



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](#)

2020년 2월

석사학위 논문

대한민국 제주도와 전라북도 지역의
야생쥐에서 확보한 털진드기에서
리케치아 종들의 분자적 검출

조선대학교 대학원

의과학과

유동재

대한민국 제주도와 전라북도 지역의
야생쥐에서 확보한 털진드기에서
리케치아 종들의 분자적 검출

Molecular detection of Rickettsia species in mites collected
from rodents in Jeju Island and Jeonbuk, Korea

2020년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과학 과

유 동 재

대한민국 제주도와 전라북도 지역의
야생쥐에서 확보한 털진드기에서
리케치아 종들의 분자적 검출

지도교수 김 동 민

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 10월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

유 동 재

유동재의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 건 (인) 

위 원 조선대학교 교수 김 동 민 (인) 

위 원 조선대학교 교수 김 춘 미 (인) 

2019년 11월

조선대학교 대학원

목차

표 목차	iii
그림 목차	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
연구배경 및 목적.....	1
리케치아증(rickettsiosis).....	2
쯔쯔가무시증(Scrub typhus).....	2
아나플라즈마증(Anaplasmosis).....	3
에르리키아증(Ehrlichiosis).....	4
II. 재료 및 방법	5
Study site and Mite Trapping.....	5
Mite genomic DNA Extraction.....	5
Polymerase chain reaction(PCR) amplifications.....	6
Nucleotide sequencing.....	8
Phylogenetic analysis.....	8
III. 결과.....	9
Mites Captured and Location.....	9
Molecular Detection of <i>Rickettsia</i> genus.....	9
Molecular Detection of <i>Orientia tsutsugamushi</i>	9
Molecular Detection of <i>Anaplasma</i> species.....	10

Molecular Detection of *Ehrlichia* species.....10
Phylogenetic analysis of *O. tsutsugamushi*.....11

IV. 고찰.....12

V. 결론.....14

VI. 참고문헌.....15

표 목차

표 1. 본 연구에서 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머와 중합효소 연쇄반응(PCR)의 조건.....	18
표 2. 2018년 4월-11월 제주도와 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 포획한 설치류와 털진드기의 월별 분포	19
표 3. 2018년 4월-11월 제주지역 설치류에서 채집한 털진드기를 대상으로 수행한 PCR 결과.....	20
표 4. 2019년 4월-9월 전라북도 지역 설치류에서 채집한 털진드기를 대상으로 수행한 PCR 결과.....	21
표 5. 2018년 제주와 2019년 전라북도의 털진드기에서 <i>O. tsutsugamushi</i> 를 표적으로 하는 56 kDa nested PCR을 수행한 후 양성 pool에 대한 염기서열 분석결과	22

그림 목차

그림 1 : 본 연구에서 수집한 설치류의 지리적 위치.....24

그림 2 : 2018년 4월-11월 제주지역에서 포획한 설치류에서 채집한 털진드기에서 확인한 *O.tsutsugamushi* 56 kDa 유전자 서열과 GeneBank에서 얻은 다양한 *O. tsutsugamushi* 종들의 56 kDa 유전자 서열을 토대로 제작된 phylogenetic tree.....25

그림 3 : 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 포획한 설치류에서 채집한 털진드기에서 확인한 *O.tsutsugamushi* 56 kDa 유전자 서열과 GeneBank에서 얻은 다양한 *O. tsutsugamushi* 종들의 56 kDa 유전자 서열을 토대로 제작된 phylogenetic tree.....26

ABSTRACT

Molecular detection of *Rickettsia* species in mites collected from rodents in Jeju Island and Jeonbuk, Korea

Dong-Jae Yu

Advisor: Prof. Dong-Min Kim, MD, PhD

Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Background

Due to global warming and climate variations, there is an increment in both vector population and pathogen growth rate. Surviving conditions of vectors and vector-borne pathogens are favorable due to warmer winter. As a result of atypical fluctuations in climate, the incidence of tick-borne diseases such as scrub typhus, anaplasmosis, ehrlichiosis, and rickettsiosis showed an alarming increase. It is very important to investigate the tick-borne diseases and its pathogenic distribution in wild animals and ticks. Therefore, in this study, genetic tests were performed to investigate and identify the infections of *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia* genus, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in mites collected and obtained from wild rodents from Jeju Island and Jeollabuk-do.

Methods

The wild rodents were captured using Sherman trap between April and November 2018 in Seogwipo-si, Jeju Island, and from April to September 2019 in Jinan-gun,

Jeollabuk-do. The collected mites, which were attached to the wild rodents were pooled and homogenized for further study. Genomic DNA was extracted from the homogenized mite lysate. Nested PCR (N-PCR) was performed to detect the presence of each pathogen using target specific gene primers i.e. *Scal* and *rompA* for *Rickettsia* strains, *56 kDa* for *O. tsutsugamushi*, *ankA* and *16s rRNA* for *A. phagocytophilum*. Real time PCR (RT-PCR) was performed using *sodB* gene for *Ehrlichia* species. In addition, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis was performed for PCR amplicons to determine the presence of the pathogens.

Results

From April to November 2018, 56 wild rodents were captured from Jeju Island, all were identified as *Apodemus agrarius*, and 684 mites were collected and sampled into 43 pools. From April to September 2019, 44 wild rodents were captured from Jeollabuk-do, with 40 *Apodemus agrarius* and 4 *Clethrionomys rufocanus*, and 839 mites were collected and sampled into 43 pools. Of the 1,513 mites, nested PCR targeting *Rickettsia* genus specific *scal* and *rompA* genes were performed, both genes were not detected. In the case of scrub typhus, nested PCR was performed targeting *56 kDa* gene, amplicons were identified in 0.72 % (11/1513). The sequencing analysis revealed three cases of *O. tsutsugamushi* Boryong strain and one case of *O. tsutsugamushi* Gilliam strain . *Anaplasma* was subjected to N-PCR targeting *ankA* and *16s rRNA* genes and confirmed as negative in all samples. RT- PCR was performed for *Ehrlichia* species targeting the *sodB* gene and confirmed as negative in all samples.

Conclusions

This study was performed for the detection of various *Rickettsia* species, including *O. tsutsugamushi*, *Anaplasma* and *Ehrlichia*, from the mites collected from

wild rodents in Korea. *O. tsutsugamushi* was detected in 11 samples of 1,513 mites which were collected from the rodents captured from Jeju in 2018 and Jeollabuk-do in 2019. *O. tsutsugamushi* Boryong strain was identified in three pools whereas Gilliam strain in one pool. However, *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* were negative in all the mite samples.

In conclusion this study identified the infection of *O. tsutsugamushi* in the mites obtained from rodents in Jeju and Jeollabuk-do areas. Due to the global climate change and increment in outdoor activities, the incidence of tick-bone infection is increasing not only in Korea but also around the world, with more diversified infectious conditions. Therefore, regular monitoring and conducting research on various infectious diseases, specially scrub typhus and rickettsiosis is very important. Systematic investigations of mites and ticks will assist in identifying and monitoring the presence of pathogens in forthcoming infectious diseases, subsequently it can be a serious threat to human health in the future.

Keywords: nested PCR, real time PCR, *O. tsutsugamushi*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*

I. 서론

연구배경 및 목적

매개체 감염병(vector-borne infectious diseases)은 모기, 참진드기(ticks), 벼룩 등과 같은 매개체(vector)에 의해 전파되는 질환으로, 전체 감염병 질환의 17% 이상을 차지한다 (WHO, 2014).

