권 동물편(진드기아강: 진드기상목) 이원구 2009 교육과학기술부 p1, p6~7, p8~25, p26~30
4. Xue-Jie Yu, M.D., ph.D., Mi-Fang Liang, M.D., Shou-Yin Zhang, Ph.D., Yan Liu, M.D., Jian-Dong Li, Ph.D., Yu-Lan Sun, M.D., Lihong Zhang M.D. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China, 2011.
5. 질병관리본부, 국립보건원 감염병실험실진단 질환별시험법 2005, p533~547.
6. 문봉춘, 제주지역 참진드기(Acari: Ixodidae) 분포조사 및 Haemaphysalis 종에 대한 *Rickettsia* 병원체 동정과 계통발생학적 분석 2010. 2. 박사학위논문.
7. Seung Won Kang, Huong Thi thanh Doan, Se Eun Choe, Jin Hyeong Noh, Mi Sun Yoo, Kondred Eswar Reddy, Young Ha Kim, Chang Hee Kweon, Suk Chan Jung, Ki Yoon Chang
Molecular investigation of tick-borne pathogens in ticks from grazing cattle in Korea Parasitology International 62(2013) 276-282.
8. Zhancheng Tian, Guangyuan Liu, Junren Xie, Hong Yin, Jianxun Luo, Liyan Zhang, Ping Zhang, Jin Luo
Discrimination between *Haemaphysalis longicornis* and *H. qinghaiensis* based on the partial 16S rDNA and the second internal transcribed spacer(ITS-2) 2011

54:165-172.

9. Jizhou Lv, Shaoqiang Wu, Yongning Zhang, Yan Chen, Chunyan Feng, Xiangfen Yuan, Guangle Jia, Junhua Deng, Caixia Wang, Qin Wang, Lin Mei and Xiangmei Lin

Assessment of four DNA fragments(CO I, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida(Acari:Ixodida).

10. *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 작은소참진드기

Haemaphysalis longicornis Neumann, 1901 ; 노용태, 1972, 144, pl. 2, figs. 1-4 kang, YB. 1981, 1-47;;Kang, YB. DH. Chang, 1984, 213-226, figs. 1-18. 1981, 1-47.

11. Kang, Y. B. 1981. Ecological and Physiological properties fo the tick *Haemaphysalis longicornis* Neuman (Acarina: Ixodidae) with reference to coloration and water relations. Res. Rep. Off Rur. Dev. 23 : 1-47.

12. Kang, Y. B. D. H. Chang. 1984. Scanning electron microscopic observation on the surface structure of the tick, *Haemaphysalis longicornis* Neuman, 1901. Kor. J. Vet. Res. 24(2) : 213-226.

13. *Haemaphysalis flava* Neumann, 1897 개피참진드기

Haemaphysalis flava Neumann, 1897, 324-420; 노용태, 1972, 146, pl.4.; 이원구, 임재원, 이송영, 이인용, 1997. 2-4, figs. 1-2.

14. 이원구, 임재원, 이송영, 이인용. 1997. 너구리에 기생하는 개피참진드기 (*Haemaphysalis flava*)에 관한 제거술 및 너구리참진드기(*Ixodes tanuki*)의 국내 보고. 기생충지. 35(1) : 1-8.

15. *Ixodes nipponesis* Kitaoka and Saito, 1967 일본참진드기

Ixodes nipponesis Kitaoka S and Saito Y, 1967, 74-83, figs.1-19; 노용태, 조백기, 1983. 89-90.

16. Kim CM, Yi YH, Yu DH, Lee MJ, Cho MR, Desai SS, et al. Tick-borne

rickettsial pathogens in ticks from small mammals in Korea. Applied and Environmental Microbiology 2006;72:5766-76.

17. 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. The Korea Journal of Parasitology 2011;49:331-5.

18. Chae JS, Yu DH, Shringi S, Klein TA, Kim HC, Chong ST, et al. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. Journal of Veterinary Science 2008;9:285-93.

19. Guoyu Niu, Jiandong Li, Mifang Liang, Xiaolin Jiang, Mei Jiang, Haiying Yin, Zhidian Wang, Chuan Li, Quanfu Zhang, Cong Jin, Xianjun Wang, Shujun Ding, Zheng Xing, Shiwen Wang, Zhenqiang Bi, and Dexin Li
Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus among Domesticated Animals, China, 2013.

20. Shuyi Liang, Changjun Bao, Minghao Zhou, Jianli Hu, Fenyang Tang, Xiling Guo, Yongjun jiao, Wenshuai Zhang, Peilin Luo, Luxun Li, Kuanyuan Zhu, Wenwen Tan, Qimei Lu, Hengming Ge and Abao Chen
Seroprevalence and Risk Factors for Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Jiangsu Province, China, 2011.

21. 신재승, 박지혁, 권동혁 등 질병관리본부 감염병관리센터 역학조사과
국내 중증열성혈소판감소증후군의 발생현황과 역학적 특징(Epidemiologic and clinical characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome in the Republic of Korea).

22. Assessment of *Rickettsia* spp. and *R. rickettsii* real-time PCR assay performance on banked clinical samples; JCM Accepts, published online ahead of print on 7 November 2012. Cecilia Y.Kato, Ida H.Chung, Lauren K.Robinson, Amy L. Austin, Gregory A. Dasch, and Robert F. Massung. Microbiol. doi:10.1128/JCM.01723-12.

23. Nooru Yamaguti, Vernon J.Tipton, Hugh L. Keegan, Seiichi Toshioka ; TICKS OF JAPAN, KOREA, AND THE RYUKYU ISLANDS, Biological series_volume XV, number 1. August 1971

24. 노윤태, 김수연, 이승훈, 송봉구 질병관리본부 국립보건원 면역병리센터 인수 공통감염과, 질병매개곤충과 강원과 제주의 참진드기 매개질한 병원체의 분자생물학적 조사 (Molecular Detection for Tick-borne Pathogens in Hard Ticks collected in Gangwon and Jeju-do, 2014).

25. Kranz GW. A manual of acarology. Oregon State University Bookstores. Corvallis. Second Edition. p. 335 (1978).

26. Kranz GW. A manual of acarology(2nd edition). Oregon State University Bookstores. Corvallis. Second Edition. p. 509 (1978).

27. Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke, G. E. Fox : A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa, Syst. Appl. Microbial., 6:143-151. 1985.

28. Woese, C. R. : Bacterial evolution, Microbial. Rev., 51:221-271, 1987.

29. Plays, T., L. K. Nakamura, F. M. Cohan : Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data, Int. J. Syst. Bacteriol., 47:1145-1156, 1997.

