

博士學位論文

제주지역 참진드기(Acari: Ixodidae)
분포조사 및 *Haemaphysalis* 종에
대한 *Rickettsia* 병원체 동정과
계통발생학적 분석

濟州大學校 大學院

食品工學科

文 奉 璿

2010年 02月

제주지역 참진드기(Acari: Ixodidae)
분포조사 및 *Haemaphysalis* 종에
대한 *Rickettsia* 병원체 동정과
계통발생학적 분석

指導教授 高 榮 煥

文 奉 璿

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 02月

文奉璿의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 河 璿 桓 (印)

委 員 金 堯 杓 (印)

委 員 高 榮 煥 (印)

委 員 金 永 珠 (印)

委 員 申 二 鉉 (印)

濟州大學校 大學院

2010年 02月

Survey of Distribution of Ticks (Acari:
Ixodidae) and Phylogenetic Analysis
and Detection of *Rickettsia* Pathogenic
Agents in *Haemaphysalis* Species in
Jeju Island, Korea

Bong-Chun Moon

(Supervised by Professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Engineering

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

FEBRUARY, 2010

목 차

List of Figures

List of Tables

Abbreviations

Summary

I. 서 론	1
II. 연구사	5
III. 재료 및 방법	9
1. 진드기 채집	9
2. 진드기 채집 지역	10
3. 진드기 종 분류 동정	11
4. 진드기 사진 도판 제작	11
5. 진드기의 발육 단계별 및 월별 개체 변화	11
6. 진드기에서 DNA 추출	12
7. PCR에 의한 유전적 동정	13
8. <i>Anaplasma</i> 및 <i>Ehrlichia</i> 종의 유전자 검출	16
9. Cloning, 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석	17
10. Nucleotide sequence accession numbers	18
IV. 결 과	19
1. 진드기 종 분류	19
2. 진드기 종별 사진도판 제작	19
3. 진드기의 지리적 분포 현황	30

4. 작은소참진드기의 발육 단계별 및 월별 개체 변화	34
5. 진드기의 유전적 동정과 빈도	36
6. PCR에 의한 진드기 매개 병원체의 빈도와 지역적 분포	38
7. <i>Anaplasma</i> 및 <i>Ehrlichia</i> 종의 계통발생학적 분석	41
8. 진드기 DNA 추출물에서 PCR 증폭산물 확인	46
9. Cloning, 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석	51
V. 고 찰	60
VI. 요 약	68
참고문헌	70



List of Figures

- Fig. 1. Tick collection by using a dragging (A) and flagging (B)
- Fig. 2. Map of Jeju Island. Seventy-two tick collection sites indicated by black dots
- Fig. 3. *Haemaphysalis flava*, female. A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae
- Fig. 4. *Haemaphysalis flava*, male. A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae
- Fig. 5. *Haemaphysalis longicornis*, female. A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae
- Fig. 6. *Haemaphysalis longicornis*, male. A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae
- Fig. 7. *Haemaphysalis longicornis*, nymph. A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae
- Fig. 8. *Haemaphysalis longicornis*, larva. A: dorsal, B: ventral

- Fig. 9. *Haemaphysalis longicornis*, female, male, nymph and larva from right with Imm scales bar
- Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of *Haemaphysalis longicornis* tick 5.8S rRNA internal transcribed spacer 2 gene (360 bp amplicons). Lane M, 100 base pair size marker. Abbreviation of each lane is as follows: W, water control; LA, larva; NY, nymph; AM, adult male; AF, adult female.
- Fig. 11. Map of Jeju Island. Seventy-two tick collection sites indicated by black dots are classified into three areas (East, West, and North) and tick-borne pathogens identified in Jeju Island are indicated by squares.
- Fig. 12. Phylogenetic tree based on 1,406 bp sequence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species collected in Jeju Island of Korea. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of 16S rRNA gene sequences by CLUSTAL W and followed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software. The GenBank accession numbers are in parentheses.
- Fig. 13. Phylogenetic tree based on 390 bp gene sequence of *Ehrlichia chaffeensis*. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of *Anaplasma* gene sequences obtained from species-specific nested PCR assay, by CLUSTAL W and followed by the UPGMA method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software.

Fig. 14. Phylogenetic tree based on 926 bp gene sequence of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. bovis*, and *A. centrale*. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of *Anaplasma* gene sequences obtained from species-specific nested PCR assay, by CLUSTAL W and followed by the UPGMA method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software.

Fig. 15. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by *ompB*-nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder, lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the *ompB*-PCR products (407 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) of the amplified PCR products.

Fig. 16. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by *gltA*-nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder, lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the *gltA*-PCR products (330 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) on the amplified PCR products.

Fig. 17. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by 17 kDa antigen-nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder; lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the 17 kDa antigen PCR products (360 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) of the amplified PCR products.

Fig. 18. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *ompB* gene sequences (the size of about 407bp) of various rickettsial strain and PCR amplified *ompB* products from tick. Phylogram were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

Fig. 19. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *gltA* gene sequences (the size of about 330bp) of various rickettsial strain and PCR-amplified *gltA* products from tick. Phylogram were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

Fig. 20. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial 17 kDa antigen gene sequences (the size of about 360bp) of various rickettsial strain and PCR amplified 17 kDa antigen products from tick. Phylograms were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

List of Tables

- Table 1. Primer sequences of PCR primer and PCR condition of the primer set used in this study
- Table 2. The collection data of ticks at Jeju island from the year 2007 to 2008
- Table 3. Monthly occurrence to developmental stages of *Haemaphysalis longicornis* collected in Jeju island from the year 2007 to 2008
- Table 4. Prevalence of total ticks (number of pools) and tick-borne pathogens identified from the three main survey areas during the year 2007 and 2008 in Jeju Island, Korea
- Table 5. Tick number of pools by stages of collected ticks in Jeju Island from the year 2007 to 2008
- Table 6. Similarity matrix between partial *ompB* gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR *ompB* products
- Table 7. Similarity matrix between partial *gltA* gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR *gltA* products
- Table 8. Similarity matrix between partial 17 kDa antigen gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR 17 kDa antigen products

Abbreviations

PCR	polymerase chain reaction
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
DNA	dioxyribonucleic acid
HGA	human granulocytic anaplasmosis
HME	human monocytic ehrlichiosis
IFA	indirect immuno fluorescence assay
EtBr	ethidium bromide
CDC	center for disease control on prevention
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
MIR	minimum infection rate
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SFG	spotted fever group
RFLP	restriction fragment length polymorphism
<i>ompA</i>	outer membrane proteins A
<i>ompB</i>	outer membrane proteins B
PBS	phosphate buffer saline

Summary

This study investigates the geographical distribution and the presence of nucleic acids of various rickettsial agents of ticks collected in Jeju Island from the year 2007 to 2008. A total of 3,089 ticks (3,086 of *Haemaphysalis longicornis* and three of *Haemaphysalis flava*) was collected at 72 sites by dragging and flagging method.

By developmental stage, *H. longicornis* adult and nymph were collected from April to August. On the contrast, *H. longicornis* larva was collected only on August. By monthly distribution, The number of *H. longicornis* adult increased steadily from April to August but there was no difference by monthly except for May and June. *H. longicornis* nymph collected from April to August and peaked on May. *H. longicornis* larva was collected and started to appear on August.

A total of 1,395 *H. longicornis* tick collected from Jeju Island were examined by 16S rRNA gene-based nested PCR for the presence of infectious *Anaplasma* and *Ehrlichia* species. Template DNAs to detect the tick-borne pathogens were prepared from a total 506 tick pools. Eight *Anaplasma* and six *Ehrlichia* species by 16S rRNA gene PCR and sequencing analysis were identified. *A. phagocytophilum* was most prevalent (27, 1.9%) by nested PCR, followed by *A. bovis* (5, 0.4%). *E. chaffensis* (4, 0.2%), and *A. centrale* (1, 0.1%). In the phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences, eight species of *Anaplasma* group (>99.4% homology) and six species of *Ehrlichia* group (>99.5% homology) were close to deposited *A. marginale* strains (AF309867, AF414874, and FJ226454) and *Ehrlichia* sp. (DQ324547), respectively.

Three *Anaplasma* species; *A. phagocytophilum* (group A), *A. bovis* (group B) and *A. centrale* (group C), and one *Ehrlichia* species; *E. chaffensis* (group D) were determined by comparing with *Anaplasma* and *Ehrlichia* related sequences. First, twenty-seven *A. phagocytophilum* clones belong to group A were divided into 7 genotypes.

The sequence similarity among genotypes A1 to A4 was very high (>99.6%). Genotype B2 was close to *A. bovis* from Korea (99.7%). Genotype D1 was close to known *E. chaffcensis* strains (M73222, AF147752, and AY350424) and their similarity value was 99.7%. In conclusion, *A. phagocytophilum* identified in predominant *H. longicornis* ticks were ubiquitous throughout the Jeju Island. The various tick-mediated infectious rickettsia have been found through DNA sequence and phylogenetic analysis.

A total of 1,584 ticks were examined the presence of nucleic acids of various rickettsial agents in ticks collected in Jeju Island, Korea from the year 2007 to 2008, through the nested polymerase chain reaction (PCR) and sequencing analysis of partial citrate synthase (*gltA*), *Rickettsia* outer membrane protein B (*ompB*), and 17 kDa antigen genes.

Examination of the 1,584 ticks showed that the species distribution of *H. longicornis* was 99.81% (n=1,581) and *H. flava* was 0.91% (n=3). A total of 224 out of 250 pools containing one to 15 ticks were found positive in *ompB*-PCR assay. From the positive samples, 26 were analysed by *gltA*- and 17 kDa antigen PCR assays.

The nucleotide sequences of the *ompB*- and *gltA*-PCR products showed a high degree of similarity to those of the *R. japonica* (98.7~99.2% and 98.7~99.3%, n=25) and *R. monacensis* (99% and 99.7%, n=1).

However, analysis of the nucleotide sequences of the 17 kDa antigen PCR amplicons showed that the sequences of the 25 PCR amplicons are more close to *R. marmionii* (99.4~100%) than *R. japonica* (98.6~99.1%).

These findings suggest that various rickettsial diseases could be transmitted via the bite of tick vectors in Jeju island, Korea.

I. 서론

진드기목은 대부분 자유생활을 하고 있으나 그 중 일부가 기생생활을 하면서 바이러스성(viral), 리케치아성(rickettsial), 세균성(bacterial) 질병들을 매개하고 있다. 또한 형태적으로나 생활사에서 곤충과는 다른 면을 가지고 있으면서 분포 및 서식처의 다양성과 생활 습성에 대한 적응 등 여러 요인으로 인하여 복잡한 형태적 변화를 가져왔다. 따라서 진드기에 대한 분류는 대단히 복잡하고 어려워 특히 우리나라의 경우 현재까지도 분명한 체계가 정립되어 있지 않다.

모낭진드기(*Demodex* sp.)를 제외한 모든 진드기는 마디가 없는 주머니 모양으로 두흉부와 복부의 구별이 없고 구부와 동체부로 구분된다. 대부분의 종은 배면에 순판을 가지고 있는데 순판의 모양과 크기에 따라 커다란 차이를 보이며 배판이나 복판의 모양과 극모와 표피의 표면 및 체표 등이 분류상 중요한 특징이 되고 있다.

진드기는 세계적으로 널리 분포하고 있으며 서식처의 다양성과 각기 다른 생활 습성을 가지며 발달 단계는 유충(larva) 시기를 지나 자충(nymph) 시기를 거쳐 성충(adult)이 된다.

진드기류의 생활사는 알(egg) - 유충(larva) - 자충(nymph) - 성충(adult)의 단계로 이루어지고 있으며, 불완전 변태를 하는데 곤충의 경우와는 다른 점이 많다. 알에서 부화하면 3쌍의 다리를 가진 유충이 되고, 1령기를 거치면서 탈피하면 자충이 된다. 자충의 다리 수는 성체와 동일하나 성체와 다른 점은 몸이 작고 생식구가 갖추어지지 않았으며 강모의 수가 적다는 점이다. 그리고 성체는 일반적으로 암(female), 수(male)를 구별하는 것은 외형상으로 용이하다.

진드기의 서식장소나 흡혈성은 다양하나 대부분의 진드기류는 몸체가 작고 이동성이 빈약하므로 유충에서 성충까지 동일한 장소에 서식하며 먹이를 취하고 있다.

분류학상 진드기는 절지동물문(phylum Arthropoda)의 거미강에 속하고 있지만 진드기 아강(subclass)으로 간주하는 경향이 강하다. 한편 진드기아강은 연구가에 따라서 Parasitiformes 목과 Acariformes 목으로 나누기도 하였다(1, 2).