진드기는 크게 참진드기(tick)와 털진드기(mite)로 나뉘는데, 참진드기는 1-3 mm 정도 크기의 진드기이고, 털진드기는 0.1-0.3 mm 크기로 좁진드기라고도 한다. 참진드기가 매개하는 인체 감염 질환으로는 라임병(Lyme disease), 중증열성혈소판감소증후군(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS), 아나플라즈마증(anaplasmosis), 에르리키아증(ehrlichiosis), Q열(Q fever), 야생토끼병(야토병; tularemia), 일본홍반열(Japanese spotted fever), 바베시아증(babesiosis) 등이 있다. 털진드기는 쓰쓰가무시병(scrub typhus), 리켓치아폭스(rickettialpox) 등의 질환을 매개하는 것으로 알려져 있다(김 & 김, 2018). 국내 한 연구에 따르면 2004년에 전라남도 지역의 설치류에서 확보한 털진드기에서 리케치아 종의 감염이 보고되었다(Cho et al., 2007).

최근 온도, 강수량, 일조량의 변화 등 이상기후로 인해 쓰쓰가무시병, 아나플라즈마증, 에르리키아증, 리케치아증 등 진드기 매개성 질환의 발생률이 증가하고 있으며, 이러한 질병의 매개체인 진드기에 대한 정확한 기초 정보 조사가 필요한 실정이다(김 & 장, 2010). 국내 털진드기의 유충이 주로 10월에 집중적으로 나타난다는 보고가 있고 우리나라에서는 여름철이 성충이 산란하는 계절로 알려져 있는데 기온이 상승하면 진드기 유충의 개체 수가 증가한다는 점을 고려하면, 여름철 기온의 상승은 유충 개체 수의 증가에 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있다(김 & 장, 2010).

본 연구에서는 제주도와 전라북도 지역의 야생 설치류에서 확보한 털진드기를 대상으로 *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia* genus, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* species의 감염 여부를 유전학적 검사를 통해 확인하였다. 이를 통해 제주도와 전북지역에서 유행하는 병원체의 분포를 파악하고 환자 발생과의 연관성을 유추하여 예방책을 수립하는데 근거를 제공해줄 수 있을 것이다.

리케치아증(rickettsiosis)

Rickettsiae는 세 가지 그룹, ancestral group (AG), typhus group (TG) 및 spotted fever group (SFG)으로 구분되는 세포 내 그람 음성 박테리아 이다. AG 리케치아는 *Rickettsia bellii* 및 *R. canadensis*로 구성되며, TG 리케치아는 *R. prowazekii* 및 *R. typhi*가 포함된다. SFG는 *R. japonica*, *R. montanensis*을 포함하는 *R. massiliae* group 과 *R. helvetica* *R. felis*을 포함하는 *R. akari* group 등 여러 가지 다른 계통으로 분류되는 20종 이상의 유효 종을 포함한다(Choi et al., 2005; Choi et al., 2007). Rickettsiae는 병원체에 감염된 이, 진드기, 벼룩에 물리거나, 매개체의 대변으로 배설된 균이 상처, 구강 점막 및 결막 이나 비말을 통해 감염이 되며 발열 후에 발진이 구강에서 사지에 걸쳐 나타나고 발열, 두통, 혈압강하, 쇼크등의 임상적 소견을 보인다. 참진드기는 AG 및 SFG rickettsiae의 주요 벡터로 알려져 있다. 이는 *R. prowazekii*에 대한 벡터이고, 벼룩은 *R. typhi* 및 *R. felis*에 대한 벡터이며, 털진드기는 *R. akari* 및 *Orientia tsutsugamushi*에 대한 벡터로, 이전에는 scrub typhus group rickettsia로 알려져 있다(Choi et al., 2005).

쯔쯔가무시증(Scrub typhus)

쯔쯔가무시증(Scrub typhus)는 아시아, 북부 호주 및 서태평양의 많은 섬에서 발생하는 진드기를 매개체로 한 리케치아증이다. 세포내 절대 기생 세균으로서 Giemsa 염색을 하면 그람 음성 간구균 모양 (coccobacillus)으로 보통 직경은 0. ~0.7 μm , 길이는 1.2~2.5 μm 이다. 원형질은 세포외막과 세포내막으로 싸여 있으며 지당체, 펩티도글리칸, 점액층이 없고 매우 두꺼운 세포벽의 외층을 가지고 있다. 쯔쯔가무시병은 *Orientia tsutsugamushi*를 체내에 보유하고 있는 털진드기의 유충이 사람을 물어 림프액을 통해 전신적 혈관염이 발생하는 것을 특징으로 하는 급성 발열성 질환이다.

혈청형은 Gilliam, Karp, Kato, Boryong이 있으며, 지역별로 특이적인 혈청형이 존재하는데 국내 주요 혈청형은 Boryong이다. 쯔쯔가무시병의 특징은 털진드기 유충 (*Leptotrombidium* spp.)에 물린 부위에 나타나는 가피 형성이다. 국내에 보고된 털진

드기 14속 51종 중에서 현재까지 *O. tsutsugamushi* 병원균을 매개 하는 것으로 알려진 종은 총 8종으로 대잎털진드기(*L. pallidum*), 활순털진드기(*L. scutellare*), 수염털진드기(*L. palpale*), 동양털진드기(*L. orientale*), 반도털진드기(*L. zetum*), 사륙털진드기(*Neotrombicula japonica*), 조선방망이털진드기(*Euschoengastia koreaensis*), 들꿩털진드기(*Helenicula miyagawai*)가 있다(질병관리본부, 2019). 쯤쯤가무시증에 감염이 되면 심한 두통, 발열, 오한이 갑자기 발생하고 감기와 유사하며, 발병 5일 이후 발진이 몸통에 나타나서 사지로 퍼지며 반점상 구진의 형태를 보인다. 국소성 또는 전신성 림프절 종대와 비장 비대를 보이며, 합병증으로 일시적인 뇌신경 마비가 올 수 있다. 쯤쯤가무시병은 일반적으로 가을철에 발생하는데 여름철에 털진드기가 산란한 알이 초가을부터 부화하면서 동물이나 사람의 체액을 먹이로 하여 성장하기 때문이다. 쯤쯤가무시병은 국내에서 1951년 첫 환자 발생이 있었고, 1993년 12월에 법정전염병으로 지정되었으며 이후 지속적으로 증가하는 추세이다. 쯤쯤가무시병은 야외활동력과 함께 가피와 발진 등의 소견을 보여 임상적으로도 진단이 가능하지만, 혈청학적 진단, 유전자 검출 이나 배양법 등으로 진단할 수 있다(질병관리본부, 2019; Xu et al., 2017). 털진드기는 크기가 0.15-0.2 mm 정도로 작고 숙주로는 등줄쥐(*Apodemus agrarius*), 갈밭쥐(*Microtus fortis*) 등을 포함한 설치류가 주요 숙주이며 조류와 파충류에도 기생을 한다고 알려져있다(질병관리본부, 2019).

아나플라즈마증(Anaplasmosis)

아나 플라즈마는 *Anaplasmataceae* family에 속하는 그람 음성 알파프로테인 박테리아이다(Dumler et al., 2001). Anaplasmataceae의 4가지 속(*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*) 중에서, 아나플라즈마는 생활양식과 진화 역사에서 *Ehrlichia* spp와 가장 비슷하다. 아나플라즈마 속은 *A. bovis*, *A. ovis*, *A. platys*, *A. marginale* 및 *A. phagocytophilum*의 5가지 종을 포함하며, 처음 4종은 동물을 감염시키며, *A. phagocytophilum*은 인간에게도 아나플라즈마증을 일으킨다. 이 종들 중에서, 동물에서 아나 플라즈마증을 유발하는 *A. marginale*과 인간 과립구성 아나 플라즈마증을 일으키는 인간 병원체 *A. phagocytophilum*에 대한 연구가 지금까지 가장 많이 이루어졌다(Dumler et al., 2001). *A. phagocytophilum*은 그람 음성의 리케치아성 세균이며, 병원체는 과립구성 백혈구에서 주로 증식한다. 증증일 때에는 비-혈액세포에도 감염이 이루어진다. 직경은 0.2~0.5 μm 크기의 세균이 감염세포의 세포질 내에 2.0~

7.0 μm 크기의 morula를 형성하며 이 morula 안에서 이분열을 통하여 증식한다 (Bakken et al., 1996). 아나플라즈마증은 개, 소, 양, 염소, 말 그리고 야생동물에 감염 전파되는 리케치아성 질환이고 아나 플라즈마 증은 혈액 매개 병원체이며 참진드기에 의해 숙주에서 숙주로 감염된다.