Table 1. Primers used in 16S rDNA

primer pairs	sequence
16s+ 1-F	CTG CTC AAT GAA TAT TTA AAT TGC
16S-1-R	CGG TCT AAA CTC AGA TCA TGT AGG

16S PCR reaction solutions were as follows

Composition	Volume(μ L)
AmpliTaq gold 360 master mix	10
DW	4
GC enhancer	2
Primer F (10p mol/ μ L)	1
Primer R (10p mol/ μ L)	1
Template DNA	2
Final volume(μ L)	20

16S PCR conditions were as follows

Temp($^{\circ}$ C)	Time	Cycle
95	5 min	1
95	45 sec	40
55	60 sec	
72	90 sec	
72	5 min	1

Table 2. Primers used in 12S rDNA

primer pairs	sequence
T1B-F	AAA CTA GGA TTA GAT ACC CT
T2A-R	AAT GAG AGC GAC GGG CGA TGT

12S PCR reaction solutions were as follows

Composition	Volume(μ L)
BioNeer premix	-
DW	16
Primer F (10pmol/ μ L)	1
Primer R (10pmol/ μ L)	1
Template DNA	2
Final volume(μ L)	20

12S PCR conditions were as follows

Temp($^{\circ}$ C)	Time	Cycle
95	5 min	1
95	15 sec	30
53	45 sec	
72	5 min	1

Table 3. Primers used in SFTS

primer pairs	sequence
Primer-F	GAT GAG ATG GTC CAT GCT GAT TCT AA
Primer-R	CTC ATG GGG TGG AAT GTC CTC AC

SFTS PCR reaction solutions were as follows

Composition	Volume(μ L)
2X Onestep RT-PCR Pre-Mix	15
Primer F (10p mol/ μ L)	2
Primer R (10p mol/ μ L)	2
Template RNA	5
DW	8
Final volume(μ L)	30

SFTS PCR conditions were as follows

Temp($^{\circ}$ C)	Time	Cycle
50	30 min	1
95	15 min	1
95	20 sec	35
58	40 sec	
72	30 sec	
72	5 min	1

Table 4. Primers used in Rickettsia-PanR8

primer	sequence
PanR8F	AGC TTG CTT TTG GAT CAT TTG G
PanR8R	TTC CTT GCC TTT TCA TAC ATC TAG T
PanR8P	FAM-CCT GCT TCT ATT TGT CTT GCA GTA ACA CGC CA-BHQ1

Rickettsia PanR8 Real Time PCR reaction solutions were as follows

Composition	Volume(μ L)
LightCycler TaqMan Master mix	4
DW	8
PanR8F	1
PanR8R	1
PanR8P	1
Template DNA	5
Final volume(μ L)	20

Rickettsia-PanR8 Real Time PCR conditions were as follows

Temp($^{\circ}$ C)	Time	Cycle
95	10 min	1
95	10 sec	45
60	30 sec	
40	30 sec	1

Table 5. Homology of nucleotide 16S rDNA of Ticks

Number of Ticks	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	23	24
Accession species	<i>H. flava</i>												
<i>Ixodes nipponensis</i>	77.4	77.8	77.4	77.6	77.3	78.1	75.7	77.8	77.1	77.6	77.2	77.6	77.1
<i>Haemaphysalis flava</i>	100.0	99.7	99.4	98.9	98.6	100.0	97.8	99.4	99.2	98.9	98.3	99.1	99.2
<i>Haemaphysalis campanulata</i>	85.9	85.5	86.2	86.1	85.8	86.0	84.0	86.4	85.9	86.1	83.8	86.6	85.9
<i>Haemaphysalis concinna</i>	90.1	90.1	90.7	90.3	90.1	90.6	88.1	91.2	89.8	90.4	88.8	91.5	90.4
<i>Haemaphysalis cornigera</i>	85.6	85.2	85.9	85.8	85.6	85.8	83.7	86.4	85.9	85.8	84.2	86.1	85.9
<i>Haemaphysalis japonica</i>	91.0	91.2	91.2	90.9	90.7	91.5	89.0	92.0	91.0	90.9	89.4	92.3	91.2
<i>Ixodes granulatus</i>	78.5	78.7	78.5	78.7	78.5	78.6	76.8	78.7	78.8	78.8	78.5	78.4	78.2
<i>Ixodes monospinosus</i>	76.8	77.0	76.3	75.9	75.6	76.9	75.1	76.1	76.0	75.9	75.2	75.9	76.0
<i>Ixodes ovatus</i>	76.0	76.1	76.6	76.1	75.9	76.1	74.3	76.7	75.7	76.2	75.6	76.4	76.3
<i>Ixodes signatus</i>	78.0	78.1	78.5	78.4	78.2	78.1	76.2	78.1	77.7	78.5	77.9	77.8	77.7
<i>Ixodes tanuki</i>	77.7	77.6	77.7	77.8	77.6	78.1	76.0	78.4	77.7	77.9	77.9	78.1	78.0
<i>Ixodes turdus</i>	79.7	79.5	79.9	79.3	79.0	79.5	77.9	79.5	79.4	79.3	78.9	79.3	79.4
<i>Dermacentor andersoni</i>	82.8	82.7	82.8	83.2	83.0	82.6	80.9	83.2	83.3	83.3	82.5	83.5	83.3
<i>Dermacentor hunteri</i>	81.6	81.5	82.2	83.0	82.7	81.8	79.8	82.4	82.2	83.0	82.2	82.7	82.2
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	88.1	88.1	88.4	88.1	87.8	88.6	86.2	88.9	87.9	88.1	86.1	89.2	88.4
<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	79.4	79.5	79.4	79.8	79.9	79.5	77.6	80.1	79.4	79.9	78.5	79.8	79.9
<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	91.2	90.9	91.5	91.8	91.5	91.7	89.2	92.3	91.5	91.8	90.8	92.6	91.5
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	85.3	84.9	85.9	85.5	85.3	85.5	83.4	86.1	85.6	85.6	83.5	85.8	85.6
<i>Ixodes angustus</i>	77.1	77.3	77.7	77.0	76.8	77.2	75.4	77.8	76.8	77.1	76.9	77.6	77.4
<i>Ixodes persulcatus</i>	75.7	76.1	75.1	75.3	75.1	76.1	74.0	76.1	74.9	75.4	74.9	76.4	75.4
<i>Ixodes vespertilionis</i>	77.4	77.6	78.0	77.6	77.3	77.5	75.7	77.6	77.1	77.6	77.2	77.3	77.1
<i>Dermacentor variabilis</i>	81.4	81.2	81.4	81.8	81.6	81.5	79.6	82.1	81.9	81.9	81.2	81.8	81.9
<i>Haemaphysalis cretica</i>	84.5	84.7	84.7	84.7	84.4	84.3	82.6	84.7	84.7	84.7	82.8	84.4	84.7
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	87.6	87.5	87.6	88.6	88.4	88.0	85.6	88.6	88.1	88.7	86.8	88.4	88.1
<i>Amblyomma variegatum</i>	83.1	82.7	83.3	83.8	83.6	83.2	81.2	83.8	83.1	83.9	83.5	84.1	83.6
<i>Amblyomma ebraeum</i>	81.1	80.7	81.1	81.8	81.6	81.5	79.3	81.8	81.1	81.9	80.2	82.1	81.4
<i>Amblyomma maculatum</i>	83.9	83.5	83.9	84.4	84.1	84.3	82.0	84.7	83.9	84.4	82.8	84.4	84.2
<i>Ixodes hexagonus</i>	76.8	76.7	77.4	77.0	76.8	77.2	75.1	77.8	76.6	77.1	76.9	77.6	77.1
<i>Amblyomma tuberculatum</i>	82.5	82.1	82.2	83.0	82.7	82.9	80.7	83.0	82.5	83.0	82.8	83.0	82.5
<i>Haemaphysalis inermis</i>	87.3	86.9	87.3	87.2	87.0	87.5	85.4	88.1	87.6	87.3	86.1	88.4	87.6
<i>Haemaphysalis punctata</i>	88.4	88.1	88.4	88.4	88.1	88.9	86.5	89.5	88.4	88.4	87.1	89.2	89.0