한국동물분류학회 한국동물명집((1997)에 의하면 우리나라에 서식 분포하고 있는 큰진드기 종류는 공주진드기과의 *Argas* 속 3종(*Argas boueti* Rouband & Colas-Belcour, 1933; *A. japonicus* Yamaguti et. al., 1968; *A. vespertilionis* Latreille, 1802), 참진드기과 25종으로 *Amblyomma* 속 1종(*Amblyomma testudinarium* Koch, 1844), *Boophilus* 속 2종 (*Boophilus annulatus* Say, 1821; *B. microplus* Canestrini, 1887), *Dermacentor* 속 3종 (*Dermacentor marginatus* Schulze, *D. reticulatus* Fabricius, 1794; *D. Silvarum* Olenev, 1931), *Haemaphysalis* 속 8종(*Haemaphysalis campanulata* Warburton, 1908; *H. concinna* Koch, 1844; *H. cornigera* Neumann, 1897; *H. flava* Neumann, 1897; *H. japonensis* Warburton, 1908; *H. japonica douglasi* Nutt & Warburton, 1908; *H. kutchensis* Hoogstral & Trapdo, 1963; *H. longicornis* Neumann, 1901), *Ixodes* 속 10종(*Ixodes acuinatus* Neumann, 1902; *I. cavipalpus* Nutall & Warburton; *I. angustus* Neumann, 1902; *I. granulatus* Supino; *I. nipponensis* Kitaoka & Saito, 1967; *I. ovatus* Neumann, 1899; *I. persulcatus* Schulze, 1930; *I. signatus* Birula, 1895; *I. turdus* Nakatsuji, 1942; *I. vespertilionis* Koch, 1844) *Rhipicephalus* 속 1종(*Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806) 등 전체 2과 7속 28종으로 확인되고 있다.

자연계에 존재하는 진드기는 대부분 자유생활을 하나 일부 종이 사람과 가축의 체액을 섭취하는 기생성이어서 질병매개에 중요한 역할을 하며, 또한 식품이나 먼지 등에 서식하며 식품 오염원으로 천식과 아토피 등의 알레르기원으로 작용하여 보건 분야에 중요하게 취급되고 있다. 진드기에 의한 피해 중 식품에 의한 피해로서는 직접적으로 식품 자체에 문제를 야기하는 것 보다는 식품에 진드기가 기생하면서 식품을 섭취하는 과정에 경구적으로 숙주 체내에 침입하여 피해를 주고 있다(3).

국내 부산지역 10개 시장을 대상으로 판매하고 있는 식료품 내 진드기 분포 조사를 실시하여 보고한 바에 의하면 12종의 식품 600건 중 137건에서 진드기 출현을 확인 하였으며, 확인된 진드기 종은 총 6종 이었다(3).

한국에서의 진드기 관련 연구로서 생태학적인 분야와 분류학적인 분야에 대한 연구 뿐만 아니라(4, 5) 최근에는 진드기 매개성 질환에 대한 여러 가지 진단법의 개발로 인하여 진드기 매개 병원체 연구도 활발하게 이루어지고 있으며(6) 특히 제주지역에 대한 진드기 매개성 병원체에 대한 조사도 이루어지고 있으나, 여전히 부족한 상태라고 할 수가 있다.

리켓치아는 그람음성 구간균으로 편성 세포 내 기생성으로 생세포의 세포질 내에서 증식하며(7), 3중 세포벽은 inner cytoplasmic membrane, periplasmic space, outer membrane으로 구성된다(8, 9, 10). 또한 항원과 표현형을 기본으로 typhus group (티푸스균), spotted fever group(홍반열균), scrub typhus group(쯔쯔가무시균) 등 3개의 군으로 구분된다(11). 최근에는 16S rRNA, genus-common 17 kDa antigen, citrate synthase (*gltA*), rickettsial outer membrane protein A (*ompA*)와 B(*ompB*) 유전자를 사용한 polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), 염기서열 분석 기술을 통해 리켓치아를 구분할 수가 있다(9, 12, 13, 14, 15). 리켓치아는 자연에서 이, 진드기, 벼룩 등의 흡혈성 절지동물에 기생하고 이들을 매개로 사람에게 전파되어 질환을 일으키며(16), 주요 임상증세는 일반적으로 절지동물에게 물리고 나서 6~10일 후에 나타나기 시작하며, 39.5~40℃의 고열과 두통, 오한, 근육통 및 발진 등 전신증상을 보인다(16, 17). 또한 병리학적으로 리켓치아 증식은 모세혈관의 내피 세포에서 일어나며 이 세포 내에서 혈관염을 일으킨다. 이 질병은 가볍거나 심각할 수 있지만 보통 2~3주간 지속된다(18). 인간이나 애완동물들에서 진드기 매개 리켓치아 질병의 대표적인 증상인 아나플라즈마시스(anaplasmosis)와 엘리키오시스(ehrlichiosis)는 전 세계에 확산되어 있다. 이러한 질병의 원인균들은 세포(혈액) 내 기생생활을 통해 존속하며, 크게 *Anaplasma* 유전종 군(*A. phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*)과 *Ehrlichia* 유전종 군(*E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*)으로 구분된다. 이들 균종들은 주로 인간이나 동물에게 급성 발열증(acute febrile disease)과 같은 병원성 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다(19, 20, 21, 22, 23). 특히, 사람 과립구성 아나플라즈마증(human granulocytic anaplasmosis, HGA)과 사람 단핵구성 에를리히증(human monocytic ehrlichiosis, HME)의 원인체인 *A. phagocytophilum*과 *E. chaffeensis*는 미국과 유럽 등에서 많이 보고되고 있다(24, 25). 또한 중국이나 일본 그리고 한국과 같은 아시아 지역에서도 *Anaplasma*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* 종과 같은 세포 내 기생세균들이 빈번하게 보고되고 있는 실정이며, 이들 병원체들의 분포는 아시아 여러 나라로부터 진드기나 설치류에서 하나의 병원체 감염 또는 혼합된 병원체들이 동시감염을 일으키는 것으로 알려져 있다(26, 27, 28, 29, 30).

국내에서는 2002년에 환자로부터 indirect immunofluorescence assay (IFA), Western blotting, TaqMan real-time PCR 방법 등으로 *A. phagocytophilum*과 *E. chaffeensis*를 처음 보고하였다(31). 현재, *Haemaphysalis*와 *Ixodes* 진드기 속, 애완동물, 반추동물, 야생동물 등에서 세포 내 기생세균들의 연구가 활발히 진행되고 있다(32, 33, 34, 35). 한국에서는 *H. longicornis*가 빈번하게 분포하고 TaqMan PCR과 종 특이적 PCR 방법에 의해 이들 진드기에서 *A. platys*, *E. chaffeensis*, *Rickettsia* sp.와 같은 몇몇 병원체들이 보고되고 있다(28). 그러나 한국의 내륙지역과 떨어져 있는 제주도 지역에서 진드기들의 분포와 진드기 매개 병원체들의 연구는 거의 보고되어 있지 않은 실정이다.

최근, 리케치아 병원체들을 검출하기 위한 진단방법들은 빠르게 변화되고 있다. 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 분자적 방법들과 1차 PCR 산물을 주형 DNA로 사용하는 nested PCR 방법들이 보고되고 있다(23, 29, 35). 그러나 16S rRNA 유전자 PCR과 관련하여 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 종들에 의한 PCR 산물들은 진드기나 동물들로부터 분리된 DNA에서 쉽게 증폭되지 못하고 있다.

작은소참진드기(*H. longicornis*)는 전국적으로 분포하며 발생밀도가 가장 높은 종으로 보고되고 있다. 개피참진드기(*H. flava*)는 국내에 분포하고 있으며 교상에 대한 피해 보고가 있다. 이러한 진드기는 리케치아의 주요 숙주이면서 병원소 역할을 하기 때문에 리케치아 감염증과 매우 높은 관련이 있다(19).

이 연구의 목적은 제주지역에서 채집된 진드기에 대한 종 분류 동정 후 사진 도판 제작 기록하고 진드기 유래 병원체들의 유전적 방법 동정 및 계통발생학적인 분석을 통하여 진드기 매개 리케치아 질환 병원체의 감염 여부를 확인한 후에 국내 및 국외에 보고되고 있는 병원체들의 유전형들과 비교 분석하였다.

II. 연구사

진드기목은 대부분 자유생활을 하고 있으며 그 중 일부는 기생생활을 하면서 여러 가지 질병들을 매개하고 있는데 현재 지구상에는 4만여 종이 보고되고 있지만 실제적으로는 대략 50만여 종으로 추산하고 있다. 진드기의 생활사는 불완전변태를 하며 알에서 부화하면 다리가 3쌍을 가진 유충(larva), 4쌍의 다리를 가진 자충(nymph), 성충(adult)의 단계를 거친다.

참진드기는 hard tick이라고 부르며 전체 발육기간이 일 년 이상이 걸리는데, 암컷은 흡혈 후 지상으로 떨어진 다음 흙 속 또는 돌이나 나무뿌리 등에 숨어서 알이 성숙될 때까지 수 주간 기다린다. 반면에 줄진드기(mites)는 전체 발육기간이 2~3주 또는 수개월이 소요된다. 진드기는 전 세계적으로 분포하고 있으나 현재까지도 분명한 개체 정립이 되지 않고 있어 국내에 서식하고 있는 진드기의 분류에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이며, 제주지역에 대한 조사는 부분적으로 이루어지고 있을 뿐 전반적인 분포 현황은 아직까지도 분명하게 조사된 바가 없다(36).

제주지역에서 채집 확인된 종으로 참진드기과에 꼬리소진드기(*Boophilus microplus* Canestrini, 1887) 종은 한국, 미국, 호주, 일본, 인도네시아, 필리핀 등에 분포하며 국내에서도 전국적으로 다수 분포되어 있고 단일 숙주성이다. 숫놈은 2.0-2.5mm 정도의 작은 몸으로 치열은 4/4이고 항문돌기와 부속돌기가 크고 미부가 삼각형으로 돌출하였다. 암놈은 수놈에 비하여 대단히 크며 성장을 하면 검붉은 색을 띠게 된다. 제주지역을 비롯한 방목지에서 소 1두 당 1,000마리 정도 기생한다고 보고한 바가 있다(4).

작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1897) 종의 분포지역은 한국, 일본, 호주, 뉴질랜드, 인도 등으로 전국적으로 분포하고 있다. 숫놈은 배면 전체에 배판이 있고 구기는 몸의 앞쪽에 위치하고 눈은 없다. 암놈은 검붉은 색을 나타내며 몸의 후부에 화체를 이루었다. *H. campanulata* (Warburton, 1908) 종은 한국, 중국, 몽고, 일본 등지에 분포하고 있다. *Ixodes persulcatus* (Schulz, 1930) 종은 한국과 일본에 분포하며 수놈은 측지가 넓게 퍼졌으며 강도가 비교적 많고 내·외측 돌기가 있다. 암놈은 좌우 측지가 내측으로 활동모양을 하고 있고 항문구는 말편자 모양으로 뚜렷하고 생식판구도 뚜렷하다.

I. vespertilionis(Koch, 1844) 종은 한국, 일본, 유럽, 아프리카 등에 분포하고 수놈은 촉지가 비교적 등글고 짧으며 비교적 기다란 강모가 많다. 암놈은 촉지가 비교적 가늘고 몸통에는 짧은 강모가 밀생하여 있다(37).

한국산 진드기에 대한 연구 보고에 의하면 *H. bispinosa* 종은 전국적으로 분포하며 *H. concinna*와 *I. ricinus* 종은 북한 지역에, *I. acuminatus* 종은 중부지방을 중심으로, *B. decoloratus* 종은 남해 연안지역에 분포하고 있다고 하였다(33). 또한 전라도 도서지역에서 *H. flava* 종을 (34), *Palpoboophilus minningi* 종은 제주에서 채집되었다고 보고하였다(38).

한국에 서식하는 진드기에 대한 분류학적 조사연구에 의하면 과천지역에서 채집된 진드기에서 *H. flava* Neumann(1897) 종의 표본을 제작하여 보고하였고, 또한 제주지역의 소와 말에서, 서울지역 소에서 채집한 진드기에서 *H. longicornis* Neumann(1901) 종의 표본을 제작하여 채집 확인 하였다(39, 40).

진드기는 사람과 가축에 진드기 매개성 질병을 전파함으로써 직간접으로 피해를 주고 있는데 주혈원충성, 리켓치아성, 세균성 등의 질병을 유발시키고 있다(41).

진드기에 의해 매개되는 질병으로 Lyme borreliosis 및 ehrlichiosis 질병이 대두되면서 라임병(Lyme disease)은 1975년 미국의 라임지방에서 환자가 다수 발생하였다고 보고된 이후 1984년에 진드기에서 원인균 분리에 성공하였다(42).

Ehrlichiosis는 1935년 알제리 지방의 개에서 리켓치아에 의한 감염증으로 최초의 환자 발생 보고가 있었고(43), 1994년 사람에서도 최초 환자 발생보고가 있었다(44). 이러한 질병이 확인된 이후 미국에서는 가장 높은 발생 빈도를 나타내었고, 유럽 및 아시아까지 질병 발생이 보고되고 있다(45, 46, 47, 48, 49). 라임병은 감염된 *Ixodes* 종 진드기 자교에 의하여 전파되는데(50, 51) 매개 진드기인 *I. ricinus* 종 및 *I. persulcaus*, *I. nipponensis* 종은 국내에서도 확인되었고(52, 53, 54), 또한 1992년에 *I. persulcatus* 종에서 라임병균이 분리되어 국내에서도 질병이 발생할 가능성이 있음이 알려졌다(55, 56).