에르리키아증(Ehrlichiosis)

에르리키아증은 아나플라즈마증과 비슷하게 진드기 매개에 의해 사람을 포함한 개, 소, 양, 염소, 말을 포함한 다양한 야생동물에 감염 전파되는 리케치아성 질환이다. 1986년 진드기에 수차례 노출된 경력이 있는 열성 환자의 혈액도말표본에서 *Ehrlichia chaffeensis*가 처음으로 관찰된 이래로 사람에게 대표적으로 유발되는 에르리키아증과 아나플라즈마증인 human monocytic ehrlichiosis(HME)와 human granulocytic anaplasmosis(HGA)로 구분되었다(Anderson et al., 1991; Maeda et al., 1987). *E. chaffeensis*는 그람 음성의 리케치아성 세균으로 단핵구성 백혈구에서 주로 증식하며, 과립구성 백혈구에서도 증식하는 것으로 알려져 있다(Anderson et al., 1991; Bakken et al., 1996; Bakken & Dumler, 2000). 직경은 0.4~0.6 μm 크기로 감염세포의 세포질 내에서는 1.0~6.0 μm 크기의 morula를 형성하며, 그 안에서 이분열을 통하여 증식하고, 여기에는 보통 1~40개 이상의 균체가 포함되어 있다(Olano & Walker, 2002; Paddock & Childs, 2003). *E. chaffeensis*의 매개체는 *Amblyomma americanum* 진드기로 알려져 있다(Olano & Walker, 2002). 국내에서는 2000년도에 HME에 대한 양성 환자가 나타난 것이 처음으로 보고 되었으며 임상 증상으로는 발열, 두통, 근육통 등이 일반적이고 심할 경우 급성신부전, 호흡곤란, 저혈압 등이 발생한다(Sachar, 2000).

II. 재료 및 방법

Study site and Mite Trapping

2018년 4월-11월에 제주도 서귀포시(33°15'01.9"N 126°32'47.1"E)에서, 2019년 4월-9월에 전라북도 진안군(35° 39' 50.72"N 127° 24' 56.62"E)에서 논, 밭, 수로, 야산, 저수지 등 다양한 위치에서 각각 20개씩 총 100개의 Sherman live traps을 설치하여 설치류를 포획하였다. 설치류에서 확보한 털진드기는 포획 위치와 설치류의 종류에 따라 순차적으로 동정되고 번호를 매겼다. 모든 털진드기는 1-30개의 수를 모아서 실험을 위해 pooling 하였다. 그 후 털진드기는 Hard Tissue Grinding MK28R(Bertin Technology, France) 용기에 PBS (10% FBS, 1x penicillin / Streptomycin) 800uL을 첨가한 후에 균질화기(Mini-BeadBeater)를 이용해 4,600rpm에서 20초간 1회간 균질화하였다. 그 후 용해액을 추가 실험까지 -80 °C에서 보관 하였다.

Mite genomic DNA Extraction

Genomic DNA는 Dneasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 균질화된 샘플로부터 추출을 진행하였다. 균질화한 털진드기 용해액 150uL을 ATL buffer(lysis buffer) 150ul 와 Proteinase K solution 20uL를 각각 첨가하여 10초간 섞은 후 56°C의 water bath에서 3시간-overnight 동안 배양하였다. 배양한 후 AL buffer(lysis buffer) 150uL을 첨가하여 10초간 섞은 후 70°C의 water bath에서 10분간 배양하였다. 그 후 Ethanol(96-100%) 200uL를 첨가하여 10초간 잘 섞은 다음 spin column에 옮겨 상온 8,000rpm에서 1분간 원심분리 하여 DNA가 column에 잘 결합되게 하였다. 새로운 collection tube를 장착하여 spin column에 AW1 (washing buffer) 500uL을 첨가하여 상온에서 8,000rpm으로 1분간 원심분리하였다. 그리고 새로운 collection tube를 장착하여 spin column에 AW2 (washing buffer) 500uL을 첨가하여 상온에서 13,000rpm으로 3분간 원심분리하여 세척을 1번 더 진행하였다. spin column의 남은 Buffer 용액을 완전히 제거하기 위하여 상온에서 13,000rpm으로 1분간 원심분리 하였다. DNA 용출을 위해 spin column을 새로운 1.5ml microcentrifuge tube에 결합한 후 AE(elution buffer) 70uL를 첨가한 후

상온에서 1분간 배양하여 8,000rpm에서 1분간 원심분리하여 Genomic DNA 추출을 완료하였다.

Polymerase chain reaction(PCR) amplifications

각각의 감염에 표적화된 올리고 뉴클레오티드 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 털진드기에서 *Rickettsia* genus의 검출은 *sca1*(Surface cell antigen type 1 gene) 및 *rompA*(Outer membrane protein A gene) 유전자 서열을 사용하고 *O. tsutsugamushi*의 검출은 *56 kDa*(*O. tsutsugamushi* specific antigen gene) 유전자 서열을 사용하고 *Anaplasma* species의 검출은 *A. phagocytophilum*의 *ankA*(ankyrin-related protein gene) 및 *16S rRNA*(16S ribosomal RNA) 유전자 서열을 사용하여 nested PCR을 수행하였다. *Ehrlichia* species의 검출은 *sodB*(Superoxide dismutase protein B gene) 유전자 서열을 사용하여 real time PCR을 수행하였다.

Rickettsia genus의 검출을 위한 nested PCR은 PCR premixture tube (AccuPower PCR PreMix, Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 사용하였고 그 조성은 20uL 반응액 기준으로 Taq DNA polymerase 1U, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 250 μmol/L, Reaction Buffer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 그리고 stabilizer 와 tracking을 위한 dye 이다. *Rickettsia* genus의 검출을 위해 사용한 primer는 *sca1*의 경우 1차 PCR에서 PanR-sca1-6545F/PanR-sca1-7360R이고, 2차 PCR에서 사용한 primer는 PanR-sca1-6647F/PanR-sca1-7354R를 사용하였고 *rompA*의 경우에는 1차 PCR에서 R190.70F/RR190.701R, 2차 PCR에서 R190.70F/RR190.602R을 사용하였으며, primer의 서열과 PCR 조건은 표1에 나타나 있다. 1차 PCR 수행을 위한 반응액 조성은 PCR premixture tube에 Template DNA 2uL, 10 pmole/uL의 forward primer와 reverse primer 각각 1uL, D.W 16uL를 넣어 총 20uL의 반응액으로 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 수행을 위해서는 PCR premixture tube에 1차 PCR product를 Template DNA로 하여 1uL를 첨가하고, 10 pmole/uL의 forward primer와 reverse primer는 각각 1uL, 그리고 D.W 17uL를 넣어 총 20uL의 반응액으로 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 완료 후 증폭산물을 확인하기 위해 1 x TAE migration buffer (pH 8.0; 40 mmol / L Tris-acetate, 1 mmol / L EDTA)를 사용하고 ethidium bromide (0.5 μg / mL)로 겔을 염색한 1.5 % agarose gel 상에서 전기영동을 하여 관찰하였다.