Number of Ticks	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48
Accession species	<i>I. nipponensis</i>																
<i>Ixodes nipponensis</i>	98.6	98.0	99.1	98.9	98.9	98.5	99.1	99.1	97.7	98.6	98.9	98.6	99.1	98.6	99.4	99.1	98.3
<i>Haemaphysalis flava</i>	77.1	77.0	78.1	78.3	77.7	77.9	77.7	77.8	76.8	78.3	78.3	77.4	77.8	77.3	77.0	77.7	78.1
<i>Haemaphysalis campanulata</i>	74.2	74.7	75.1	75.1	75.4	75.5	75.1	74.9	73.7	75.2	75.1	75.1	74.9	74.5	74.4	75.1	75.2
<i>Haemaphysalis concinna</i>	75.7	75.6	76.6	76.6	76.3	76.1	76.3	76.4	75.1	76.6	76.6	76.0	76.4	75.9	75.6	76.3	76.4
<i>Haemaphysalis cornigera</i>	76.2	76.1	76.9	76.9	77.1	76.7	76.9	76.6	76.0	76.9	76.9	76.9	76.6	76.5	76.4	76.9	77.2
<i>Haemaphysalis japonica</i>	75.7	75.6	77.2	77.4	77.1	77.3	77.1	77.2	75.7	77.5	77.4	76.9	77.2	75.9	76.4	77.1	77.2
<i>Ixodes granulatus</i>	89.6	89.5	90.4	90.6	91.1	91.2	90.9	90.9	89.3	90.3	90.6	90.9	90.9	89.8	89.5	90.9	90.3
<i>Ixodes monospinosus</i>	88.7	89.2	89.2	89.1	89.7	89.1	89.4	89.5	88.4	89.2	89.1	89.4	89.5	89.0	88.4	89.4	88.6
<i>Ixodes ovatus</i>	81.7	81.8	81.9	82.0	82.3	82.3	82.3	82.3	81.6	82.1	82.0	82.0	82.3	82.2	81.8	82.3	82.3
<i>Ixodes signatus</i>	84.3	84.1	85.7	85.7	85.7	85.8	85.4	85.5	84.2	85.8	85.7	85.4	85.5	84.7	84.9	85.4	85.8
<i>Ixodes tanuki</i>	87.8	88.4	88.6	88.6	89.1	88.2	88.9	88.9	87.6	88.3	88.6	88.9	88.9	88.1	87.8	88.9	87.7
<i>Ixodes turdus</i>	83.8	84.1	85.1	85.1	85.4	85.8	85.1	85.2	83.3	85.2	85.1	85.1	85.2	84.1	84.1	85.1	84.9
<i>Dermacentor andersoni</i>	72.2	72.7	73.4	73.7	73.1	73.5	73.1	73.2	72.0	73.8	73.7	72.9	73.2	72.5	72.4	73.1	73.8
<i>Dermacentor hunteri</i>	70.4	71.6	71.6	72.0	71.7	72.0	71.7	71.5	70.3	72.1	72.0	71.4	71.5	70.8	70.7	71.7	72.1
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	75.1	75.0	75.7	76.0	75.4	75.8	75.4	75.5	75.1	76.1	76.0	75.1	75.5	75.4	75.3	75.4	76.1
<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	71.6	73.0	72.8	73.4	72.9	73.5	72.9	72.9	71.8	73.5	73.4	72.6	72.9	72.2	72.7	72.9	73.2
<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	75.1	75.0	76.6	76.9	76.6	76.7	76.6	76.6	75.1	76.9	76.9	76.3	76.6	75.4	75.3	76.6	76.6
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	74.2	74.7	75.4	75.4	75.7	75.2	75.4	75.2	74.0	75.5	75.4	75.4	75.2	74.5	74.7	75.4	75.5
<i>Ixodes angustus</i>	84.3	84.4	85.4	85.7	85.7	85.8	85.4	85.5	84.5	85.8	85.7	85.4	85.5	84.7	84.1	85.4	85.8
<i>Ixodes persulcatus</i>	89.3	90.1	90.1	90.0	91.1	90.6	90.9	90.6	89.0	90.0	90.0	90.9	90.6	89.5	89.5	90.9	90.0
<i>Ixodes vespertilionis</i>	83.8	84.9	84.8	85.1	84.9	85.5	84.6	84.6	83.9	85.2	85.1	84.6	84.6	84.1	83.8	84.6	85.2
<i>Dermacentor variabilis</i>	69.9	70.5	71.1	71.4	71.1	71.4	71.1	70.9	69.8	71.2	71.4	70.9	70.9	70.3	70.2	71.1	71.2
<i>Haemaphysalis cretica</i>	73.3	74.4	74.3	74.6	74.9	74.9	74.6	74.4	73.2	74.6	74.6	74.6	74.4	73.9	73.6	74.6	74.6
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	75.7	75.6	76.9	77.1	77.1	78.2	77.1	76.9	75.4	77.2	77.1	76.9	76.9	75.9	75.9	77.1	76.9
<i>Amblyomma variegatum</i>	74.2	74.4	74.6	75.1	74.9	74.9	74.9	74.6	74.3	74.9	75.1	74.6	74.6	74.8	74.7	74.9	75.5
<i>Amblyomma ebraeum</i>	72.5	73.3	73.4	74.0	73.4	73.5	73.4	73.5	72.6	73.8	74.0	73.1	73.5	73.1	73.0	73.4	74.4
<i>Amblyomma maculatum</i>	74.5	75.3	75.1	75.7	75.1	75.2	75.1	75.2	74.9	75.5	75.7	74.9	75.2	75.1	75.0	75.1	76.1
<i>Ixodes hexagonus</i>	83.8	83.8	85.4	85.7	85.4	85.5	85.1	85.2	83.9	85.8	85.7	85.1	85.2	84.1	84.1	85.1	85.8
<i>Amblyomma tuberculatum</i>	76.2	76.7	77.2	77.7	77.1	77.3	77.1	77.2	76.3	77.5	77.7	76.9	77.2	76.8	76.7	77.1	77.5
<i>Haemaphysalis inermis</i>	76.8	76.7	77.2	77.4	77.1	77.3	77.1	77.2	76.6	77.2	77.4	76.9	77.2	77.1	76.4	77.1	77.2
<i>Haemaphysalis punctata</i>	77.4	77.3	78.4	78.6	78.0	78.2	78.0	78.1	77.1	78.3	78.6	77.7	78.1	77.6	77.3	78.0	78.6