한국과 인접한 일본에서도 야생 설치류 및 식물에서 채집된 진드기를 이용하여 진드기 매개성 감염증 중 사람에게 피해를 주는 홍반열 리켓치아를 대상으로 연구되고 있다(57).

*Ehrlichia*와 *Bartonella*에 대한 조사도 이루어지고 있으며, 미국과 유럽 등에서도 진드기 매개성 질병에 대한 역학조사를 주기적으로 실시하고 있을 뿐만 아니라 이들 질병의 병인론, 방제 대책 등도 활발하게 추진되고 있다 (58, 59). 참진드기가 매개하는 리켓치아 감염진단은 초기에 임상적으로 찾아내는 것에 기반을 두고 있다. 따라서 리켓치아 질환에 대한 신속한 진단은 사망률과 직접적 관련이 있기 때문에 적절한 항생체 치료가 매우 중요하다. 리켓치아 질환을 신속하고 정확하게 진단하기 위해서 여러 가지 실험 방법들이 개발되고 있다(60). 리켓치아 검출방법 중 polymerase chain reaction (PCR) 이용은 감도와 특이도가 매우 높은 방법으로 알려져 있으며 대상 sample로서는 혈액, 피부 조직 등을 이용할 수가 있다(61, 62).

우리나라에서의 환자 발생 중 급성 발열성 질환증상으로는 리켓치아 질환이 가장 많이 차지하고 있다. 지금까지 국내 환자에서 원인 병원체가 분리되면서 epidemic typhus, murine typhus, scrub typhus, Q열, 그리고 Spotted fever group(SFG) 등이 확인되었다. Epidemic typhus는 *Rickettsia prowazekii*가 원인 병원체로 몸이(body louse)에 의하여 감염되며(63), 이 질병은 2차 세계대전에서 감염 환자의 10~30%가 사망하면서 커다란 피해를 나타내었다(9).

Murine typhus는 *Rickettsia typhi*가 병원체이며 들쥐(rats)가 보유 숙주로 되어 있으며, 사람에게는 다소 위험하지 않는 질병으로 인식되고 있다(10). 한국에서의 첫 환자는 1959년에 보고되었는데 감염사례 보고는 적었다(64, 65, 66, 67).

Q 열은 *Coxiella burnetii*에 의하여 발생되며 급성 혹은 만성 질환을 나타낸다. 중요한 매개체는 진드기이며 보유숙주 동물은 작은 설치류로 사람의 감염은 주로 감염된 공기로 인해 전파되고 급성 질환인 경우에는 감기와 비슷한 증상을 보이며 만성 질환은 심내막염과 같은 심각한 질환을 나타낸다. 또한 사람에게 일반적으로 감염시키는 동물로서는 소, 면양, 산양과 같은 가축이다(68, 69). 한국에서의 *C. burnetii*는 1993년에 생우유에서 분리되었다고 보고하였다(70).

Scrub typhus(쯔쯔가무시증)는 *Orientia tsutsugamushi*에 의해 야기되는 인수공통 질환으로 주로 가피(eschar)를 형성하는 것이 특징이다. 한국에서는 1951년 처음으로 환자 발생 보고가 있었으며, 그 후 1986년에는 특히 10월부터 12월 사이에 전국적으로 유행하였다(7, 19, 25, 71, 72).

Spotted fever group(SFG, 홍반열군) 리켓치아 질환은 세계적으로 분리가 되었다고 보고하고 있으며, 북미와 유럽에서는 오래전부터 알려져 왔다. 우리나라와 가까운 중국과 일본에서도 발생되고 있음이 알려져 왔지만, 한국에서의 연구결과 보고는 거의 없는 실정이다. 우리나라에서의 연구 보고로서는 1990년, 1992년, 1993년에 환자 혈청 중에서 리켓치아증 양성 보고로 혈청학적 검사와 진드기 조사에서 존재하고 있다고 추측하여 왔으나 2004년 처음으로 일본홍반열(Japanese spotted fever) 환자가 확인되었다(73). 또한, 국내에서 채집된 진드기에서 *Rickettsia japonica* DNA를 검출하여 보고한 바가 있으며, PCR 방법을 이용한 역학조사 결과를 토대로 들쥐에서 감염되었다는 보고가 있었고, 진드기로부터 병원체를 분리하였다고 보고하였다(74, 75). 홍반열군 동정과 진단에는 최근 real-time PCR 방법을 많이 사용되고 있는데 이 방법은 기존의 PCR 방법보다 민감도와 특이도가 높고 (62) 기존의 방법인 PCR 과정의 전기영동 과정이 없어서 시간이 단축되며 실시간으로 모니터링이 가능하다(60). 또한, 기존의 PCR 방법에 비하여 100-300bp 범위 내의 염기서열 결과도 얻을 수 있으며 결과 분석도 소프트웨어 사용으로 간단하다(60). 그리고 자동제어 방식을 갖추고 있으면서 복잡적이고 정량적인 정보를 얻을 수 있다는 장점 때문에 환자들의 진단에도 널리 사용되고 있다(61, 62).

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 진드기 채집

진드기 채집은 제주지역의 목초지 및 잡목 숲 등에서 2007년 6월부터 8월까지, 2008년 4월부터 8월까지 1m² flannel flag를 사용하여 dragging과 flagging 방법(Fig. 1)을 이용하여 총 3,089마리를 채집하였으며, 채집된 진드기는 종 분류 및 병원체 확인 시험 전까지 70% 알코올에 넣어 보관하였다.



Fig. 1. Tick collection by using a dragging (A) and flagging (B)

2. 진드기 채집 지역

제주도의 총 면적은 1,848.3km²이며, 위치는 동경 126도 08분~126도 58분, 북위 33도 06분~34도 00분으로, 년 평균 기온은 16.2℃이며, 평균 강수량은 제주시 지역이 872.5mm, 서귀포시 지역이 1,390.6mm이다.

지형적인 특징은 한라산을 중심으로 동서사면은 매우 완만한 경사를 이루며, 남북사면은 약간 급경사를 이루고 있다. 진드기 채집 지점은 한라산을 중심으로 3개(동부, 서부, 북부)의 조사지역으로 구분하여 목초지, 수풀, 한라산국립공원 등 72곳의 진드기 채집지점을 선정하여 진드기를 채집하였다(Fig. 2).

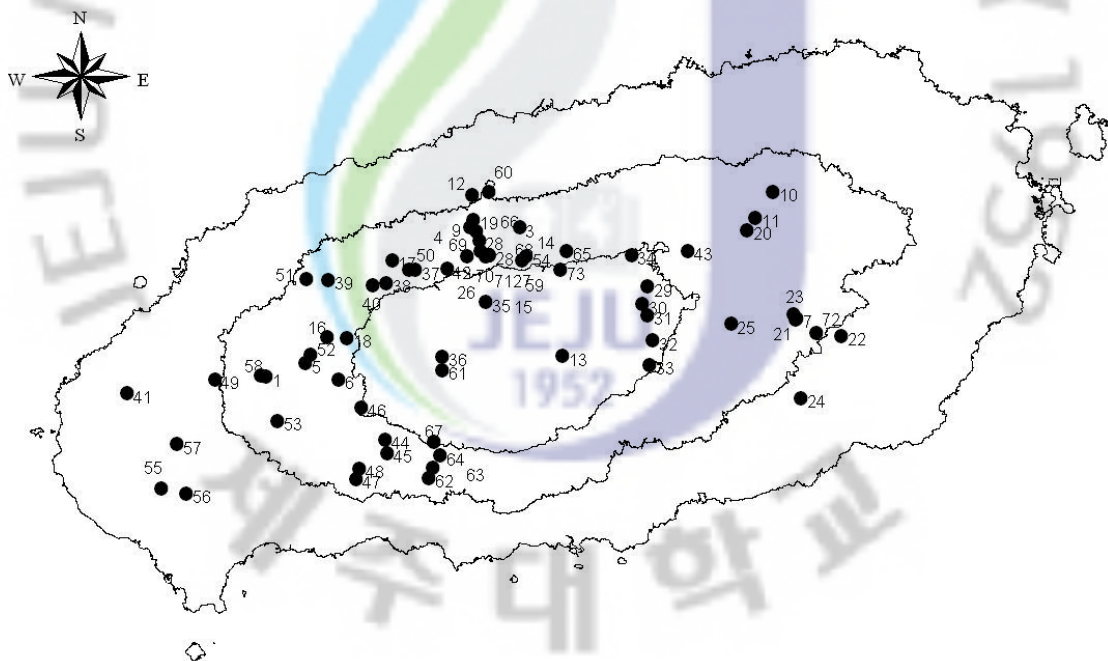


Fig. 2. Map of Jeju Island. Seventy-two tick collection sites indicated by black dots

3. 진드기 종 분류 동정

진드기의 종 분류 동정 과정은 채집된 진드기를 70% 알코올에 고정 보관한 후 10% KOH에 하루 동안 담가놓아 탈색시킨다. 이것을 멸균된 증류수에 1시간 넣은 후 다시 70% 알코올에 1시간 처리한 다음 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 알코올에 약 1시간 이상씩 처리하여 탈수과정을 거친다. 탈수된 표본을 clove oil에 1시간 이상 처리하고 슬라이드 글라스 한가운데 올려놓고 기울인 다음 xylene을 떨어뜨리며 주변에 남아있는 clove oil을 씻어낸다. 다시 표본 위에 xylene balsam을 한 방울 떨어뜨린 다음 기포가 발생하지 않도록 커버글라스를 덮은 다음 건조시켜 표본을 완성시킨다. 건조된 진드기를 실체 현미경(Science, Japan, 2005)을 이용하여 Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu Islands (28)에서 제시한 방법에 따라 분류 동정하였다.

4. 진드기 사진 도판 제작

채집된 진드기의 발육 단계별(성충, 유충, 자충)에 따른 사진 도판 제작은 현미경(Olympus, SZX9, Japan) 및 컴퓨터 프로그램(DeltaPix, DeltaPix View Pro-Image Management)을 이용하여 제작하였다.

5. 진드기의 발육 단계별 및 월별 개체 변화

채집된 진드기에서 종 분류가 완료된 작은소참진드기(*Haemaphysalis flava*) 및 개피참진드기(*Haemaphysalis longicornis*)에 대한 발육 단계별(성충, 자충, 유충)에 대한 채집 개체 비율 변화 및 월별에 따른 채집 개체 비율을 비교 조사하였다.

6. 진드기에서 DNA 추출

Anaplasma 및 ehrlichiosis 병원체를 검출하기 위하여 채집된 진드기는 70% 알코올 병에 넣고 실험실로 운반하였다. 진드기를 95% 에틸알코올로 1회 세척하고 실온에서 30분 건조시킨 후, 2 mL 미세원심튜브에 건조된 진드기와 3.2mm의 stainless steel bead (BioSpec Products, New Haven, UK)를 넣는다. 진드기로부터 전체 DNA 분리는 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)의 방법에 따랐다. 2mm 미세원심튜브에 200 μ L의 버퍼 ATL과 20 μ L의 proteinase K (20 mg/mL)를 넣고 TissueLyser II (Universal laboratory mixer-mill disruptor, Qiagen GmbH, Qiagen Strasse Hilden, Germany) 장비에 장착시키고 5분간 (30회/초당) 균질화 시킨 후, 56°C로 맞춰진 수조에서 하룻밤 정제하였다. 다음날 4 μ L의 RNase A (100 mg/mL)를 넣고 15초 동안 진탕 시킨 후, 매뉴얼 방법에 따라 유전자 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 0.8% 아가로즈 겔에서 전기영동으로 염색체 DNA를 확인하였다(data not shown).

채집된 진드기에서 홍반열군(spotted fever group) 병원체를 확인하기 위한 DNA 추출은 유충(larvae), 자충(nymph), 성충 숫컷(adults male), 성충 암컷(adults female)으로 분류하였다. 유충과 자충은 시료 당 1~15마리, 성충 암컷과 숫컷은 시료 당 1~5마리를 기준으로 전체를 250개의 시료로 나누었다 (Table 5). 분류된 각 각의 진드기를 eppendorf tube에 넣고 filter tip(Axygen Biosciences, USA)으로 중장액을 분리한 후 30 μ L의 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)를 첨가하여 부유시켰다. 이것을 Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법(10)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

7. PCR에 의한 유전적 동정

형태학적 동정에 의해 확인된 *H. longicornis* 진드기를 유전적 방법으로 평가하였다. GenBank database에서 확인된 *H. longicornis*의 5.8S rRNA internal transcribed spacer 2 유전자 염기서열을 primer 3 프로그램(version 0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)에 입력하여 프라이머(HITS2-F: 5'-GGTGCTCGAGACTCGTTTTG-3', HITS2-R: 5'-ATTCGCGGTTTACGAGAGAA-3')를 제작하였다. PCR 반응액은 1U의 HiPiTMPlus *Taq* DNA polymerase (ELPIS Biotech, Daejeon, Korea), 20 mM의 dNTPs, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.6 mM (NH₄)₂SO₄, 3.5 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20 그리고 진드기에서 추출한 2 µL의 DNA를 넣고 혼합하였다. PCR 증폭은 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, 94°C에서 5분간 1회 변성시키고 35번의 회전수로 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분간 반응시켰다. PCR 증폭산물들은 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, 0.5 µg/mL)에 염색한 후, 360 bp의 밴드패턴을 확인하였다. *H. longicornis*의 유전적 종 특이성을 확인하기 위하여 *Haemaphysalis* 속인 *H. flava*와 *Ixodes* 속인 *I. persulcatus*로 동정된 진드기 DNA를 대조군으로 확인하였다.