*O. tsutsugamushi*의 검출을 위한 nested PCR은 *O. tsutsugamushi*의 *56 kDa* 유전자

를 표적으로 하여 제작된 INNOPLEXTM TSUTSU detection kit (iNtRON Corp., Seongnam, Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였다. kit에 사용된 primer의 서열(kit에 포함됨)과 PCR 조건은 표1에 나타나 있다. 1차 PCR은 TSUTSU 1st PCR premix(0.01% Taq DNA polymerase, 0.01% dATP,dTTP,dGTP,dCTP, 0.005% Tsutsu 1st primer) tube에 DNase/RNase free water를 18uL 첨가한 후 Template DNA를 2uL를 넣어 최종 반응액을 20uL로 만들어 진행했다. 2차 PCR은 TSUTSU 2nd PCR premix(0.01% Taq DNA polymerase, 0.01% dATP,dTTP,dGTP,dCTP, 0.005% Tsutsu 2nd primer) tube에 DNase/RNase free water를 19uL 첨가한 후 1차 PCR product를 1uL 첨가하여 최종 반응액을 20uL로 만들어 진행했다. 2차 PCR 완료후 증폭산물을 확인하기 위해 1 x TAE migration buffer (pH 8.0; 40 mmol / L Tris-acetate, 1 mmol / L EDTA)를 사용하고 ethidium bromide (0.5 ug / mL)로 겔을 염색한 1.5 % agarose gel 상에서 전기영동을 하여 관찰하였다.

Anaplasma species의 검출을 위한 nested PCR은 *A. phagocytophilum*을 표적으로 하는 *ankA* 및 *16S rRNA* 유전자 서열을 이용한 primer를 사용하여 PCR을 진행하였다. *Anaplasma* species의 검출을 위해 사용한 primer는 *ankA*의 경우 1차 PCR은 ANK-F1/ANK-R1, 2차 PCR은 ANK-F2/ANK-R2를 사용하였으며 *16S rRNA*의 경우 1차 PCR은 AE1-F/AE1-R, 2차 PCR은 AE1-R/EE-3을 사용하였다. 각 PCR에 사용된 primer의 서열과 PCR 조건은 표 1에 나타나 있다. *ankA*와 *16S rRNA*를 표적으로 하는 nested PCR을 위해 1차 PCR은 AmpliTaq Gold 360 Master Mix(AB applied biosystems, Foster city, USA)에 동봉된 Master Mix 10uL와 GC Enhancer 2uL, Template DNA 2uL, 10 pmole/uL의 forward primer와 reverse primer 각각 1uL, D.W 4uL를 넣어 총 20uL로 반응액을 맞추어 진행하였다. 그다음, 2차 PCR은 1차 PCR product를 Template DNA로 하여 2uL를 첨가하고 나머지 반응액은 1차 PCR과 같이 첨가하여 총 20uL의 반응액으로 진행하였다. 2차 PCR 완료후 증폭 산물을 확인하기 위해 1 x TAE migration buffer (pH 8.0; 40 mmol / L Tris-acetate, 1 mmol / L EDTA)를 사용하고 ethidium bromide (0.5 ug / mL)로 겔을 염색한 1.5 % agarose gel 상에서 2차 PCR의 PCR product에 5uL의 10x loading buffer(Takara Bio Inc, Japan)를 섞어 그중 5uL를 전기영동하여 관찰하였다.

Ehrlichia species의 검출을 위한 PCR은 *sodB* 유전자 서열을 사용하여 real time PCR(qPCR)을 수행하였다. real time PCR을 위해 iTaqTM Universal SYBR Green Supermix(Bio-Rad, USA) 와 primer Ehr-sodB-F2/Ehr-sodB-R2를 사용하였다. 각

PCR에 사용된 primer의 서열과 PCR 조건은 표1에 나타나있다. real time PCR의 반응액은 Supermix(iTaq DNA polymersase, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green Dye, enhancers, dye of stabilizers and ROX and fluorescein) 10uL, 10pmole/uL의 forward primer와 reverse primer 각각 1uL, Template DNA 2uL, D.W 6uL를 첨가하여 총 20uL로 real time PCR을 수행하였다. real time PCR은 Realtime Quantitative Thermal Block(Exicycler™ 96 Fast, Bioneer Corp., Daejeon, Korea)을 사용하여 진행하고 Exicycler 4 Analysis software program으로 결과를 분석하였다.

Nucleotide sequencing

증폭된 PCR 생성물의 뉴클레오티드 서열은 PCR 프라이머를 이용하여 염기서열분석(Sequencing)에 의해 결정되었다. 양성의 PCR product는 QIAquick PCR purification kits (Qiagen)를 사용하여 정제 하였다. 정제된 PCR product는 염기서열 결정을 위해 시퀀싱은 코스모진텍(cosmogenetech Inc. Deajeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였으며 automatic sequencer (ABI Prism 3730XL DNA analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad City, California)와 PCR에 사용된 primers를 이용하여 양방향으로 그 염기서열을 결정하였다. 그 서열이 결정된 염기서열의 확인 및 유사성 검정은 DNASTAR-Lasergene v6, (DNASTAR, Madison, Wisconsin, US) 프로그램을 사용하여 수행하였다.

Phylogenetic analysis

각 털진드기 샘플들에서 얻은 유전자 단편의 염기서열과 GeneBank에서 얻은 다양한 bacterial strains의 유전자 염기서열을 이용하여 ClustalX (Ver 2.0; www.clustal.org) 소프트웨어 프로그램을 사용하는 N-J (Neighbor Joining) 방법으로 phylogenetic tree를 제작하였다. PAUP 4.0b 버전을 사용하여 유전적 거리를 계산하고 1000 회 반복의 부트스트랩 분석으로 그 위상을 평가했다.

III. 결과

Mites Captured and Location

2018년 4월부터 11월까지 제주도 서귀포시에서 56마리의 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)가 포획되었고, 등줄쥐에서 채집한 털진드기는 684마리로 각 등줄쥐에서 얻은 털진드기를 포획된 위치에 따라 분리해서 30개씩 pooling 하였으며 총 43개의 털진드기 pool sample을 확보하였다. 또한, 2019년 4월부터 9월까지 전라북도 진안에서 40마리의 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)와 4마리의 대륙밭쥐(*Clethrionomys rufocanus*)가 포획되었고, 야생들쥐에서 채집한 털진드기는 839 마리로 각 야생들쥐에서 얻은 털진드기를 포획된 위치와 설치류의 종류에 따라 분리해서 pooling 하였으며 총 43개의 털진드기 pool sample을 확보하였다(표-2). 포획지역의 지리적 위치는 그림 1에 표시하였다.

Molecular Detection of *Rickettsia* genus

Rickettsia genus의 *scal* 유전자와 *rompA* 유전자를 표적으로 하는 nested PCR을 수행하였다. PCR 수행결과 2018년 4월-11월 제주도에서 수집된 684마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *scal* 유전자와 *rompA* 유전자를 표적으로하는 N-PCR을 수행한 결과 모두 0%의 양성률을 보였다(표 - 3). 마찬가지로 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 수집된 839마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *scal* 유전자와 *rompA* 유전자를 표적으로 하는 N-PCR을 수행한 결과 모두 0%의 양성률을 보였다. (표 - 4).