Number of Ticks	60	62	64	65	68	69	70	71
Accession species	<i>H. longicornis</i>							
<i>Ixodes nipponensis</i>	75.5	74.9	75.5	75.5	75.2	75.4	75.2	75.1
<i>Haemaphysalis flava</i>	85.6	85.1	85.6	85.6	85.6	85.6	85.4	85.3
<i>Haemaphysalis campanulata</i>	88.2	87.6	88.2	88.2	87.9	88.1	87.9	87.9
<i>Haemaphysalis concinna</i>	83.4	82.8	83.4	83.4	83.1	83.3	83.1	83.1
<i>Haemaphysalis cornigera</i>	91.0	90.4	91.0	91.0	90.7	91.0	90.7	90.7
<i>Haemaphysalis japonica</i>	83.7	83.1	83.7	83.7	83.4	83.6	83.4	83.3
<i>Ixodes granulatus</i>	77.5	76.9	77.5	77.5	77.2	77.4	77.2	77.1
<i>Ixodes monospinosus</i>	76.3	75.8	76.3	76.3	76.1	76.3	76.1	76.3
<i>Ixodes ovatus</i>	75.8	75.2	75.8	75.8	75.5	75.7	75.5	75.4
<i>Ixodes signatus</i>	77.7	77.2	77.7	77.7	77.5	77.7	77.5	77.7
<i>Ixodes tanuki</i>	76.3	75.8	76.3	76.3	76.1	76.3	76.1	76.3
<i>Ixodes turdus</i>	79.2	78.6	79.2	79.2	78.9	79.1	78.9	79.1
<i>Dermacentor andersoni</i>	81.7	81.1	81.7	81.7	81.4	81.6	81.4	81.4
<i>Dermacentor hunteri</i>	81.1	80.6	81.1	81.1	80.8	81.1	80.8	80.8
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	82.8	82.3	82.8	82.8	82.5	82.8	82.5	82.5
<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	79.2	78.6	79.2	79.2	78.9	79.1	78.9	79.1
<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	83.7	83.1	83.7	83.7	83.7	83.6	83.4	83.3
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	99.4	98.9	99.4	99.4	99.2	99.4	99.2	99.2
<i>Ixodes angustus</i>	76.9	76.3	76.9	76.9	76.6	76.8	76.6	76.8
<i>Ixodes persulcatus</i>	75.8	75.2	75.8	75.8	75.5	75.7	76.1	75.7
<i>Ixodes vespertilionis</i>	77.2	76.6	77.2	77.2	76.9	77.1	76.9	76.8
<i>Dermacentor variabilis</i>	80.0	79.4	80.0	80.0	79.7	79.9	79.7	79.7
<i>Haemaphysalis cretica</i>	88.2	87.6	88.2	88.2	87.9	88.1	87.9	87.9
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	82.8	82.3	82.8	82.8	82.5	82.8	82.5	82.5
<i>Amblyomma variegatum</i>	82.3	81.7	82.3	82.3	82.0	82.2	82.0	81.9
<i>Amblyomma ebraeum</i>	83.7	83.1	83.7	83.7	83.4	83.6	83.4	83.3
<i>Amblyomma maculatum</i>	83.9	83.4	83.9	83.9	83.9	83.9	83.7	83.6
<i>Ixodes hexagonus</i>	76.1	75.5	76.1	76.1	75.8	76.0	75.8	76.0
<i>Amblyomma tuberculatum</i>	80.8	80.3	80.8	80.8	80.6	80.8	80.6	80.5
<i>Haemaphysalis inermis</i>	84.8	84.2	84.8	84.8	84.5	84.7	84.5	84.5
<i>Haemaphysalis punctata</i>	84.5	83.9	84.5	84.5	84.5	84.5	84.2	84.2

Table 6. Homology of nucleotide 12S rDNA of Ticks

Number of Ticks	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Accession species	<i>H.flava</i>																						
<i>H. flava</i>	100	99.7	100	100	100	100	99.7	100	100	100	100	99.0	98.2	98.8	100	100	100	100	100	100	99.0	100	100
<i>I. granulatus</i>	73.9	74.0	73.7	74.0	73.7	73.8	73.8	73.7	73.7	73.8	77.9	73.0	74.3	74.7	73.7	73.7	73.8	73.8	74.0	73.7	74.0	73.0	75.1
<i>I. ovatus</i>	72.9	73.0	72.7	73.0	72.7	72.8	72.8	72.7	72.7	72.8	77.0	72.0	73.2	73.5	72.7	72.7	72.8	72.8	73.0	72.7	73.0	73.0	74.0
<i>D. andersoni</i>	77.2	77.3	77.3	77.0	77.3	77.4	77.0	77.3	77.3	77.4	79.7	76.0	76.1	77.8	77.6	77.3	77.4	77.4	78.0	77.3	77.0	77.0	79.2
<i>R. sanguineus</i>	78.5	78.9	78.6	79.0	78.6	78.7	78.4	78.6	78.6	78.7	81.6	78.0	79.0	80.5	78.6	78.6	78.7	78.7	79.0	78.6	79.0	78.0	81.1
<i>H. longicornis</i>	89.1	89.5	89.1	89.0	89.1	89.2	88.9	89.1	89.1	89.2	93.1	88.0	88.4	89.1	89.1	89.1	89.2	89.2	89.0	89.1	89.0	89.0	90.2
<i>I. persulcatus</i>	74.3	74.7	74.3	74.0	74.3	74.4	74.4	74.3	74.3	74.4	77.4	74.0	75.0	75.1	74.7	74.3	74.4	74.4	74.0	74.3	75.0	74.0	75.8
<i>I. vespertilionis</i>	71.3	71.7	71.4	72.0	71.4	71.5	71.5	71.4	71.4	71.5	74.7	71.0	71.0	71.6	71.4	71.4	71.5	71.5	71.0	71.4	71.0	71.0	72.5
<i>D. variabilis</i>	80.2	79.9	79.9	80.0	79.9	80.0	79.7	79.9	79.9	80.0	83.4	79.0	79.7	81.3	79.9	79.9	80.0	80.0	80.0	79.9	80.0	80.0	81.9
<i>H. cretica</i>	87.1	87.2	87.2	87.0	87.2	87.2	86.9	87.2	87.2	87.2	92.2	87.0	87.7	88.3	87.2	87.2	87.2	87.2	87.0	87.2	88.0	87.0	89.1
<i>H. leporispalustris</i>	89.1	88.8	89.1	89.0	89.1	89.2	88.9	89.1	89.1	89.2	93.1	88.0	89.9	91.1	89.1	89.1	89.2	89.2	89.0	89.1	90.0	89.0	92.1
<i>A. variegatum</i>	80.9	80.9	80.9	81.0	80.9	81.0	80.7	80.9	80.9	81.0	85.7	81.0	81.2	82.9	80.9	80.9	81.0	81.0	81.0	80.9	82.0	81.0	83.4
<i>A. ebraeum</i>	81.5	81.6	81.6	82.0	81.6	81.6	81.3	81.6	81.6	81.6	84.3	81.0	81.2	82.5	81.6	81.6	81.6	81.6	82.0	81.6	82.0	81.0	83.8
<i>A. maculatum</i>	82.8	82.9	82.9	83.0	82.9	83	82.6	82.9	82.9	83.0	86.2	82.0	83.0	83.7	83.2	82.9	83.0	83.0	83.0	82.9	84.0	83.0	85.3
<i>I. hexagonus</i>	72.3	72.4	72.0	72.0	72.0	72.1	72.1	72.0	72.0	72.1	75.6	72.0	72.5	72.4	72.4	72.0	72.1	72.1	73.0	72.0	72.0	72.0	72.8
<i>A. tuberculatum</i>	80.2	80.6	80.3	80.0	80.3	80.3	80.0	80.3	80.3	80.3	84.8	80.0	80.4	81.3	80.3	80.3	80.3	80.3	80.0	80.3	81.0	80.0	82.3
<i>H. inermis</i>	79.9	79.9	79.9	80.0	79.9	80.0	79.7	79.9	79.9	80.0	82.0	79.0	79.3	80.2	79.9	79.9	80	80	80.0	79.9	80.0	80.0	81.9
<i>H. punctata</i>	88.4	88.8	88.5	89.0	88.5	88.5	88.2	88.5	88.5	88.5	93.5	88.0	89.1	89.9	88.8	88.5	88.5	88.5	89.0	88.5	90.0	88.0	90.6