또한, 진드기로부터 리켓치아를 검출하기 위하여 *ompB*, *gltA*, 17 kDa antigen 유전자에 특이적으로 반응하는 primer들을 사용하였다(Table 1). 1, 2차 PCR 모두 0.5U의 *Taq* DNA polymerase, 250mM의 dNTPs, 50mM의 Tris-HCl (pH 8.3), 40mM의 KCl, 1.5mM의 MgCl₂, gel loading dye가 포함되어 있는 premixture (AccuPower PCR PreMix, Bioneer, Korea)에 한 쌍의 10pmol primer를 넣어 총 20 µL의 반응액으로 맞추어서 PCR을 수행하였다.

PCR은 Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하였으며, 1차 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 매회 94°C에서 20초간 denaturation, 47~54°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 순서로 반응시켰으며, 최후 반응은 72°C에서 3분간 반응시켜 PCR 산물의 연장을 유도하였다.

증폭횟수는 35~40 cycles로 하였다. 2차 PCR 반응의 증폭횟수는 30~35 cycles로 하였으며, 94℃에서 5분간 변성시킨 후, 94℃에서 20초간 denaturation, 47~56℃에서 20초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension 순서로 반응시켰고 최종 반응은 72℃에서 3분간 반응시켰다. 음성 대조군으로 template DNA 대신 증류수를 사용하였다. PCR 산물은 ethidium bromide(EtBr, 0.5mg/mL)를 첨가하여 제작한 1.2% agarose gel에 전기영동 하였으며, standard molecular weight marker 100bp DNA ladder(iNtRON Biotechnology, Korea)와 함께 증폭된 DNA 부분을 확인하였다.



Table 1. Primer sequences of PCR primer and PCR condition of the primer set used in this study

Target gene	Primer	Nucleotide sequence(5'→3')	Products size	PCR condition			
				Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
<i>ompB</i>	WJ77 OF	GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA	500bp	94	54	72	40
	WJ80 ^b OR	GCTTTATAACCAGCTAAACCACC					
	WJ79 SFG IF	GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA	SFG 407bp	94	56	72	35
	WJ83 TG IF	AAGATCCTTCTGATGTTGCAACA	TG 231bp				
<i>gltA</i>	WJ78 ^b SFG/TG IR	GGTTTGGCCCATATACCATAAG					
	RpCS.877p OF	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	380bp	94	52	72	35
	RpCS.1,258n ^b OR	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA					
	RpCS.896p IF	GGCTAATGAAGCAGTGATAA	330bp	94	54	72	30
17-kDa	RpCS.1,233n ^b IR	GCGACGGTATACCCATAGC					
	Rr17k. 1p OF	TTTACAAAATTCTAAAACCAT	540bp	94	47	72	35
	Rr17k. 539n ^b OR	TCAATTCACAACCTTGCCATT					
	Rr17k. 90p IF	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	360bp	94	47	72	30
	Rr17k. 417n ^b IR	TTTCCGCCTATTACAACCTGTT					

^a, *ompB*, specific outer membrane protein B gene *gltA*, *Rickettsial* citrate synthase gene 17 kDa antigen, *Rickettsia* genus-specific outer membrane antigen gene. ^b, Reverse orientation ^c, Temperature (°C)

8. *Anaplasma* 및 *Ehrlichia* 종의 유전자 검출

16S ribosomal RNA 유전자에 기초하여 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 속을 일반 PCR 방법으로 증폭하였다. 두 종을 동시에 검출할 수 있는 프라이머 세트 (AE1-F: 5'-AAGCTTAACACATGCAAGTCGAA-3' AE1-R: 5'-AGTCACTGACCCAACC TTAAATG-3')를 primer 3 프로그램으로 새롭게 제작하였다. PCR 반응액은 진드기 동정을 위해 사용된 방법과 동일하게 적용하였다. 최초 변성단계는 94°C에서 5분간 진행하였고 40번의 회전수로 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 2분, 마지막 합성단계는 72°C에서 5분간 반응시켰다. *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 속의 유전종들을 검출하기 위하여 16S rRNA PCR 증폭산물 1 µL를 주형 DNA로 사용하여 nested PCR을 실행하였다. Kim 등(10)에 의해 기술된 방법에 따라 *A. phagocytophilum* 프라이머 세트 (AP-F: 5'-GTCGAACGGATTATTCTT TATAGCTTGC-3', AP-R: 5'-CCCTTCGGTTAAGAAGGATCTA ATCTCC-3')와 *E. chaffeensis* 프라이머 세트 (EC-F: 5'-CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATA AAT-3', EC-R: 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3')를 각각 사용하였다(55). PCR을 위한 불임온도(annealing temperature)는 56°C에서 실행하였다. 양성 대조군으로 사용된 *A. phagocytophilum*과 *E. chaffeensis* Arkansas 균종의 유전자 시료는 각각 Prof. J. Stephen Dumler (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA)와 J. Dawson (CDC, Atlanta, GA, USA)으로부터 제공받았다.

9. Cloning, 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석

*Anaplasma*와 *Ehrlichia* 유전종을 동정하기 위해 세 종류(16S rRNA 유전자[1,406 bp], *A. phagocytophilum* [926 bp], *E. chaffeensis* [390 bp])의 PCR 증폭산물들을 아가로즈 겔에 전기영동하고 EtBr 용액에 염색한 후, gel extraction kit (Qiagen)의 방법에 따라 원하는 유전자를 추출하였다. 추출된 유전자들은 pGEM-T vector (Promega Co., Madison, WI, USA)에 클로닝(cloning)하고 대장균 JM109에 형질전환 시킨 후, SV Minipreps DNA purification kit (Promega)의 방법에 따라 재조합 플라스미드 (recombinant plasmid)를 분리하였다. ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 재조합 플라스미드의 T7과 SP6 프라이머를 가지고 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 Chromas software (Ver 2.33, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)와 CLUSTAL X (Ver 2.0, <http://www.clustal.org/>)를 사용하여 유전자들 간의 대립관계를 비교하였다. 병원체들 간의 유전적 관련성을 조사하기 위하여 MEGA software (<http://www.megasoftware.net/>)를 사용하여 1,000개의 bootstrap resamplings이 부여된 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)방법에 따라 계통 발생학적 지도를 작성하였다.

홍반열균(SFG) 리켓치아 유전종 확인을 위하여 2차 PCR 반응 후 양성을 나타내는 산물은 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 추출하였으며, pGEM-T Easy Vector system I (Promega, WI, USA)에 클로닝하였다. clone들이 삽입 유전자를 가지고 있음을 확인하기 위하여 plasmid DNA를 분리하고 EcoR I (New England Biolabs, MA, USA)으로 절단하여 1.2% agarose gel에서 전기영동 하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열들은 primer 부분을 제외하고 GenBank database의 다른 리켓치아의 해당 염기서열과 MegAlign software package (Windows version 7.1: DNA-STAR, WI, USA)의 multisequence alignment program을 이용하여 비교하였다. 'Neighbor-joining algorithm'과 'Jukes and Cantormatrix'를 이용하여 phylogenetic tree를 제작하고 tree의 안정성을 조사하기 위하여 bootstrap analysis를 수행하였다.

10. Nucleotide sequence accession numbers

본 연구에서 분석된 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 관련 병원체들로부터 16S rRNA 유전자 단편 및 유전종들의 증폭산물에 대한 염기서열들과 GenBank에 등록된 다음과 같은 병원체 염기서열들을 비교하였다. *Anaplasma* sp. 201-3 (EU368723, Japan), *Anaplasma* sp. NS108 (AB454076, Japan), *Anaplasma* sp. (FJ69956, China), *A. phagocytophilum* (AY055469, USA), *A. phagocytophilum* (AY055469, USA), *A. phagocytophilum* (AY082656, UK), *A. phagocytophilum* (AY527213, Sweden), *A. phagocytophilum* (AF470699, Korea), *A. phagocytophilum* (AF470701, Korea), *A. platys* (AY077619, Japan), *A. bovis* (AF470698, Korea), *A. bovis* (AB196475, Japan), *A. centrale* (AB211164, USA), *A. centrale* (AF318944, The Netherlands), *A. centrale* (AF283007, France), *A. ovis* (EF587237, China), *A. ovis* (AF318945, The Netherlands), *A. marginale* (FJ226454, Japan), *A. marginale* (AJ633048, China), *A. marginale* (AF414874, Australia), *A. marginale* (AF309867, USA), *Ehrlichia* sp. FN147 (AB196303, Japan), *Ehrlichia* sp. (DQ324547, China), *Ehrlichia* sp. HF565 (AB024928, Japan), *Ehrlichia* sp. (AB028319, Japan), *E. canis* (M73226, USA), *E. canis* (AY394465, Spain), *E. chaffeensis* (AY350424, Korea), *E. chaffeensis* 0214 (DQ402484, Korea), *E. chaffeensis* (AF147752, China), *E. chaffeensis* (M73222, USA), *Candidatus Ehrlichia shimanensis* (AB074459, Japan), *E. ewingii* (AY093440, USA), *E. ovina* (AF318946, The Netherlands). 현재 연구에서 *H. longicornis* 진드기로부터 분리 동정된 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 중에서 22개의 유일 DNA 염기서열들을 GenBank에 제출하여 accession number (GU046563-GU046565, GU064895-GU064903, GU075695-GU 075704)를 승인받았다.

IV. 결 과

1. 진드기 종 분류

조사지역에서 flagging과 dragging 방법에 의해 채집된 참진드기는 분류학적으로 절지동물문(phylum Arthropoda)의 거미강(class Arachnida), 진드기아강(subclass Acari 또는 Acarina), 단모상목(superorder Anactinotrichida), 참진드기목(order Ixodida)의 참진드기상과(superfamily Ixodoidea), 참진드기과(family Ixodidae), 피참진드기속(genus *Haemaphysalis*)에 속하는 개피참진드기(*Haemaphysalis flava*)와 작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis*) 등 2종이었다.

2. 진드기 종별 사진 도판 제작

이들 두 종에 대한 분류학적 및 생태적 특징은 다음과 같다.

***Haemaphysalis flava* Neumann, 1897** 개피참진드기(Fig. 3, 4)

Haemaphysalis flava Neumann, 1897: 333-336; Nuttall and Warburton, 1915: 408-410 (76, 77)

Haemaphysalis flava var. *armata* Neumann, 1905: 237-238 (78)

Haemaphysalis flava armata Neumann, 1911: 112; Kishida, 1922: 852 (79, 80)

Haemaphysalis i Kishida, 1922a: 852-853; Nakamura and Yajima, 1937: 148 (81, 82)

Haemaphysalis orientalis Kishida, 1934. (momentum); Keegan and Toshioka, 1957: 14 (83, 84)

Haemaphysalis doenitzi Warburton and Nuttall, 1909: 64-65; Keegan and Toshioka, 1957: 18; Saito, 1959: 193-209 (84, 85, 86)

형태적 특징

이 종류의 암컷은 눈이 없으며 화체가 있다. 촉지의 제 2절이 악체기부보다 외측으로 돌출되어 있다. 제 1각, 제 2각, 제 3각 기절의 내측돌기는 짧고 둔하고 거의 같은 크기이며 제 4기절의 내측돌기는 다른 기절의 돌기보다 약간 길다.

배판의 표면은 매끄러우며 매우 작은 구멍이 산재되어 있고 경부구와 측선구가 있다. 구하체의 끝은 둥근편이며 이의 형태가 꽃모양으로 배열되어 있고 치식은 4/4이다. 생식관은 제2, 3각 기절사이와 평행하다. 수컷의 크기는 3~4mm 정도로 치열은 5/5이며, 제 4각 기절의 내측돌기가 돌출하였고 몸의 후연은 화체가 있다. 생식관은 제 2각 기절과 평행하다. 형태적으로 사슴피참드기(*H. japonica*)와 비슷하지만, 제 4기절의 내측돌기가 다른 것들보다 길고, 수컷의 돌기는 곧고 끝이 매우 뾰족하며 길이가 거의 기절의 길이만큼 길어서 구별된다. 본 조사에서 채집된 성충 암컷과 수컷의 형태적 모습은 Fig. 3, 4에 나타내었다.