Molecular Detection of *Orientia tsutsugamushi*

*O. tsutsugamushi*의 56 kDa 유전자를 표적으로하는 INNOPLX™ TSUTSU detection kit (Intron)를 이용하여 nested PCR을 수행하였다. 2018년 4월-11월 제주도

에서 수집된 684마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 56 kDa 유전자를 표적으로 하는 N-PCR을 수행한 결과 2개의 pool에서 양성(+)이 확인되었고 모두 6월에 수집한 등줄쥐에서 확보한 것이며 1.3% (9/684)의 양성률을 보였다.(표 - 3). 또한, 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 수집된 839마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 56 kDa 유전자를 표적으로 하는 N-PCR을 수행한 결과 2개의 pool에서 양성(+)이 확인되었고 1개의 pool은 5월, 다른 1개의 pool은 9월에 등줄쥐에서 확보한 것이며 총 0.23% (2/839)의 양성률을 보였다(표 - 4). 쫄쫄가무시의 경우 2018년과 2019년에 총 1,513 마리의 털진드기 중 11마리가 PCR 양성으로 0.72%의 PCR 양성률을 보였으며, 최소 양성률은 0.26%였다.

Molecular Detection of *Anaplasma* species

Anaplasma species의 *A. phagocytophilum*를 검출하기 위해 *ankA* 유전자와 16S *rRNA* 유전자를 표적으로 하는 nested PCR을 수행하였다. 2018년 4월-11월 제주도에서 수집된 684마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *ankA* 유전자와 16S *rRNA* 유전자를 표적으로 하는 N-PCR 모두 0%의 양성률을 보였다(표 - 3). 마찬가지로 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 수집된 839마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *ankA* 유전자와 16S *rRNA* 유전자를 표적으로 하는 N-PCR을 수행한 결과 모두 0%의 양성률을 보였다. (표 - 4).

Molecular Detection of *Ehrlichia* species

*Anaplasma*와 *Ehrlichia* species의 검출을 위해 *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. canis*를 표적으로 하는 *sodB* 유전자 서열을 사용하여 SYBR Green PCR을 수행하였다. 2018년 4월-11월 제주도에서 수집된 684마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *sodB* 유전자를 표적으로 하는 real time PCR을 수행한 결과 0%의 양성률을 보였다(표 - 3). 마찬가지로 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 수집된 839마리의 털진드기중 43개의 pool을 대상으로 *sodB* 유전자를 표적으로 하는 real time PCR을 수행한 결과 0%의 양성률을 보였다(표 - 4).

Phylogenetic analysis of *O. tsutsugamushi*

2018년 4월-11월 제주도에서 수집된 각 43개 털진드기 pool과 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 포획된 43개 털진드기 pool에 대하여 각 2건씩 *O. tsutsugamushi* 균주를 검출하였다. 염기서열 분석결과 2018년은 2건 모두 *O. tsutsugamushi* Boryong 균주(No. 18-JJ-6-miteP2, 18-JJ-6-miteP4) 로 확인이 되었고 2019년은 2건 중 1건은 *O. tsutsugamushi* Boryong(No.2019-09-JB-Mite-P6)균주, 1건은 *O. tsutsugamushi* Gilliam(No.2019-05-JB-mite-P2) 균주로 확인되었다. 이러한 염기서열 분석결과와 GeneBank에 이미 등록된 다양한 *O. tsutsugamushi* 종들의 56 kDa 유전자 서열을 토대로 phylogenetic tree를 제작하였다. No. 18-JJ-6-miteP2, 18-JJ-6-miteP4, 2019-09-JB-Mite-P6의 털진드기 pool에 대해서는 서울에서 분리된 *Boryong* 균주(Accession no. AM494475.1)와 클러스터를 이루고 그 상동성은 99.33-99.55%이다. No.2019-05-JB-mite-P2의 털진드기 pool에 대해서는 대만의 화롄시(Hualien, Taiwan)에서 분리된 *Gilliam* 균주(Accession no. DQ485289.1)와 클러스터를 이루고 그 상동성은 99.06%이다. (표-5,그림-2,그림-3).

IV. 고찰

설치류는 병원체의 증폭 숙주로 작용 한 다음 환경에서 바이러스를 흘리거나 진드기 또는 벼룩과 같은 기생충 절지동물 벡터를 사용하여 병원체를 인간에게 전염시킨다 (Sanprick et al., 2019).

진드기를 매개로 한 질병(tick borne diseases) 중에 참진드기(tick)는 아나플라즈마, 리케치아, 바베시아, 보렐리아 종들의 병원체와 바이러스를 매개하고(Burri et al., 2011; Hauck et al., 2019), 털진드기(mite)는 리케치아의 일종인 쓰쓰가무시(*O.*

tsutsugamushi)와 *R. akari* 병원체를 매개한다(Ponnusamy et al., 2018). 쓰쓰가무시증을 매개하는 털진드기 종의 국내 분포는 대잎털진드기(*Leptotrombidium pallidum*), 활순털진드기(*Leptotrombidium scutellare*)의 유충의 발생시기와 환자의 발생시기가 10월과 11월로 일치하기 때문에 가장 많은 종을 차지한다(질병관리본부 2009). 국내 쓰쓰가무시증을 매개하는 털진드기 종을 밝히기 위하여 1989년에 경기도 북부지역에서 447마리의 대잎털진드기를 대상으로 *O. tsutsugamushi* 항원을 조사한 결과 2개체에서 항원이 확인되었고 0.4%의 감염률을 보였고 1991-1992년에 제주도에서 1,142 개체의 활순털진드기(*L. scutellare*)를 대상으로 *O. tsutsugamushi* 항원을 조사한 결과 6개체에서 항원이 확인되어 0.5%의 감염률을 보여 국내 매개 종으로 확인이 되었으며 지리적으로는 중부지방은 대잎털진드기, 남부지방과 제주도는 활순털진드기가 주 매개종인 것으로 나타났다(질병관리본부, 2019; Ree HI et al., 1992; 질병관리본부 2009). 털진드기는 변온동물에 속하기 때문에 생태 및 번식, 개체수 등이 기후변화의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다(김 & 장, 2010). 기후변화가 생태계에 영향을 미치기 때문에 병원체의 생태계, 생활사의 변화를 간과할 수 없다. 따라서 본 연구는 털진드기를 이용하여 리케치아종의 하나인 쓰쓰가무시균(*O. tsutsugamushi*) 뿐만 아니라 아나플라즈마(*A. phagocytophilum*), 에르리키아(*Ehrlichia*), 리케치아(*Rickettsia*) 종의 감염 유무를 확인하고자 했으며 각 병원체에 특이적인 다양한 유전자들을 표적으로 nested PCR과 real time PCR을 수행하여 확인하였다. 털진드기는 2019년 4-11월 제주도와 2019년 4월-9월 전북권 야생 설치류에서 1,513마리를 확보하였고 그 결과 *O. tsutsugamushi*의 56 kDa 유전자를 표적으로 하는 nested PCR에서 4마리의 털진드기에 대하여 양성을