Number of Ticks	60	63	64	65	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	83	84	85	86
Accession species	<i>H. longicornis</i>																		
<i>H. flava</i>	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	89.2	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9
<i>I. granulatus</i>	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5
<i>I. ovatus</i>	76.9	76.9	76.9	76.9	76.9	77.1	76.9	76.9	76.9	76.9	76.8	76.8	76.9	76.9	76.9	76.9	76.9	76.9	76.8
<i>D. andersoni</i>	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.5	76.2	76.2	76.2	76.2	76.5	76.5	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.2	76.1
<i>R. sanguineus</i>	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.7	79.2	79.2	79.2	79.2	79.4	79.4	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.1
<i>H. longicornis</i>	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7
<i>I. persulcatus</i>	75.6	75.6	75.6	75.6	75.6	75.5	75.6	75.6	75.6	75.6	75.5	75.5	75.6	75.6	75.6	75.6	75.6	75.6	75.5
<i>I. vespertilionis</i>	74.3	74.3	74.3	74.3	74.3	74.5	74.3	74.3	74.3	74.3	74.2	74.2	74.3	74.3	74.3	74.3	74.3	74.3	74.2
<i>D. variabilis</i>	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.4	80.1	80.1	80.1	80.1	80.4	80.4	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1
<i>H. cretica</i>	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.5	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2
<i>H. leporispalustris</i>	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.6	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3	87.3
<i>A. variegatum</i>	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	82	81.8	81.8	81.8	81.8	82.0	82.0	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.7
<i>A. ebraeum</i>	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	84	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7
<i>A. maculatum</i>	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.3	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0
<i>I. hexagonus</i>	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.5	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2
<i>A. tuberculatum</i>	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	83	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7	82.7
<i>H. inermis</i>	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.7	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4	81.4
<i>H. punctata</i>	90.6	90.6	90.6	90.6	90.6	90.8	90.6	90.6	90.6	90.6	90.5	90.5	90.6	90.6	90.6	90.6	90.6	90.6	90.5

Table 7. Strains of the Accession Numbers

Tick strains	Accession number (16S)	Accession number (12S)
<i>Ixodes nipponensis</i>	AB006024	-
<i>Haemaphysalis flava</i>	AB075954	JQ625665, JQ625662
<i>Haemaphysalis campanulata</i>	AB819170	-
<i>Haemaphysalis concinna</i>	AB819172	-
<i>Haemaphysalis cornigera</i>	AB819174	-
<i>Haemaphysalis japonica</i>	AB819176	-
<i>Ixodes granulatus</i>	AB819237	JQ625668
<i>Ixodes monospinosus</i>	AB819238	-
<i>Ixodes ovatus</i>	AB819244	U95899
<i>Ixodes signatus</i>	AB819255	-
<i>Ixodes tanuki</i>	AB819257	-
<i>Ixodes turdus</i>	AB819265	-
<i>Dermacentor andersoni</i>	AY375432	U95868, AF150040
<i>Dermacentor hunteri</i>	AY375434	-
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	AY762323	-
<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	AY972533	-
<i>Rhipicephalus saguineus</i>	-	U95915
<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i>	FJ712720	-
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	FJ712721	KF583639
<i>Ixodes angustus</i>	HF912730	-
<i>Ixodes persulcatus</i>	JF934742	JQ625676
<i>Ixodes vespertilionis</i>	KM455967	U95909
<i>Dermacentor variabilis</i>	L34300	U95869
<i>Haemaphysalis cretica</i>	L34308	U95870
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	L34309	JX192832
<i>Amblyomma variegatum</i>	L34315	AF150046
<i>Amblyomma ebraeum</i>	L34316	U95850
<i>Amblyomma maculatum</i>	L34318	U95854
<i>Ixodes hexagonus</i>	NC_002010	U95886
<i>Amblyomma tuberculatum</i>	U95856	U95855
<i>Haemaphysalis inermis</i>	U95872	U95871
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Z97880	AF150032

Table 8. Result of Pan-Rickettsia 8 real time Q-PCR

Tick Number	Tick name	PanR8 real time Q-PCR : CP value
37	<i>I. nipponensis</i>	27.53
46	<i>I. nipponensis</i>	28.77
65	<i>H. longicornis</i>	31.4
66	<i>H. longicornis</i>	28.34
73	<i>H. longicornis</i>	32.36

Table 9. 16S rDNA Identification result

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
1	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
2	<i>H. flava</i>	○	-	-		
3	<i>H. flava</i>	○	-	-		
4	<i>H. flava</i>	○	-	-		
5	<i>H. flava</i>	○	-	-		
6	<i>H. flava</i>	○	-	-		
7	<i>H. flava</i>	○	-	-		
8	<i>H. flava</i>	○	-	-		
9	<i>H. flava</i>	○	-	-		
10	<i>H. flava</i>	○	-	-		
11	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>	24 / 24 = 100.0%	14 / 24 = 58.3%
12	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
13	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
14	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
15	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
16	<i>H. flava</i>	○	-	-		
17	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
18	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
19	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
20	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
21	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
22	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
23	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
24	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
25	suspect Rat flea	-	-	-		
26	suspect Rat flea	-	-	-	0 / 5 = 0.0%	0 / 5 = 0.0%
27	suspect Rat flea	-	-	-		
28	suspect Rat flea	-	-	-		
29	suspect Rat flea	-	-	-		