숙주동물

참고자료에 따르면 본 종은 일반적으로 개, 멧돼지, 멧토끼, 너구리, 개, 말, 고슴도치 등 다양한 야생동물에서 발견되는 것으로 알려져 있다.

분포지역

분포는 주로 한국, 일본, 인도 등이며, 우리나라의 조사지역인 제주를 비롯해 서울, 전라북도 무주, 전주 등 전국적 분포를 하고 있으나 발생밀도는 높지 않는 것으로 알려지고 있다.

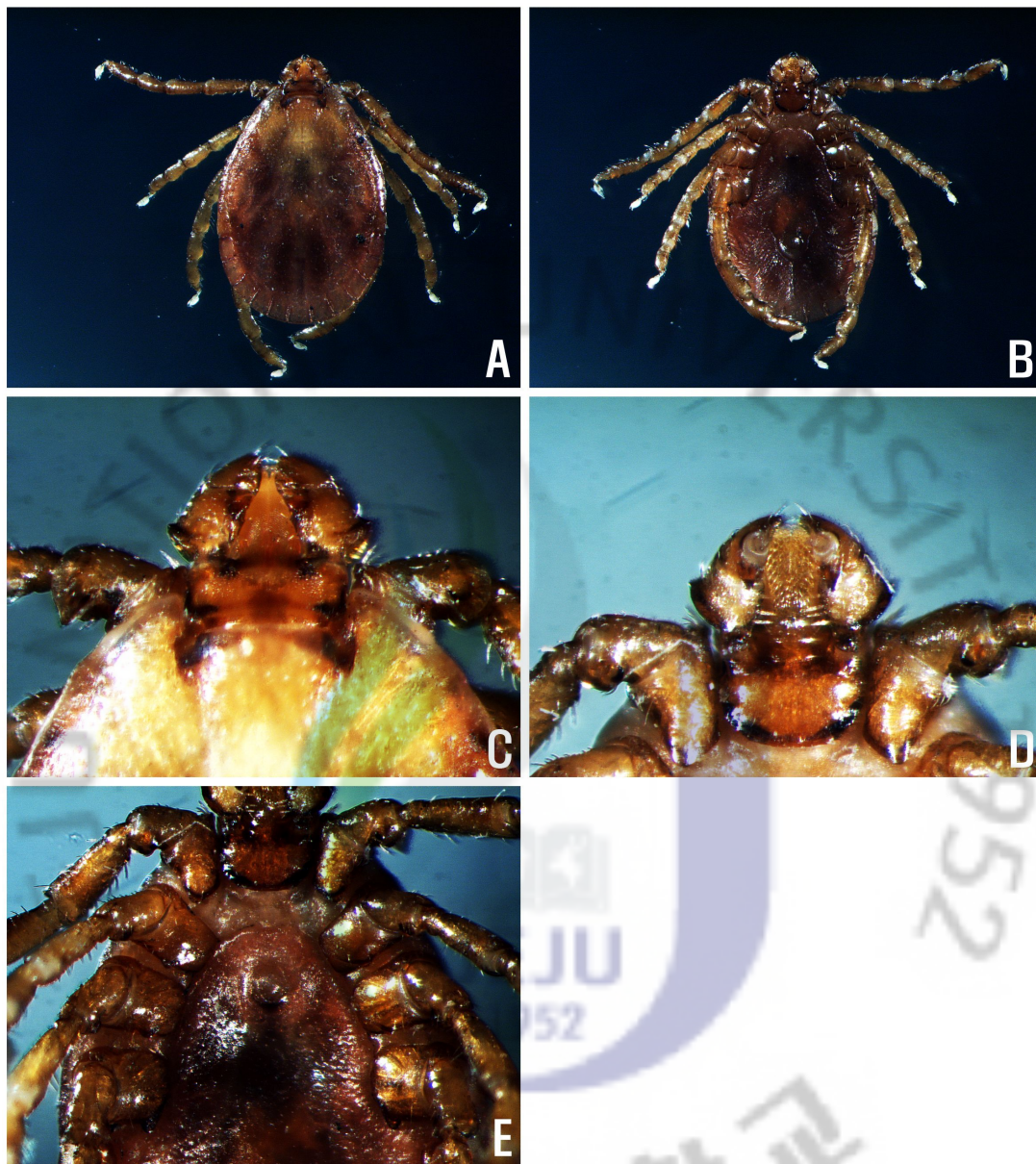


Fig. 3. *Haemaphysalis flava*, female.

A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae

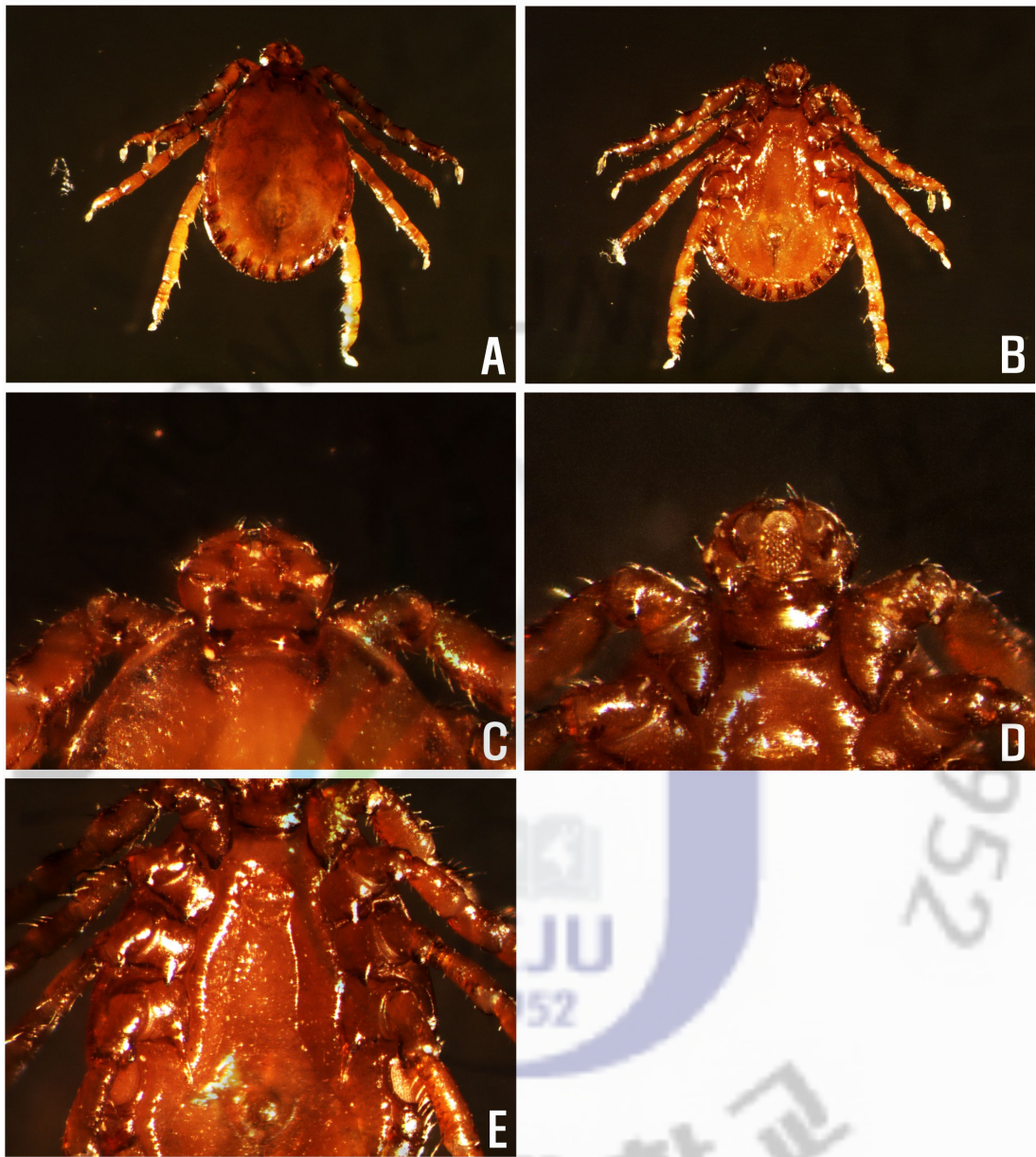


Fig. 4. *Haemaphysalis flava*, male.

A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae

Haemaphysalis longicornis Neumann, 1901, 작은소참진드기 (Fig. 5, 6, 7, 8, 9)

Haemaphysalis longicornis Neumann, 1901: 261; Hoogstraal et al. 1968: 1197-1212 (88, 89)

Haemaphysalis neumanni Dönitz, 1905: 227-229; Warburton, 1908: 508-519 (90, 91)

Haemaphysalis bispinosa Nuttall and Warburton, 1915: 426-433; Kishida, 1922b: 852; Saito et al., 1965: 143-159 (80, 87, 92)

형태적 특징

이 종류는 한국과 일본에서 오랫동안 *Haemaphysalis bispinosa*로 여겨져 왔다. 암컷의 형태적 특징을 보면, 몸은 황갈색 내지 다갈색이며 크기는 2.9×1.8mm 정도로 눈이 없으며 화체가 있다. 배판은 적황색이며 원형에 가깝다. 측지의 제 2절이 약체 기절보다 외측으로 돌출되어 있다. 측지 제 3절 배면 중앙 부위에 큰 가시 돌기가 후방으로 돌출되어 있다. 구하체의 끝은 둥근편이며 치열은 5/5이다. 항문구는 항문후방에 Y자 형태로 되어있다. 수컷의 크기는 2.5×1.6mm 정도로 배면 전체가 배판으로 덮이고 눈이 없다. 구기는 몸의 앞쪽에 있고, 기관은 크고 제 4각 후면에 있으며 측지는 짧고 제 2절이 외측으로 돌출하였다. 치열은 5/5이다. 형태적으로 *H. bispinosa*와 비슷하지만, 본 종이 크기가 더 크며, 구하체의 치열이 5/5이면서 드물게 4/4가 있는 반면, *H. bispinosa*는 항상 4/4의 치열을 갖는다. 자충의 경우도 치열이 3/3이나 *H. bispinosa*는 2/2로서 형태적으로 뚜렷이 구분된다. 본 조사에서 채집된 종의 형태는 성충(암컷, Fig. 6) 성충(수컷, Fig. 7), 자충(Fig. 8), 유충(Fig. 9)으로 구분하여 나타내었으며, 발육 단계별(성충, 약충, 유충) 개체 크기의 비교는 Fig. 10에 나타내었다.

숙주동물

본 종은 주로 소, 말, 토끼 등 가축에서 많이 발견되며, 조류에서도 발견되는 등 다양한 야생동물에서도 발견되는 것으로 알려져 있다.

분포지역

분포는 주로 한국, 일본, 러시아 등 동유럽국가, 오스트레일리아, 뉴질랜드 등 거의 세계적인 분포를 하고 있다. 우리나라에서도 서울, 제주를 비롯하여 전국적으로 가장 흔하게 분포하고 있는 것으로 알려지고 있다.