보였으며, 0.26%의 양성률을 보였다. 국내 보고에 따르면 2011-2013년 설치류에서 확보한 털진드기에서 썩썩가무시 양성률은 지역별로 차이가 있으나, 봄철에는 최소양성률이 0.3%, 가을철에는 0.8%로 확인되었다(길 et al., 2015). 반면에, 아나플라즈마, 리케치아 종을 표적으로 하는 nested PCR과 에르리키아 종을 표적으로 하는 real time PCR 수행결과 관련 병원체를 검출할 수 없었다. 털진드기의 개체수가 적지 않음에도 불구하고 양성률이 떨어지는 이유는 썩썩가무시는 털진드기(mite)를 매개체로 하지만 리케치아 와 아나플라즈마의 경우, 일반적으로 참진드기(tick)가 이들 병원체의 매개체로 작용하기 때문이다(Sebastian et al., 2017; Ponnusamy et al., 2017). 국내의 한 연구에 따르면 2004년에 전라남도 지역의 설치류에서 확보한 털진드기에서 리케치아 종을 *gltA*(Citrate synthase protein gene) 와 *rompB*(Outer membrane protein A gene)를 표적으로 하여 nested PCR을 수행하였고 검출된 균종은 *Rickettsia* sp. *TwKM02*, *Rickettsia* sp *Cfl5R. australis*, *R. japonica*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. typhi*로 확인되었다(Choi et al., 2007). 그러나 본 연구에서 리케치아 종을 검출하기 위하여 수행한 PCR에 사용된 primer는 *sca1* 과 *rompA* 유전자를 표적으로 하여 두 연구를 직접 비교하기는 어려우나 표적 유전자의 차이에 의한 영향을 배제할 수 없을 것이다. 그리고 국외의 한 연구에 따르면 유럽에서 새에서 확보한 털진드기의 *Neotrombicula autumnalis* 종에서 *Anaplasma phagocytophilum* 과 *Borrelia burgdorferi*를 매개한다는 보고가 있고(Literak et al, 2008) 이것은 국내에서 발견되는 털진드기의 종이 아니지만 털진드기에서 *O.tsutsugamushi* 이외의 다른 진드기 매개 병원체가 발견될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 썩썩가무시외에 아나플라즈마, 에르리키아와 같은 다른 리케치아 종의 검출은 확인하지 못했지만 세계적으로 기후변화에 따른 생태계의 변화가 이루어지고 있고 생활사에도 영향을 미칠 것으로 예상됨에 따라 다른 리케치아 종의 검출을 배제할 수 없기 때문에 지속적인 모니터링이 필요하다고 생각한다.

V. 결론

본 연구는 국내의 야생 설치류에서 수집된 털진드기에서 쓰쓰가무시, 아나플라즈마를 포함하여 다양한 리케치아 종의 검출을 확인하고자 수행하였다. 2018년 4월-11월 제주도와 2019년 4월-9월 전북권 야생 설치류에서 확보한 털진드기 86개의 pool중에서 *O. tsutsugamushi*의 56 kDa 유전자를 표적으로 하는 nested PCR 수행결과 4개의 털진드기 pool에서 *O. tsutsugamushi*를 검출하여 3개의 Boryong 군주와 1개의 Gilliam 군주가 확인되었고, 총 1,513마리의 털진드기의 쓰쓰가무시균에 대한 최소 양성률은 0.26%였다. 반면에 리케치아, 아나플라즈마, 그리고 에르리키아의 경우 모든 털진드기에서 검출되지 않았다. 추후 연구를 통해 야생 설치류와 털진드기의 지역별, 계절적 분포 외에도 지속적인 병원체 감시를 통해 쓰쓰가무시 뿐만 아니라 다른 리케치아 병원체들의 보균율의 변화에 대한 조사 및 분석이 수행된다면, 앞으로의 예방대책을 수립하는데 근거를 제공할 것이다.

VI. 참고문헌

- World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. 2014.
- 김다영, 김동민. 한국의 흔한 진드기 매개 감염병: 쯔쯔가무시병과 중증열성혈소판 감소증후군. 대한내과학회지. 2018;93(5):416-23.
- 질병관리본부. 국내 쯔쯔가무시증 매개종의 규명과 지역적 분포(Determination of vector species of tsutsugamushi disease and their geographical distribution in Korea). 주간 건강과 질병 2009;2(50):841-55.
- 길병철, 이정민, 이영선. 국내 쯔쯔가무시 숙주 및 매개체 보균율 조사 (Surveillance for Prevalence of *Orientia tsutsugamushi* in Wild Rodents and Chigger Mites in Korea, 2011-2013). 주간 건강과 질병. 2015;8(25):572-7.
- 질병관리본부. 진드기 매개 감염병 관리지침.2019.
- 김시현, 장재연. 국내 기후변화 관련 감염병과 기상요인간의 상관성 (Correlations Between Climate Change-Related Infectious Diseases and Meteorological Factors in Korea). Journal of Preventive Medicine and Public Health. 2010;43(5):436-44.
- Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1991;29(12):2838-42.
- Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA. 1996;275(3):199-205.
- Burri C, Dupasquier C, Bastic V, Gern L. Pathogens of Emerging Tick-Borne Diseases, Anaplasma phagocytophilum, Rickettsia spp., and Babesia spp., in Ixodes Ticks Collected from Rodents at Four Sites in Switzerland (Canton of Bern). Vector-Borne Zoonot. 2011;11(7):939-44.
- Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerg Infect Dis. 2005;11(2):237-44.
- Choi YJ, Lee EM, Park JM, Lee KM, Han SH, Kim JK, et al. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari : Trombiculidae) in southern

- Jeolla Province, Korea. *Microbiology and Immunology*. 2007;51(3):307-12.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. 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(Pt 6):2145-65.
 - Eremeeva ME, Bosserman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of Rickettsia massiliae from Rhipicephalus sanguineus ticks collected in Arizona. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(8):5569-77.
 - Hauck D, Springer A, Pachnicke S, Schunack B, Fingerle V, Strube C. Ixodes inopinatus in northern Germany: occurrence and potential vector role for Borrelia spp., Rickettsia spp., and Anaplasma phagocytophilum in comparison with Ixodes ricinus. *Parasitol Res*. 2019.
 - 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(9):5766-76.
 - Kim KH, Yi J, Oh WS, Kim NH, Choi SJ, Choe PG, et al. Human granulocytic anaplasmosis, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(10):1708-11.
 - Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with Ehrlichia canis, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med*. 1987;316(14):853-6.
 - Olano JP, Walker DH. Human ehrlichioses. *Med Clin North Am*. 2002;86(2):375-92.
 - Paddock CD, Childs JE. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):37-64.
 - Ponnusamy L, Willcox AC, Roe RM, Davidson SA, Linsuwanon P, Schuster AL, et al. Bacterial microbiome of the chigger mite Leptotrombidium imphalum varies by life stage and infection with the scrub typhus pathogen Orientia tsutsugamushi. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208327.

- Quorollo BA, Riggins D, Comyn A, Zewde MT, Breitschwerdt EB. Development and Validation of a Sensitive and Specific sodB-Based Quantitative PCR Assay for Molecular Detection of Ehrlichia Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(11):4030-2.
- Ree HI, Lee IY, Cho MK. Study on vector mites of tsutsugamushi disease in Cheju Island, Korea. *Kisaengchunghak Chapchi*. 1992;30(4):341-8.
- Sanprick A, Yooyen T, Rodkvamtook W. Survey of Rickettsia spp. and Orientia tsutsugamushi Pathogens Found in Animal Vectors (Ticks, Fleas, Chiggers) in Bangkaew District, Phatthalung Province, Thailand. *Korean J Parasitol*. 2019;57(2):167-73.
- Sebastian PS, Tarragona EL, Bottero MN, Mangold AJ, Mackenstedt U, Nava S. Bacteria of the genera Ehrlichia and Rickettsia in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. *Exp Appl Acarol*. 2017;71(1):87-96.
- Xu G, Walker DH, Jupiter D, Melby PC, Arcari CM. A review of the global epidemiology of scrub typhus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):e0006062.
- Literak I, Stekolnikov AA, Sychra O, Dubska L, Taragelova V. Larvae of chigger mites Neotrombicula spp. (Acari: Trombiculidae) exhibited Borrelia but no Anaplasma infections: a field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. *Exp Appl Acarol*. 2008 Apr;44(4):307-14.