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
30	<i>I. nipponensis</i>	-	-	-		
31	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
32	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
33	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
34	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
35	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
36	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
37	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
38	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>	19 / 20	17 / 19
39	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>	=	=
40	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>	95.0%	89.5%
41	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
42	<i>I. nipponensis</i>	○	-	-		
43	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
45	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
46	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
47	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
48	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
49	<i>I. nipponensis</i>	○	-	-		
50	suspect Rat lice	○	-	-		
51	suspect Rat lice	-	-	-	0 / 5	0 / 5
52	suspect Rat lice	-	-	-	=	=
53	suspect Rat lice	-	-	-	0.0%	0.0%
54	suspect Rat lice	-	-	-		
55	suspect Mite	-	-	-		
56	suspect Mite	-	-	-	0 / 5	0 / 5
57	suspect Mite	-	-	-	=	=
58	suspect Mite	-	-	-	0.0%	0.0%
59	suspect Mite	-	-	-		

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
60	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
61	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
62	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
63	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
64	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
65	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
66	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
67	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
68	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
69	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
70	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
71	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
72	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
73	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
74	<i>H. longicornis</i>	○	-	-	30 / 30	8 / 30
75	<i>H. longicornis</i>	○	-	-	=	=
76	<i>H. longicornis</i>	○	-	-	100.0%	26.7%
77	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
78	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
79	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
80	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
81	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
82	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
83	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
84	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
85	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
86	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
87	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
88	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
89	<i>H. longicornis</i>	○	-	-		
	total	73/74	39/73		98.6%	53.4%

Table 10. 12S rDNA Identification result

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
1	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
2	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
3	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
4	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
5	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
6	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
7	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
8	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
9	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
10	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
11	<i>H. flava</i>	○	○	-		
12	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>	23/24	22/23
13	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>	=	=
14	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>	95.8%	95.6%
15	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
16	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
17	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
18	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
19	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
20	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
21	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
22	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
23	<i>H. flava</i>	○	○	<i>H. flava</i>		
24	<i>H. flava</i>	○	-	-		
25	suspect Rat flea	○	○	<i>Ctenocephalides felis</i>		
26	suspect Rat flea	-	-	-	3 / 5	3 / 3
27	suspect Rat flea	○	○	<i>Ctenocephalides felis</i>	=	=
28	suspect Rat flea	-	-	-	60.0%	100.0%
29	suspect Rat flea	○	○	<i>Ctenocephalides felis</i>		

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
30	<i>I. nipponensis</i>	-	-	-		
31	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
32	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
33	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
34	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
35	<i>I. nipponensis</i>	-	-	-		
36	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
37	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
38	<i>I. nipponensis</i>	○	○	-	17 / 20	16 / 17
39	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>	=	=
40	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>	85.0%	94.1%
41	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
42	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
43	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
45	<i>I. nipponensis</i>	○	-	-		
46	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
47	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
48	<i>I. nipponensis</i>	○	○	<i>I. nipponensis</i>		
49	<i>I. nipponensis</i>	-	-	-		
50	suspect Rat lice	-	-	-		
51	suspect Rat lice	-	-	-	0 / 5	0 / 5
52	suspect Rat lice	-	-	-	=	=
53	suspect Rat lice	-	-	-	0.0%	0.0%
54	suspect Rat lice	-	-	-		
55	suspect Mite	-	-	-		
56	suspect Mite	-	-	-	0 / 5	0 / 5
57	suspect Mite	-	-	-	=	=
58	suspect Mite	-	-	-	0.0%	0.0%
59	suspect Mite	-	-	-		

No	Morphological Identification	PCR	Sequencing success	Molecular Identification	PCR success rate	Sequencing success rate
60	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
61	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
62	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
63	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
64	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
65	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
66	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
67	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
68	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
69	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
70	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
71	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
72	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
73	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
74	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>	21 / 30	21 / 21
75	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>	=	=
76	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>	70.0%	100.0%
77	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
78	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
79	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
80	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
81	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
82	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
83	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
84	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
85	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
86	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
87	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
88	<i>H. longicornis</i>	○	○	<i>H. longicornis</i>		
89	<i>H. longicornis</i>	-	-	-		
total		61/74	59/61		82.4%	96.7%

Tabel 11. Ticks from USA

Catalog Number	Item Description	Accession Number
NR-42510	<i>Ixodes scapularis</i> adult	L43885.1
NR-42513	<i>Dermacentor variabilis</i> adult	AF150037.1
NR-44120	<i>Rhipicephalus sanguis</i> nymph	JX304717.1
NR-44385	<i>Ixodes pacificus</i> adult	L43902.1, AM410580.1
NR44387	<i>Ixodes pacificus</i> nymph	L43902.1, AM410580.1

Table 12. 16S rDNA & 12S rDNA sequencing of destroyed Tick(2015-26 Tick)

Sample name	Length(bp)	Sequence
16S -2015-26 Tick	441	TAAACTCAGATCATGTAGGAATTTAAAAGTTGAACAAA CTTCTTTTCATCAACTTTTTTCGCCGAAAAAGAATCCTA ATCCAACATCGAGTCGCAAACATTTTATCTATATGAA CTATCCAAAATTATTACGCTGTTACCCCTAGAGTATTT TTTTCATTTAATCGCTAGAAACGGAACCAACTTTTATT AAAAAAAGATACTTATTCTTTTTTTTATCACCCCAATT AAACTTTTTTTTTAAATAAAAAATTTAAAAAATAA AAATTCATAGGGTCTTCTTGTCCCTAATTTAAATTTTT GCTTTTGCCTAAAATCAAATTTAATTATTTAATTA AAGAAAGCCTCTAATTGTTCAACCATTCTCTTAGCACTC ATTTAAATCTTATTTCAATACCTTCGTATAGTCAAAA TACCACAGCAATTTAAATATTC
12S -2015-26 Tick	377	TTAGATACCCTATTATTTTAAAGCTAAATGTTGGTAGTA AGTAAAGTTTATGAAATCATAAAATTTTGGCGGTATTT TAAGCTTATTAGAGGAATTTGCTCTGTAATGGACACAA CGCCTTGATCTTACTTAATTTAGTATTAATCAGTTTG TATACCACTATATTTAATTATATTGAATAATTATAGTT AAGATTTTTTTTTTTAACCTAAAAGTATATTAAGTCA AGGTGCAGCTTATAATTATGAATGAAGTGAATTACATT AATTTAATGTTATAATATTGAAAAAATAATTAGGATT TAATAGTAAAATATTAATAGAATGAATATTTGAAATAA GCTCTAAAATATGCACACATCGCCCGTCGCTCTCA
Identification		<i>Ixodes nipponensis</i>

Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA Sequence of Ticks

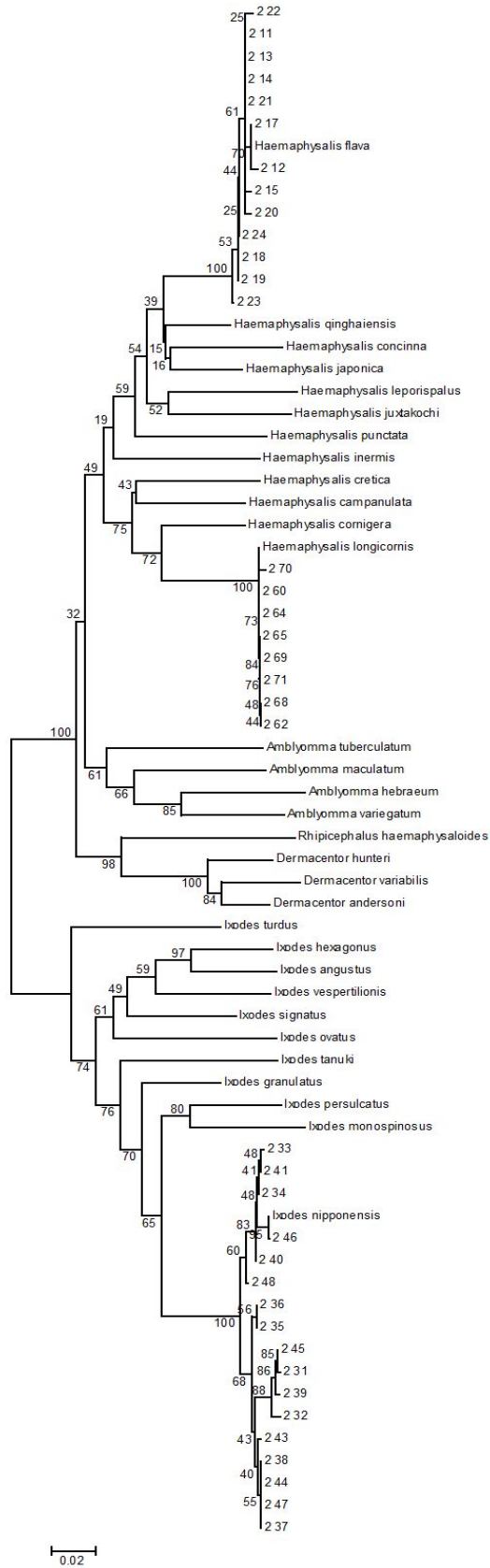


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 12S rDNA Sequence of Ticks

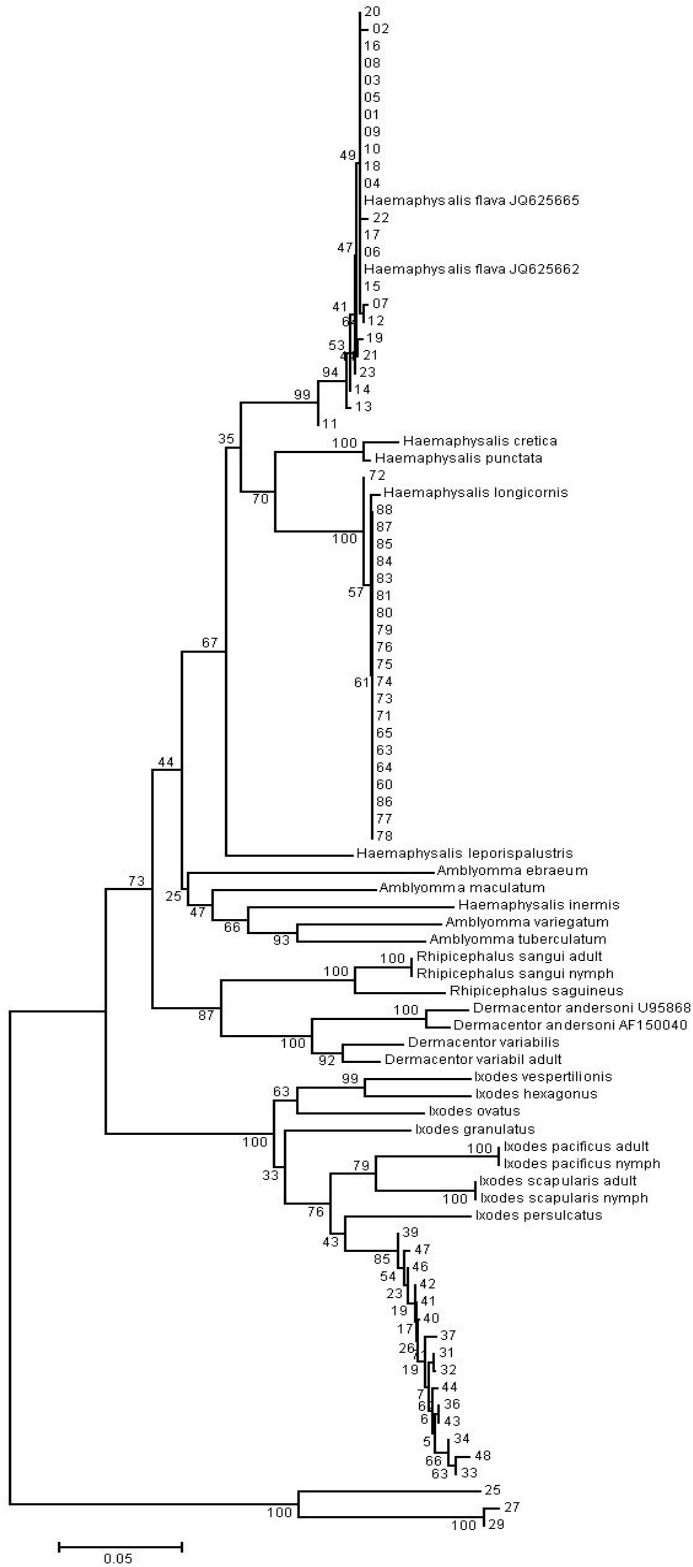
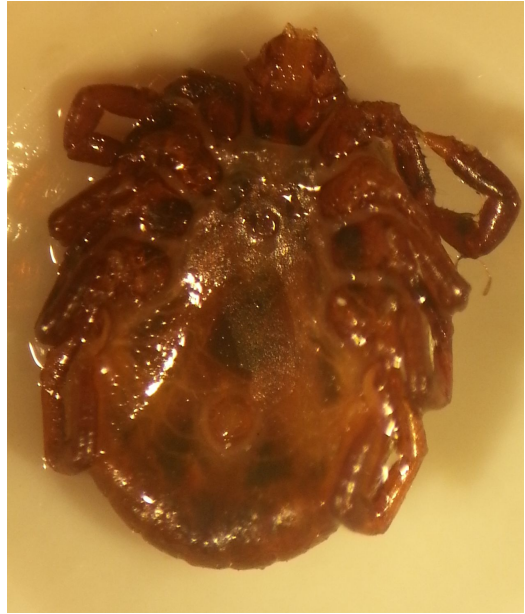