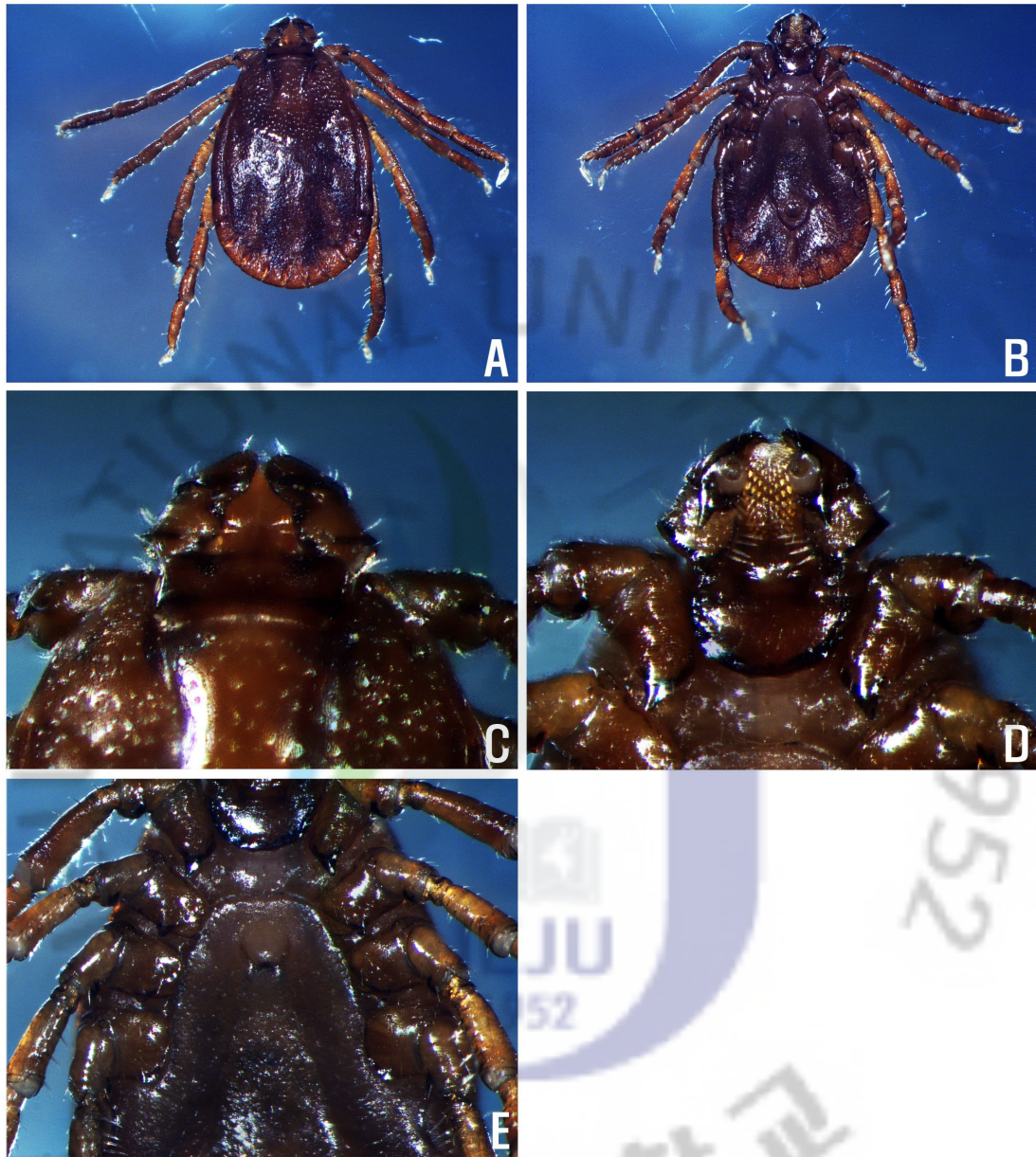


Fig. 5. *Haemaphysalis longicornis*, female

A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae

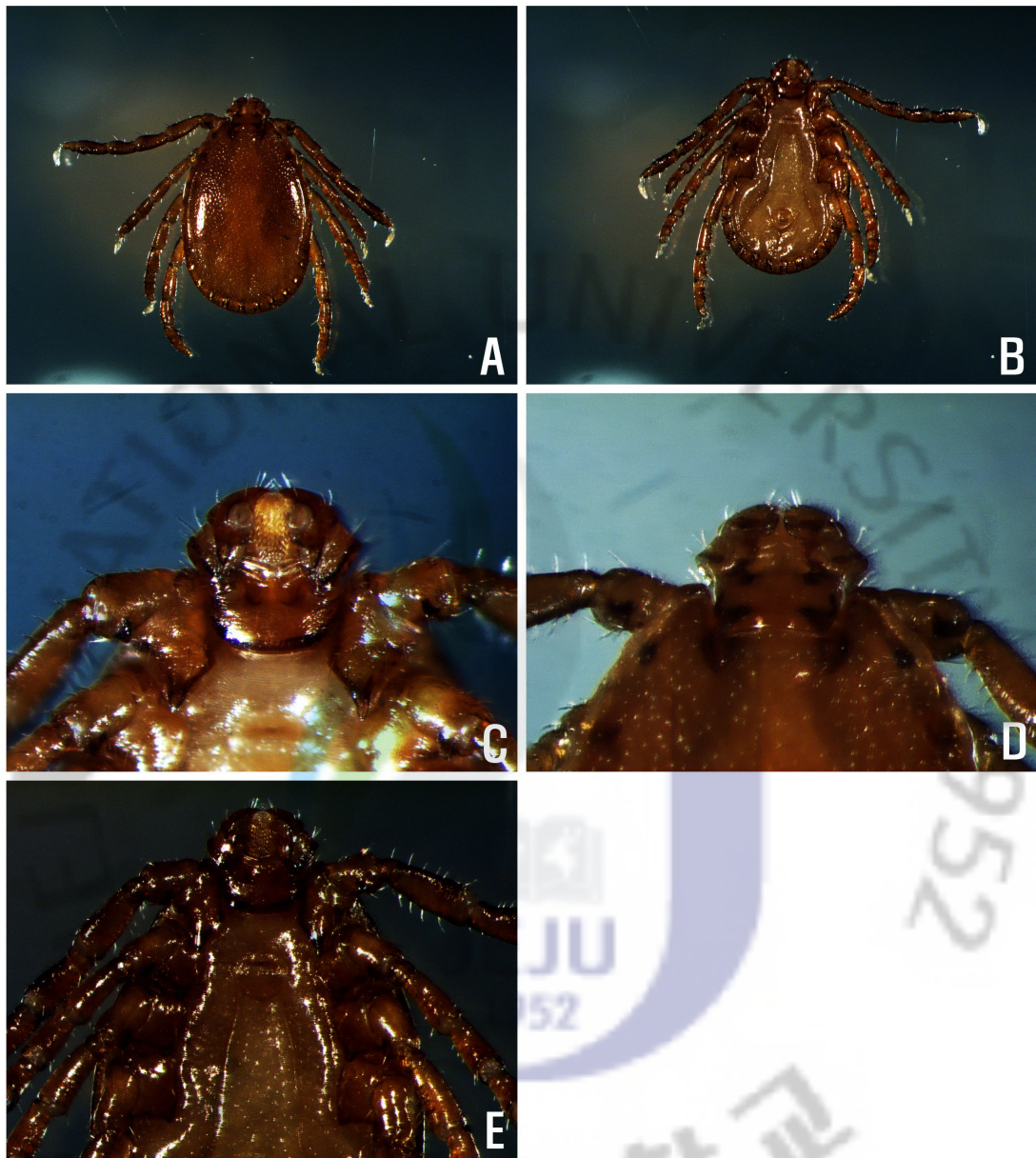


Fig. 6. *Haemaphysalis longicornis*, male.

A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae

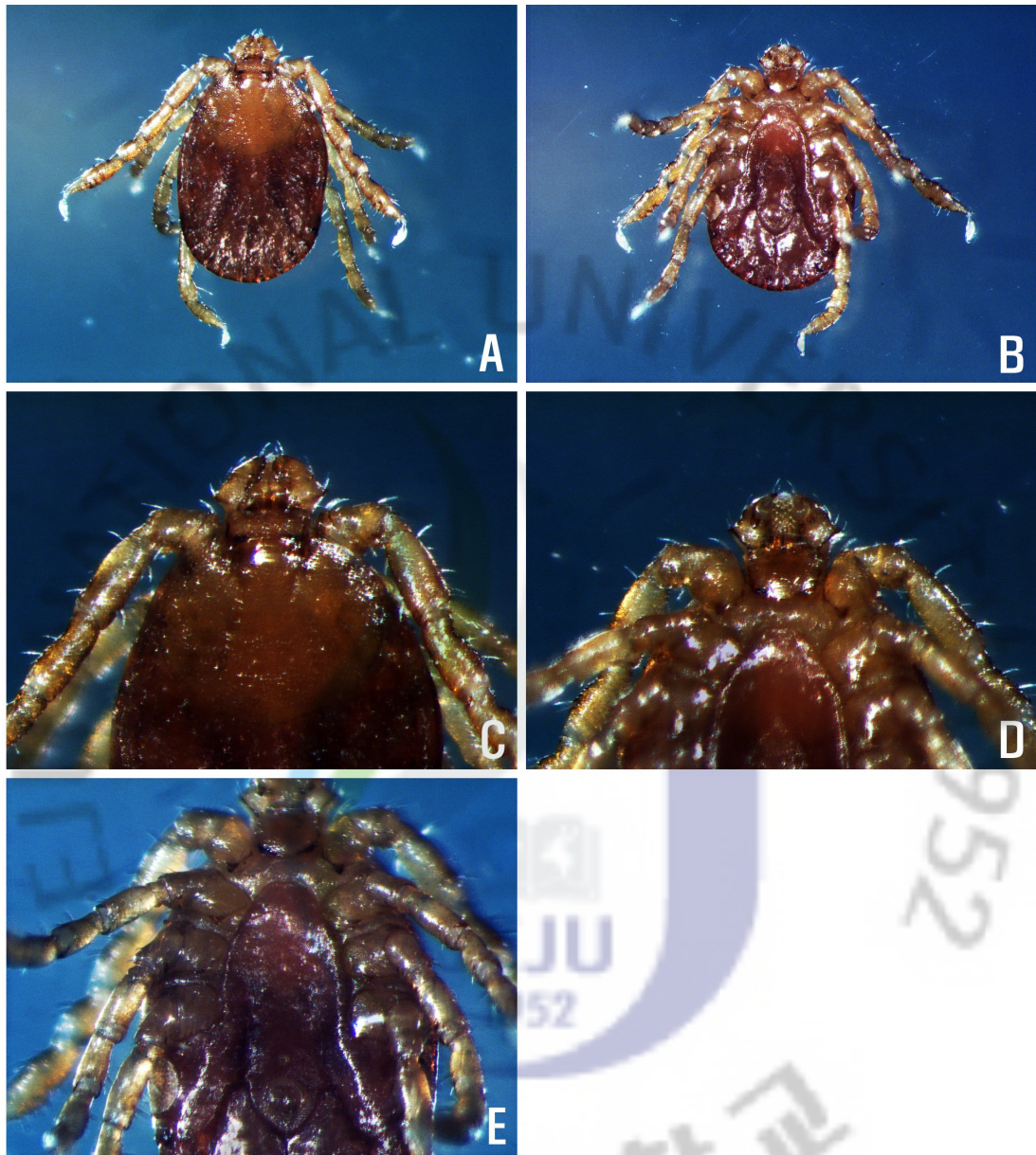


Fig. 7. *Haemaphysalis longicornis*, nymph.

A: dorsal, B: ventral, C: palpi (dorsal), D: palpi (ventral), E: coxae

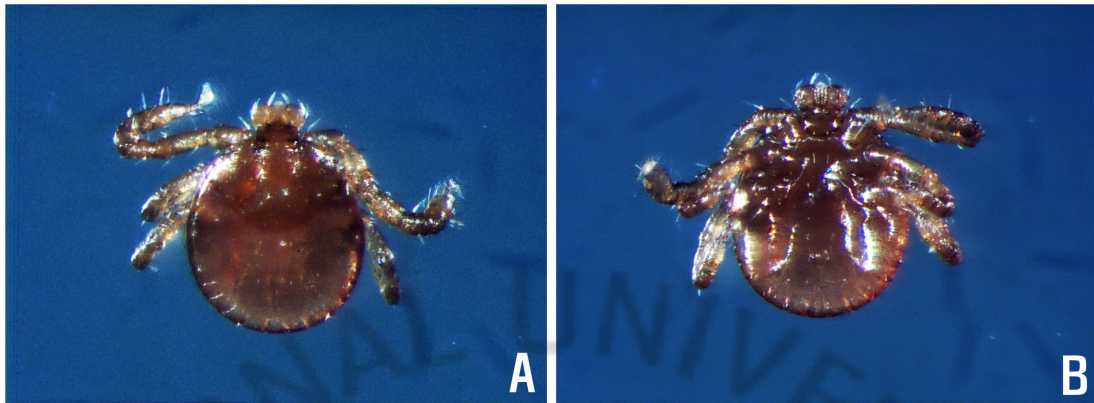


Fig. 8. *Haemaphysalis longicornis*, larva.

A: dorsal, B: ventral





Fig. 9. *Haemaphysalis longicornis*, female, male, nymph and larva from right with 1mm scales bar



3. 진드기의 지리적 분포 현황

본 조사에서는 72개 지점에서 총 3,089 마리가 채집되었고, 그 중 *Haemaphysalis flava*는 3마리, 그리고 나머지 3,086마리는 모두 *Haemaphysal longicornis*였다. *H. longicornis*는 조사한 모든 지점에서 채집되었을 뿐만 아니라 많은 개체수가 채집되어 제주도에서 가장 흔한 종으로 확인되었다. *H. flava*의 채집지점은 3개 지점에(동경 126° 33′ 29.0″, 북위 33° 25′ 36.4″, 126.17′ 15.8″, 33° 20′ 32.8″, 126° 27′ 45.7″, 33° 20′ 56.8″) 대해서만 각각 1마리씩 총 3마리가 채집 확인되었다(Table 2).