표 1. 본 연구에서 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머와 중합효소 연쇄반응(PCR)의 조건

Bacterial species	Target gene and PCR assay	primers name(Sequence)	PCR conditions			cycles	Product size(bp)	References
			denaturation (°C/sec)	Annealing (°C/sec)	Extension (°C/sec)			
<i>Rickettsia</i> genus	<i>scaI</i> N-PCR(1st primer)	PanR-scaI-6545F (5'-ATTCGTAACAGATTAGATRC-3') PanR-scaI-7360R (5'-TTATAGGATGTTTTCCGGTTG-3')	94/60	51/60	72/60	35	815	designed
	<i>scaI</i> N-PCR(2nd primer)	PanR_scaI-6647F (5'-TGGATGCGTGSTATGTACG-3') PanR_scaI-7354R (5'-GATGTTTTCCGGTTGYTTCGG-3')	94/30	55/30	72/45	30	707	designed
	<i>rompA</i> N-PCR(1st primer)	R190.70F (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAAA-3') RR190.701R (5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3')	94/30	50/30	72/60	40	634	Eremeeva et al., 2006
	<i>rompA</i> N-PCR(2nd primer)	R190.70F (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAAA-3') RR190.602R (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3')	94/30 94/30	50/30 54/30	72/30 72/30	5 40	535	Eremeeva et al., 2006
<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>56 kDa</i> N-PCR(1st primer)	Provided INNOPLExTM TSUTSU detectionkit (Intron)	94/30	58/30	72/40	40	1000	TSUTSU detection kit (Intron)
	<i>56 kDa</i> N-PCR(2nd primer)	Provided INNOPLExTM TSUTSU detectionkit (Intron)	94/30	58/30	72/40	30	475	TSUTSU detection kit (Intron))
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>ankA</i> N-PCR(1st primer)	ANK-F1 (5'-GAAGAAATTACAACCTCCTGAAG-3') ANK-R1 (5'-CAGCCAGATGCAGTAACGTG-3')	95/30	53/30	72/60	35	705	designed
	<i>ankA</i> N-PCR(2nd primer)	ANK-F2 (5'-TTGACCGCTGAAGCACTAAC-3') ANK-R2 (5'-ACCATTTGCTTCTTGAGGAG-3')	95/30 95/30	52/30 54/30	72/60 72/60	5 25	664	designed
	<i>16S rRNA</i> N-PCR(1st primer)	AE1-F (5'-AAGCTTAACACATGCAAGTCGAA-3') AE1-R (5'-AGTCACTGACCCAACCTTAAATG-3')	94/60	59/60	72/120	40	926	Kim et al., 2014
	<i>16S rRNA</i> N-PCR(2nd primer)	EE-3 (5'-GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC-3') EE-4 (5'-CCCTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3')	94/30 94/30	54/30 56/30	72/60 72/60	5 30	390	Kim et al., 2006
<i>Ehrlichia</i> species	<i>sodB</i> real time PCR	Ehr-sodB-F2 (5'-TTTAATAATGCTGGTCAARTATGGAATCAT-3') Ehr-sodB-R2 (5'-AAGCRTGYTCCCATACATCCATAG-3')	94/10	57/15	72/10	45	304	Quorollo et al., 2014

bp: base pair

°C/sec: degree Celsius per seconds (time)

표 2. 2018년 4월-11월 제주도와 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 포획한 설치류와 털진드기의 월별 분포

Month	Jeju Island(2018)				Jeollabuk-do(2019)			
	Captured No. of rodents	Species of rodents	Captured No. of mites	Examined No. of mite pools	Captured No. of rodents	Species of rodents	Captured No. of mites	Examined No. of mite pools
Apr.	20		253	14	5	2(Clethrionomys rufocanus), 3(Apodemus agrarius)	722	14
May.	7	Apodemus agrarius	7	3	10	2(Clethrionomys rufocanus), 3(Apodemus agrarius)	38	8
Jun.	8		37	6	10		6	6
Jul.	3		34	3	1		1	1
Aug.	2		7	2	7	Apodemus agrarius	35	7
Sep.	3		25	3	11		37	7
Oct.	6		4	1				
Nov.	7		317	11				
Total	56		684	43	44		839	43

표 3. 2018년 4월-11월 제주지역 설치류에서 채집한 털진드기를 대상으로 수행한 PCR 결과

Month	Capture d no. of rodents	Capture d no. of mites	Examined no. of mite pools	PCR positivity	<i>Rickettsia</i> genus		<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>Ehrlichia</i> species
					<i>sca1</i> ^a N-PCR	<i>rompA</i> ^b N-PCR	56 kDa ^c N-PCR(Intron)	<i>ankA</i> ^d N-PCR	16S rRNA ^e N-PCR	<i>sodB</i> ^f real time PCR
Apr.	20	253	14	No of total	0	0	0	0	0	0
May.	7	7	3	No of total	0	0	0	0	0	0
Jun.	8	37	6	No of total	0	0	9	0	0	0
Jul.	3	34	3	No of total	0	0	0	0	0	0
Aug.	2	7	2	No of total	0	0	0	0	0	0
Sep.	3	25	3	No of total	0	0	0	0	0	0
Oct.	6	4	1	No of total	0	0	0	0	0	0
Nov.	7	317	11	No of total	0	0	0	0	0	0
Total	56	684	43	Positive No. (%)	0(0%)	0(0%)	9(1.3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

^a Surface cell antigen type 1 gene, ^b Outer membrane protein A gene, ^c *O. tsutsugamushi* specific antigen gene,

^d Ankyrin-related protein gene, ^e 16S ribosomal RNA, ^f Superoxide dismutase protein B gene.

표 4. 2019년 4월-9월 전라북도 지역 설치류에서 채집한 털진드기를 대상으로 수행한 PCR 결과

Month	Capture d No. of rodents	Capture d No. of mites	Examine d No. of mite pools	PCR positivity	<i>Rickettsia</i> genus		<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>Ehrlichia</i> species
					<i>sca1a</i> N-PCR	<i>rompAb</i> N-PCR	56 kDa ^c N-PCR(Intron)	<i>ankAd</i> N-PCR	16S rRNA ^e N-PCR	<i>sodB</i> ^f real time PCR
Apr.	5	722	14	No of total	0	0	0	0	0	0
May.	10	38	8	No of total	0	0	1	0	0	0
Jun.	10	6	6	No of total	0	0	0	0	0	0
Jul.	1	1	1	No of total	0	0	0	0	0	0
Aug.	7	35	7	No of total	0	0	0	0	0	0
Sep.	11	37	7	No of total	0	0	1	0	0	0
Total	44	839	43	Positive No. (%)	0(0%)	0(0%)	2(0.23%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

^a Surface cell antigen type 1 gene, ^b Outer membrane protein A gene, ^c *O. tsutsugamushi* specific antigen gene,

^d Ankyrin-related protein gene, ^e 16S ribosomal RNA, ^f Superoxide dismutase protein B gene.