Fig. 3. *Haemaphysalis longicornis* female



A. Dorsal



B. Ventral

Fig. 4. *Haemaphysalis flava*



A. Dorsal male



B. Ventral male



C. Dorsa female



D. Ventral female

Fig. 5. *Ixodes nipponensis* female

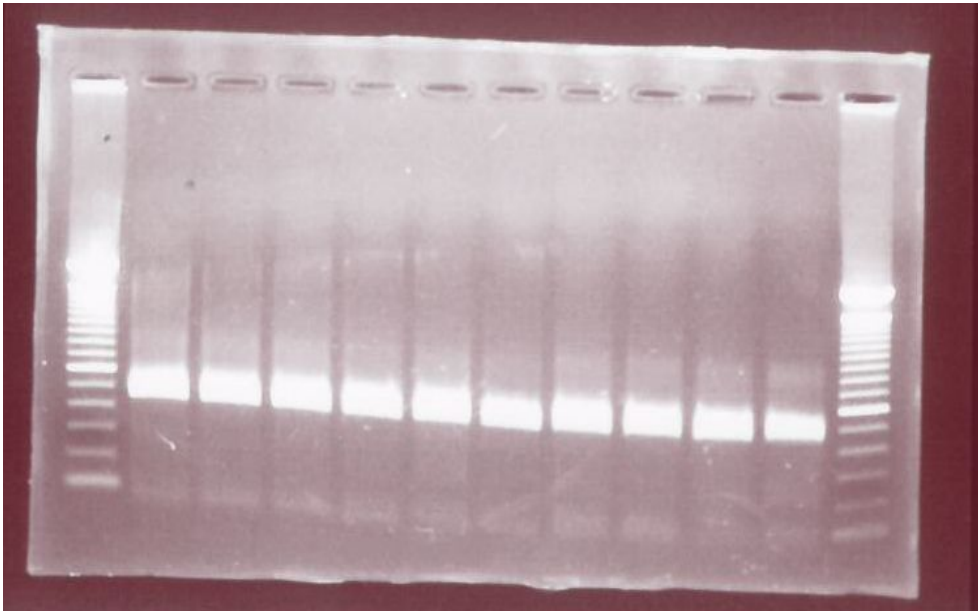


A. Dorsal



B. Ventral

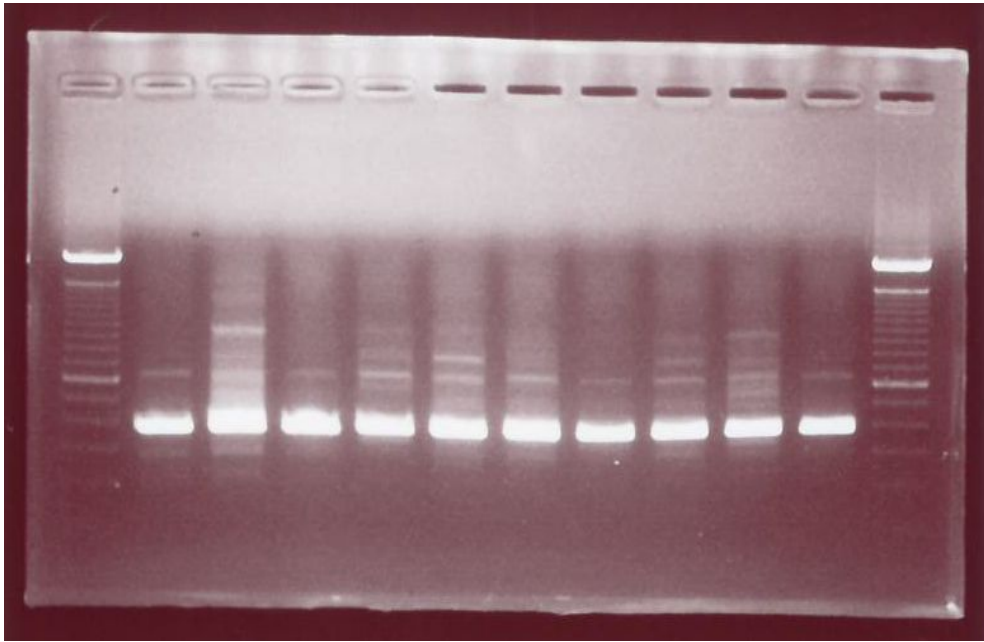
Fig. 6. 16S rDNA PCR



16S+1-F/16S-1-R PCR to amplify Partial 16S rDNA

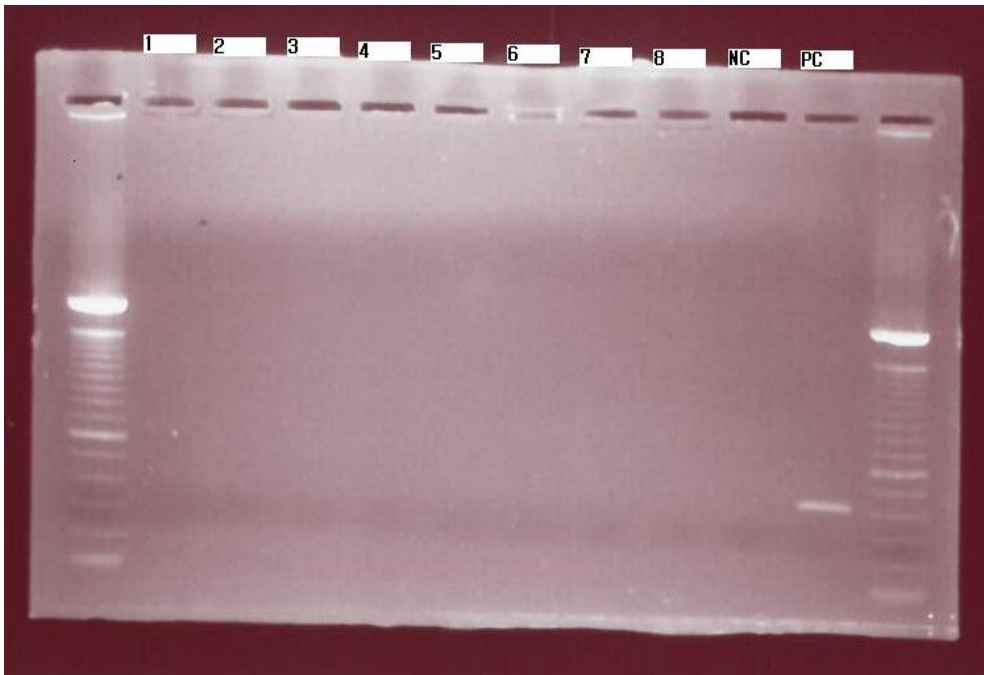
- Hypervariable region of 16S rDNA
- PCR Product size : approximately 453bp

Fig. 7. 12S rDNA PCR



12S T1B/F, 12S T2A/R PCR to amplify Partial 12S rDNA
- PCR Product size : approximately 320bp

Fig. 8. SFTS(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus)
 Detection PCR



1: No. 1~8 *H. flava*

2: No. 9~16 *H. flava*

3: No. 17~24 *H. flava*

4: No. 30~39 *I. nipponensis*

5: No. 40~49 *I. nipponensis*

6: No. 60~69 *H. longicornis*

7: No. 70~79 *H. longicornis*

8: No. 80~89 *H. longicornis*

NC: NEGATIVE CONTROL

PC: POSITIVE CONTROL (approximately 410bp)

If SFTS virus exists, positive sample has 560bp of PCR product size.

Fig. 9. *Ctenocephalides felis*



Figure 10. Destroyed Tick (2015-26 Tick)



Figure 11. Phylogenetic tree based on 16S rDNA Sequence of 2015-26 Tick