Table 2. The collection data of ticks at Jeju island from the year 2007 to 2008

Site No.	Collection date	Coordinates		Species	Developmental stage				Total
		Longitude	Latitude		Female	Male	Nymph	Larva	
1	2007-06-05	126.33.29.0	33.25.36.4	<i>H. longicornis</i>	1	2	15	0	18
2	2007-06-07	126.29.13.1	33.23.25.1	<i>H. longicornis</i>	4	1	65	0	70
		126.23.11.0	33.25.24.6	<i>H. flava</i>	0	1	0	0	1
3	2007-06-07	126.19.37.3	33.20.39.3	<i>H. longicornis</i>	11	2	70	0	83
4	2007-06-07	126.29.54.1	33.25.24.9	<i>H. longicornis</i>	9	8	411	0	428
5	2007-06-09	126.29.18.4	33.26.19.1	<i>H. longicornis</i>	20	17	124	0	161
6	2007-06-09	126.29.28.9	33.25.34.5	<i>H. longicornis</i>	3	2	10	0	15
7	2007-06-10	126.21.25.9	33.21.11.1	<i>H. longicornis</i>	6	10	136	0	152
8	2007-06-25	126.22.59.3	33.20.34.5	<i>H. longicornis</i>	0	1	11	0	12
9	2007-06-25	126.44.08.5	33.23.00.7	<i>H. longicornis</i>	2	0	77	0	79
10	2007-06-25	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	10	9	42	0	61
11	2007-06-26	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	1	3	20	0	24
12	2007-06-26	126.29.00.5	33.26.30.5	<i>H. longicornis</i>	2	0	45	0	47
13	2007-06-30	126.43.01.6	33.27.54.8	<i>H. longicornis</i>	21	29	24	0	74
14	2007-06-30	126.42.12.6	33.26.53.9	<i>H. longicornis</i>	2	0	171	0	173
15	2007-07-16	126.29.07.0	33.27.44.0	<i>H. longicornis</i>	8	0	0	0	8
16	2007-07-18	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	1	1	17	0	19
17	2007-07-18	126.33.28.2	33.25.35.4	<i>H. longicornis</i>	2	7	86	0	95
18	2007-07-18	126.31.25.4	33.25.13.7	<i>H. longicornis</i>	48	38	24	0	110
19	2007-07-23	126.29.52.5	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	18	10	1	0	29
20	2007-07-23	126.21.25.9	33.21.11.1	<i>H. longicornis</i>	1	1	0	0	2
21	2007-07-23	126.21.25.9	33.21.11.1	<i>H. longicornis</i>	10	0	0	0	10
22	2007-07-23	126.21.25.9	33.21.11.1	<i>H. longicornis</i>	2	6	0	0	8
23	2007-07-24	126.29.11.1	33.26.47.3	<i>H. longicornis</i>	8	24	80	0	112

Table 2. Continued

Site No.	Collection date	Coordinates		Species	Developmental stage				Total
		Longitude	Latitude		Female	Male	Nymph	Lava	
24	2007-07-24	126.45.02.1	33.22.27.3	<i>H. longicornis</i>	0	1	2	0	3
25	2007-07-24	126.41.49.1	33.26.25.5	<i>H. longicornis</i>	3	3	36	0	42
26	2007-07-24	126.43.59.3	33.23.09.5	<i>H. longicornis</i>	8	7	0	0	15
27	2007-07-24	126.45.02.1	33.22.27.2	<i>H. longicornis</i>	0	0	2	0	2
28	2007-07-24	126.44.05.3	33.22.58.8	<i>H. longicornis</i>	2	5	4	0	11
29	2007-07-25	126.44.20.0	33.19.54.8	<i>H. longicornis</i>	15	17	20	0	52
30	2007-07-25	126.41.05.5	33.22.46.7	<i>H. longicornis</i>	2	5	5	0	12
31	2007-07-25	126.29.45.7	33.25.23.4	<i>H. longicornis</i>	9	3	26	0	38
32	2007-07-30	126.29.45.7	33.25.23.4	<i>H. longicornis</i>	22	3	0	0	25
33	2007-07-30	126.29.26.0	33.25.59.3	<i>H. longicornis</i>	1	2	2	0	5
34	2007-07-30	126.37.14.3	33.24.13.3	<i>H. longicornis</i>	2	0	0	0	2
35	2007-07-30	126.37.29.2	33.22.08.1	<i>H. longicornis</i>	5	1	11	0	17
36	2007-07-30	126.37.21.5	33.21.11.8	<i>H. longicornis</i>	17	4	22	0	43
37	2007-07-30	126.36.29.1	33.25.26.5	<i>H. longicornis</i>	2	2	34	0	38
38	2007-07-31	126.29.45.0	33.23.35.1	<i>H. longicornis</i>	0	0	5	0	5
39	2007-07-31	126.27.46.0	33.21.28.1	<i>H. longicornis</i>	4	2	63	0	69
40	2007-08-07	126.26.29.4	33.24.49.1	<i>H. longicornis</i>	1	1	9	0	11
41	2007-08-07	126.25.08.8	33.24.18.8	<i>H. longicornis</i>	2	1	14	0	17
42	2007-08-07	126.21.29.0	33.24.27.7	<i>H. longicornis</i>	0	0	2	0	2
43	2007-08-08	126.24.30.9	33.24.12.6	<i>H. longicornis</i>	11	7	1	6	25
44	2008-04-29	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	3	2	4	0	9
45	2008-04-29	126.45.02.1	33.22.27.3	<i>H. longicornis</i>	29	9	0	0	38
46	2008-04-29	126.13.14.2	33.19.58.4	<i>H. longicornis</i>	0	0	0	0	0
47	2008-04-29	126.27.57.5	33.24.52.5	<i>H. longicornis</i>	0	0	26	0	26
48	2008-04-29	126.39.06.3	33.25.36.7	<i>H. longicornis</i>	0	0	26	0	26
49	2008-04-29	126.25.09.7	33.18.15.0	<i>H. longicornis</i>	0	2	7	0	9
50	2008-04-29	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	0	0	16	0	16

Table 2. Continued

Site No.	Collection date	Coordinates		Species	Developmental stage				Total
		Longitude	Latitude		Female	Male	Nymph	Iava	
51	2008-04-29	126.45.02.1	33.22.27.3	<i>H. longicornis</i>	0	1	35	0	36
52	2008-05-20	126.25.15.3	33.17.44.1	<i>H. longicornis</i>	1	0	17	0	18
53	2008-05-20	126.24.02.4	33.19.29.7	<i>H. longicornis</i>	0	0	22	0	22
54	2008-05-20	126.23.49.3	33.16.43.1	<i>H. longicornis</i>	0	0	52	0	52
55	2008-05-20	126.23.57.0	33.17.07.4	<i>H. longicornis</i>	0	1	34	0	35
56	2008-05-27	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	1	3	39	0	43
57	2008-05-27	126.17.15.8	33.20.32.8	<i>H. longicornis</i>	0	0	32	0	32
				<i>H. flava</i>	1	0	0	0	1
58	2008-05-27	126.26.11.6	33.24.50.2	<i>H. longicornis</i>	0	1	41	0	42
59	2008-06-26	126.21.29.2	33.24.27.3	<i>H. longicornis</i>	3	1	65	0	69
60	2008-06-26	126.21.40.1	33.21.31.2	<i>H. longicornis</i>	2	1	38	0	41
61	2008-06-26	126.20.10.0	33.18.56.6	<i>H. longicornis</i>	2	1	2	0	5
62	2008-06-26	126.31.37.3	33.25.21.9	<i>H. longicornis</i>	3	0	30	0	33
63	2008-06-27	126.14.49.3	33.16.18.3	<i>H. longicornis</i>	56	58	26	0	140
64	2008-06-27	126.15.59.4	33.16.07.2	<i>H. longicornis</i>	1	0	22	0	23
65	2008-06-27	126.15.31.9	33.18.00.7	<i>H. longicornis</i>	1	2	46	0	49
66	2008-07-08	126.19.23.8	33.20.41.6	<i>H. longicornis</i>	8	4	3	0	15
67	2008-07-08	126.29.53.0	33.25.24.6	<i>H. longicornis</i>	2	1	6	0	9
68	2008-07-08	126.29.53.2	33.27.52.7	<i>H. longicornis</i>	6	0	30	0	36
69	2008-08-21	126.27.45.7	33.20.56.8	<i>H. longicornis</i>	1	0	4	0	5
				<i>H. flava</i>	1	0	0	0	1
70	2008-08-21	126.27.09.7	33.16.46.4	<i>H. longicornis</i>	1	2	4	0	7
71	2008-08-21	126.27.22.3	33.17.10.3	<i>H. longicornis</i>	6	1	2	0	9
72	2008-08-21	126.27.42.0	33.17.38.1	<i>H. longicornis</i>	6	4	7	0	17

4. 작은소참진드기의 발육 단계별 및 월별 개체 변화

Table 3은 작은소참진드기(*H. longicornis*)에 대한 채집 일자별 및 발육 단계별 조사 결과로 성충 및 자충은 4월부터 8월에 걸쳐 채집되었으며 유충은 8월에 한하여 채집되었다. 조사기간 동안 발육 단계별 개체 비율을 살펴보면 자충이 96.0%로 가장 높았고, 성충의 경우에는 23.4%(암컷 13.7%, 수컷 9.7%)로 암컷이 높게 나타났으며 유충이 0.5%로 가장 낮았다. 발육 단계에 따른 월별 개체의 변화는 성충 암컷의 경우 8월이 28.9%로 가장 높은 채집 비율을 보였으나 4월과 7월과는 비슷하게 나타났으며 5월이 0.9%로 가장 낮았다. 성충 수컷의 경우에는 7월이 17.8%로 가장 높았으나 8월과 커다란 차이를 보이지 않았고 5월이 2.8%로 가장 낮게 나타났다. 자충은 5월이 96.3%로 가장 높은 비율을 나타냈고 6월 82.5%, 4월 62.8%, 7월 57.4%, 8월 47.4% 순으로 나타났다.

성충의 경우 4월부터 시작하여 채집 비율이 높게 나타나는 것은 자손을 번식시키기 위한 흡혈 활동이 활발하다는 것을 보여주고 있는 것으로 생각된다. 그리고 자충은 전 조사기간 동안 발육 단계별로 비교하였을 경우 75.3%를 차지하여 대부분을 차지하였고 유충은 0.2%로 채집 비율이 가장 낮았다.

이런 결과들은 작은소참진드기(*H. longicornis*)가 하절기인 7월과 8월에 산란을 시작하면서 숙주동물을 흡혈하고 탈피하여 자충이 된 후 월동기간을 거쳐 다음 해 봄에 다시 흡혈을 하여 성충으로 발육하는 것으로 사료된다. 채집된 진드기의 전체적인 월별 평균 개체수는 6월이 83.6%로 가장 높았고, 5월, 7월, 4월, 9월 순으로 개체 변화를 보여 주었다.

Table 3. Monthly occurrence to developmental stages of *Haemaphysalis longicornis* collected in Jeju island from the year 2007 to 2008

Month	Developmental stages				Total
	Female	Male	Nymph	Larva	
April	5.3	1.8	12.0	0	19.1
%	27.8	9.4	62.8	0.0	100.0
May	0.3	0.9	31.0	0	32.2
%	0.9	2.8	96.3	0	100.0
June	7.6	7.0	69.0	0	83.6
%	9.1	8.4	82.5	0.0	100.0
July	7.4	5.3	17.1	0	29.8
%	24.8	17.8	57.4	0.0	100.0
August	3.9	2.3	6.4	0.9	13.5
%	28.9	17.0	47.4	6.7	100.0
Total	24.5	17.3	135.5	0.9	178.2
%	13.7	9.7	76.1	0.5	100.0

5. 진드기의 유전적 동정과 빈도

제주도 지역에서 수집된 진드기들은 형태학적인 분석에 따라 모두 *H. longicornis*로 동정되었다. 결과적으로 세 곳의 조사지역(동부, 서부, 북부)을 기준으로 72곳의 채집 지점에서 수집된 1,395마리의 진드기(506 pools) 중에서 자충(nymph)이 1,043 마리(74.8%)로 가장 많았고, 200 마리(14.3%)의 암컷 성충(female adult), 149 마리(10.7%)의 수컷 성충(male adult), 3마리(0.2%)의 유충(larva) 순이었다. 본 연구에서는 전체 506개의 풀링된 진드기 DNA 시료를 대상으로 *H. longicornis* 5.8S rRNA ITS2 유전자 PCR을 이용하여 유전적인 방법으로 진드기를 동정하였다(Fig. 10).