표 5. 2018년 제주와 2019년 전라북도의 털진드기에서 *O. tsutsugamushi*를 표적으로 하는 56 kDa nested PCR을 수행한 후 양성 pool에 대한 염기서열 분석결과

Sam- ple Name	Capture d year, month & site	Strain	Sequence(<i>O.tsutsugamushi</i> 56 kDa-F/R)	Blast result	Identit- y(%)	Accessi- on
18-J J-6- mite P2	Jeju, 06, 2018	Boryong	TATTGCGGATCGTGACTTTGGGATTGATATTCCTAAC ATACCTCAGGCGCAAGCGCAAGCTGCACAGCCTCCGC TTAATGATCAGAAGCGTGCTGCAGCTAGGATCGCTTG GTTAAAGAATTGTGCTGGTATTGACTATATGGTGAA GGATCCTAATAATCCTGGGCATATGATGGTAAATCCG GTGTTGTTAAATATTCACAGGGCAACCCTAATCCTG TTGGACAGCCACCGCAGCGAGCAAATCAGCCTGCAAAA TTTTGCGATACATAACCATGAGCAATGGAGGAGTTT GGTAGTTGGTCTTGCTGCATTATCAAATGCTAATAA ACCTAGCGCTTCTCCTGTCAAAGTTTTGAGTGACAAA ATTATTCAGATATATAGTGATATAAAGCCATTTGCT GATATAGCTGGTATTAATGTTCTGATACTGGTTTG CCTAATAT	<i>O.</i> <i>tsutsugam</i> <i>ushi</i> Boryong complete genome	99.55%	AM4944 75.1
18-J J-6- mite P4	Jeju, 06, 2018	Boryong	ATAGGCCCTAATAGTATTGCGGATCGTGACTTTGTGA TTGATATTCCTAACATAACCTCAGGCGCAAGCGCAAGC TGCACAGCCTCCGCTTAATGATCAGAAGCGTGCTGCA GCTAGGATCGCTTGGTTAAAGAATTGTGCTGGTATT GACTATATGGTGAAGGATCCTAATAATCCTGGGCAT ATGATGGTAAATCCGGTGTGTTAAATATTCACAG GGCAACCCTAATCCTGTTGGACAGCCACCGCAGCGAG CAAATCAGCCTGCAAAATTTTGCGATACATAACCATGA GCAATGGAGGAGTTTGGTAGTTGGTCTTGCTGCATTA TCAAATGCTAATAAACCTAGCGCTTCTCCTGTCAAAG TTTTGAGTGACAAAATTATTCAGATATATAGTGATA TAAAGCCATTTGCTGATATAGCTGGTATTAATGTTT CTGATACTGGTTTGCCTAAT	<i>O.</i> <i>tsutsugam</i> <i>ushi</i> Boryong complete genome	99.33%	AM4944 75.1
2019 -05 -JB -mit e-P 2	Jeonbuk , 05, 2019	Gilliam	AAGTATTGCGGATCGTGATGTGGGGTTGATACTGA TATTCTTGCTCAAGCTGCTGCTGGGCAACCACAGCTT ACTGTTGAGCAGCGGCTGCAGATAGGATTGCTTGGT TGAAGAATTATGCTGGTATTGACTATATGGTCCCAG ATCCTCAGAATCCTAATGCTAGAGTTATAAAATCCTG TATTGTTAAATATTACTCAAGGGCCACCTAATGTAC AGCCTAGACCTCGGCAAAATCTTGACATACTTGACCA TGGTCAGTGGAGACATTTGGTAGTTGGTGTACTGCA TTGTCACATGCTAATAAACCTAGCGTTACTCCTGTCA AAGTATTAAGTGACAAAATTACTAAGATATATAGTG ATATAAAGCCATTTGCTGATATAGCTGGTATTGATG TTCTGATACTGGTTTGCCTAATAG	Orientia <i>tsutsugam</i> <i>ushi</i> isolate Taiwan 56 kDa type-speci- fic antigen gene, complete cds	99.06%	DQ4852 89.1

2019 -09 -JB -Mi te-P 6	Jeonbuk , 09, 2019 Boryong	Boryong	AGTATTGCGGATCGTGACTTTGGGATTGATATTCCT AACATACCTCAGGGCGCAAGCGCAAGCTGCACAGCCTC CGCTTAATGATCAGAAGCGTGCTGCAGCTAGGATCGC TTGGTTAAAGAATTGTGCTGGTATTGACTATATGGT GAAGGATCCTAATAATCCTGGGCATATGATGGTAAA TCCGGTGTGTTAAATATTCCACAGGGCAACCCTAAT CCTGTTGGACAGCCACCGCAGCGAGCAAATCAGCCTG CAAATTTTGGGATACATAACCATGAGCAATGGAGGA GTTTGGTAGTTGGTCTTGCTGCATTATCAAATGCTA ATAAACCTAGCGCTTCTCCTGTCAAAGTTTTGAGTGA CAAAATTATTAGATATATAGTGATATAAAGCCATT TGCTGATATAGCTGGTATTAATGTTCTGATACTGG TTTGCCTAATAGTGCATCTAGATGAA	O. tsutsugam ushi Boryong complete genome	99.56%	AM4944 75.1
--	-------------------------------------	---------	---	--	--------	----------------

그림 1. 본 연구에서 수집한 설치류의 지리적 위치.
수집한 지역을 빨간색으로 표시하였다.
(Jeonbuk Jinan; 35° 39' 50.72"N 127° 24' 56.62"E,
Jeju seogwipo; 33°15'01.9"N 126°32'47.1"E)



그림 2. 2018년 4월-11월 제주지역에서 포획한 설치류에서 채집한 털진드기에서 확인한 *O. tsutsugamushi* 56 kDa 유전자 서열과 GeneBank에서 얻은 다양한 *O. tsutsugamushi* 종들의 56 kDa 유전자 서열을 토대로 제작된 phylogenetic tree

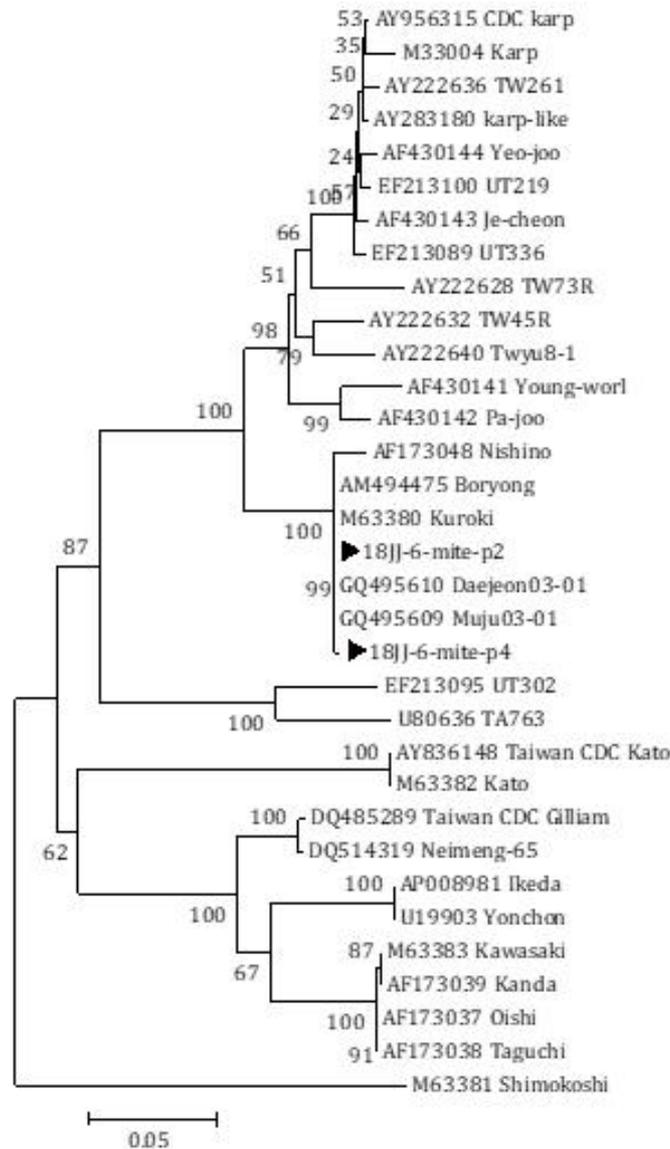


그림 3. 2019년 4월-9월 전라북도 지역에서 포획한 설치류에서 채집한 털진드기에
 서 확인한 *O. tsutsugamushi* 56 kDa 유전자 서열과 GeneBank에서 얻은 다양한
O. tsutsugamushi 종들의 56 kDa 유전자 서열을 토대로 제작된 phylogenetic
 tree