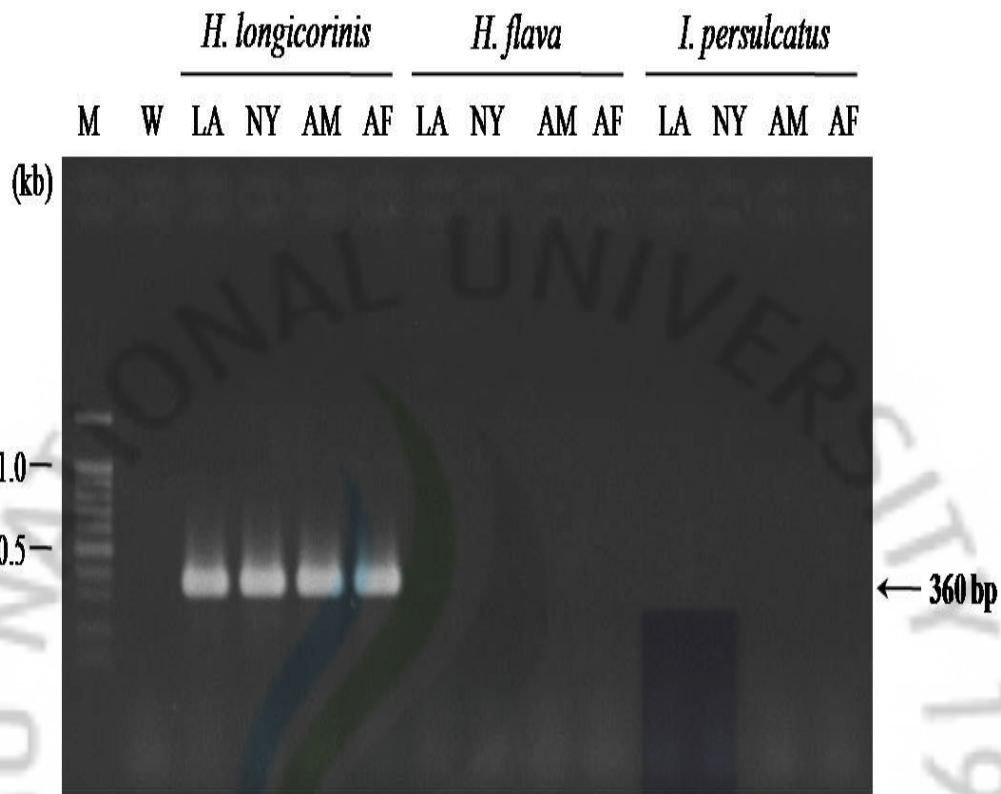


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of *H. longicornis* tick 5.8S rRNA internal transcribed spacer 2 gene (360 bp amplicons). Lane M, 100 base pair size marker. Abbreviation of each lane is as follows: W, water control; LA, larva; NY, nymph; AM, adult male; AF, adult female.

6. PCR에 의한 진드기 매개 병원체의 빈도와 지역적 분포

제주도 지역에서 채집된 *H. longicornis*의 DNA 시료에서 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 속 및 유전종들을 일반 PCR 방법과 종 특이적 nested PCR로 검출하였다. 먼저, 16S rRNA 유전자 프라이머를 사용한 1차 PCR에 의해 *Anaplasma*와 *Ehrlichia*에 관련된 16S rRNA 유전자 증폭산물 약 1,406 bp를 전기영동 상에서 확인하였고, 이들 1차 산물들을 주형 DNA로 하여 nested PCR 증폭에 의한 양성비율까지 포함시키면 검출된 병원체 수는 모두 51개로 조사되었다(data not shown). 이들 PCR 증폭산물 중에서 *Anaplasma*와 *Ehrlichia*의 유전종 검출을 위한 nested PCR로 확인되지 않은 14개는 염기서열 분석 결과와 GenBank database alignment에 기초하여 8개(0.6%)가 *Anaplasma* 종으로, 6개(0.4%)가 *Ehrlichia* 종으로 확인되었다(Table 4). 유전종 동정을 위한 nested PCR 결과와 염기서열 및 GenBank database 분석결과, *H. longicornis*에서 가장 빈번하게 검출된 병원체는 27개(1.9%)의 *A. phagocytophilum*으로 조사되었고, 5개(0.4%)의 *A. bovis*, 4개(0.2%)의 *E. chaffeensis*, 1개(0.1%)의 *A. centrale* 순이었다. 가장 많은 검출 빈도를 보인 *A. phagocytophilum*은 세 개의 조사지역에서 최소감염률(minimum infection rate, MIR)을 기준으로 서부지역에서 15개(2.5%), 북부와 동부지역에서 각각 6개(2.0%) 순이었고, 진드기 발생단계별로는 약충에서 12개(1.4%), 수컷 성충에서 8개(5.4%), 암컷 성충에서 7개(3.5%) 순이었다. 조사지역별로, *E. chaffeensis*는 동부와 서부지역에서만 확인되었지만, *Anaplasma* 종들은 모든 조사지역에서 검출되었다(Fig. 11). 8개의 *Anaplasma* 종들 중에서 6개(0.6%)는 약충, 2개(1.3%)는 수컷 성충에서 나타났고, 6개의 *Ehrlichia* 종들 중에서 4개(2.0%)는 암컷 성충, 2개(0.2%)는 자충에서 확인되었다. 조사지역에 따른 병원체 검출빈도는 24곳(1.7%)의 서부지역에서 가장 많았고, 17곳(1.2%)의 동부지역, 10개(0.7%)의 북부지역 순이었다. *A. bovis*와 *E. chaffeensis*는 각각 4곳(0.3%)의 서부지역과 3곳(0.2%)의 동부지역에서 대부분을 차지하였다.

Table 4. Prevalence of total ticks (number of pools) and tick-borne pathogens identified from the three main survey areas during the year 2007 and 2008 in Jeju Island, Korea

Survey areas (n=72 ^a)	Stages	No. of ticks (no. of pools ^b)	No. of PCR-positive samples (%)					
			<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	<i>A.</i> <i>bovis</i>	<i>A.</i> <i>centrale</i>	<i>E.</i> <i>chaffeensis</i>
East (n=23)	Larva	3 (1)	0	0	0	0	0	0
	Nymph	342 (49)	5 (1.5)	1 (0.3)	3 (0.9)	0	0	1 (0.3)
	Male	70 (70)	1 (1.4)	0	2 (2.9)	0	1 (1.4)	1 (1.4)
	Female	79 (79)	0	0	1 (1.3)	0	0	1 (1.3)
	Subtotal	494 (199)	6 (1.2)	1 (0.2)	6 (1.2)	0	1 (0.2)	3 (0.6)
West (n=25)	Nymph	473 (70)	1 (0.2)	1 (0.2)	6 (1.3)	0	0	1 (0.2)
	Male	51 (51)	1 (2.0)	0	6 (11.8)	1 (2.0)	0	0
	Female	69 (69)	0	1 (1.5)	3 (4.4)	3 (4.4)	0	0
	Subtotal	593 (190)	2 (0.3)	2 (0.3)	15 (2.5)	4 (0.7)	0	1 (0.2)
North (n=24)	Nymph	228 (37)	0	0	3 (1.3)	0	0	0
	Male	28 (28)	0	0	0	0	0	0
	Female	52 (52)	0	3 (5.8)	3 (5.8)	1 (1.9)	0	0
	Subtotal	308 (117)	0	3 (1.0)	6 (2.0)	1 (0.3)	0	0
Total	Larva	3 (1)	0	0	0	0	0	0
	Nymph	1,043 (156)	6 (0.6)	2 (0.2)	12 (1.4)	0	0	2 (0.2)
	Male	149 (149)	2 (1.4)	0	8 (5.4)	1 (0.7)	1 (0.7)	1 (0.7)
	Female	200 (200)	0	4 (2.0)	7 (3.5)	4 (2.0)	0	1 (0.5)
	Total	1,395 (506)	8 (0.6)	6 (0.4)	27 (1.9)	5 (0.4)	1 (0.1)	4 (0.2)

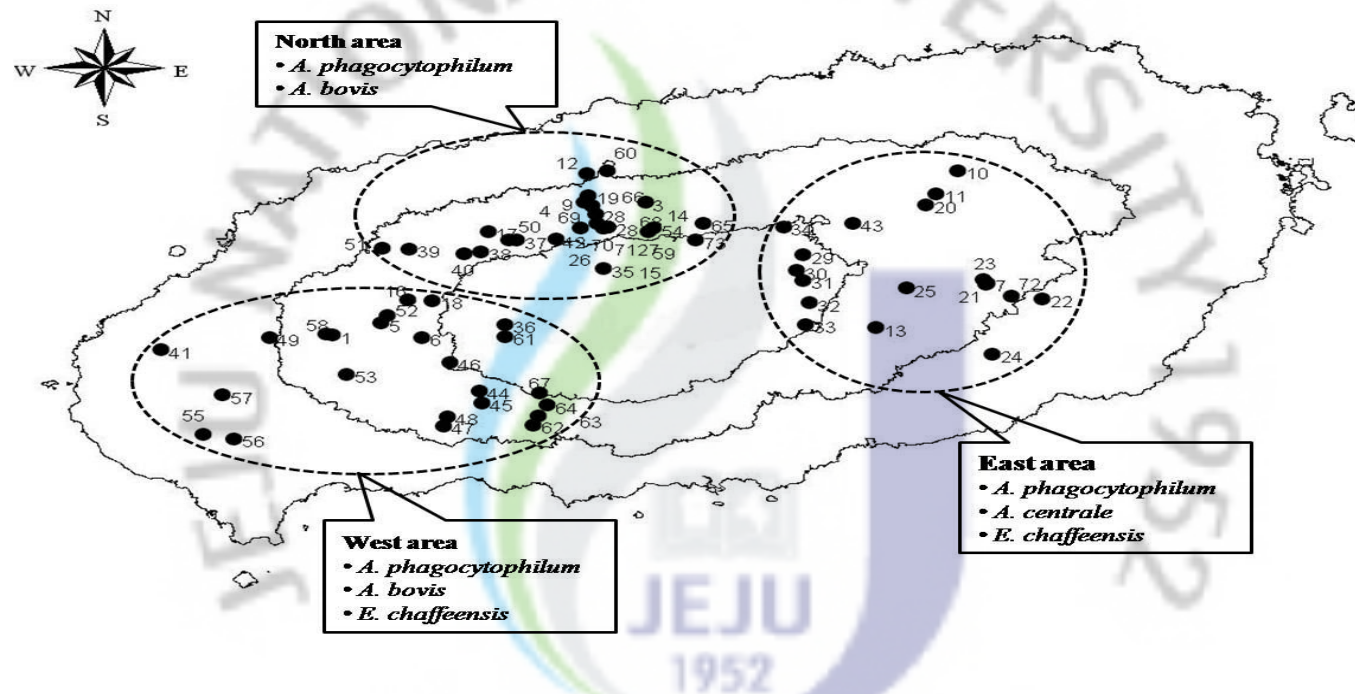


Fig. 11. Map of Jeju Island. Seventy-two tick collection sites indicated by black dots are classified into three areas (East, West, and North) and tick-borne pathogens identified in Jeju Island are indicated by squares.

7. *Anaplasma* 및 *Ehrlichia* 종의 계통발생학적 분석

진드기에서 검출된 8개의 *Anaplasma* 종과 6개의 *Ehrlichia* 종들은 GenBank database에 있는 다양한 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 종들의 16S rRNA 유전자 서열들과 비교하여 동정할 수 있었고, 염기서열 유사도 범위와 계통발생학적 지도를 통해 각 병원체 종들 간에 높은 상동성을 가지고 있었다(fig. 12). 8개의 *Anaplasma* 속 그룹들 간의 염기서열 유사도범위는 99.4%에서 99.7%로 조사되었고 *A. marginale* (FJ226454, AF414874, AF309867)와 가장 높은 상동성을 가졌으며, 이들과의 유사도는 93.9%에서 94.3%로 조사되었다. 6개의 *Ehrlichia* 종 그룹들 간의 염기서열 유사도는 99.5%에서 99.9%이고 중국에서 *Boophilus microplus* 진드기에서 동정된 *Ehrlichia* sp. (DQ324547)와 가장 높은 상동성으로 나타났다(유사도 범위, 98.8% - 99.0%). Fig. 13은 염기서열 분석을 통해 3개 그룹으로 분류되는 *Anaplasma* 유전종(27개의 *A. phagocytophilum* [group A], 5개의 *A. bovis* [group B], 1개의 *A. centrale* [genotype C])들과 GenBank database에서 다른 *Anaplasma* 유전종들 간의 유전적 상동성을 보여주는 계통발생학적 지도이다. 27개의 *A. phagocytophilum* 클론들을 포함하는 A group은 염기서열 유사도 분석에 따라 97.9%에서 98.4% 범위로 7개의 genotype으로 분류되었다. 3개의 클론을 포함하는 genotype A6는 미국에서 동정된 *A. phagocytophilum* (AY055469)과 완전하게 일치하였다. 2개의 클론을 포함하는 genotype A7은 국내의 *H. longicornis* 진드기에서 동정된 *A. phagocytophilum* (AF470699)과 가장 유사하였다. 반면에 다른 병원체들과 유전적 상동성이 낮은 genotype A1, A2, A3, A4 간의 염기서열 유사도는 99.6% 이상의 높은 상동성을 보였다. *A. bovis*로 분류된 genotype B1과 B2들 간의 염기서열 유사도는 99.4%로 조사되었고 이들은 일본(AB196475)과 한국(AF470698)에서 동정된 *A. bovis*와 각각 99.1%와 99.7%의 상동성으로 확인되었다. 1개의 *A. centrale* (genotype C1)는 미국에서 알려진 *A. centrale* (AB211164)와 99.2%의 상동성으로 조사되었다.

E. chaffeensis 클론들 간의 계통발생학적 지도는 Fig. 14에 나타내었는데, 2개의 genotype D1과 D2는 *E. chaffeensis* 16S rRNA의 짧은 염기서열 단편부위를 확인하여 동정하였고 이들 genotype들은 GenBank database에 있는 *E. chaffeensis* (AY350424, M73222, AF147752)와 각각 99.7%와 99.2%의 상동성을 나타내었다.



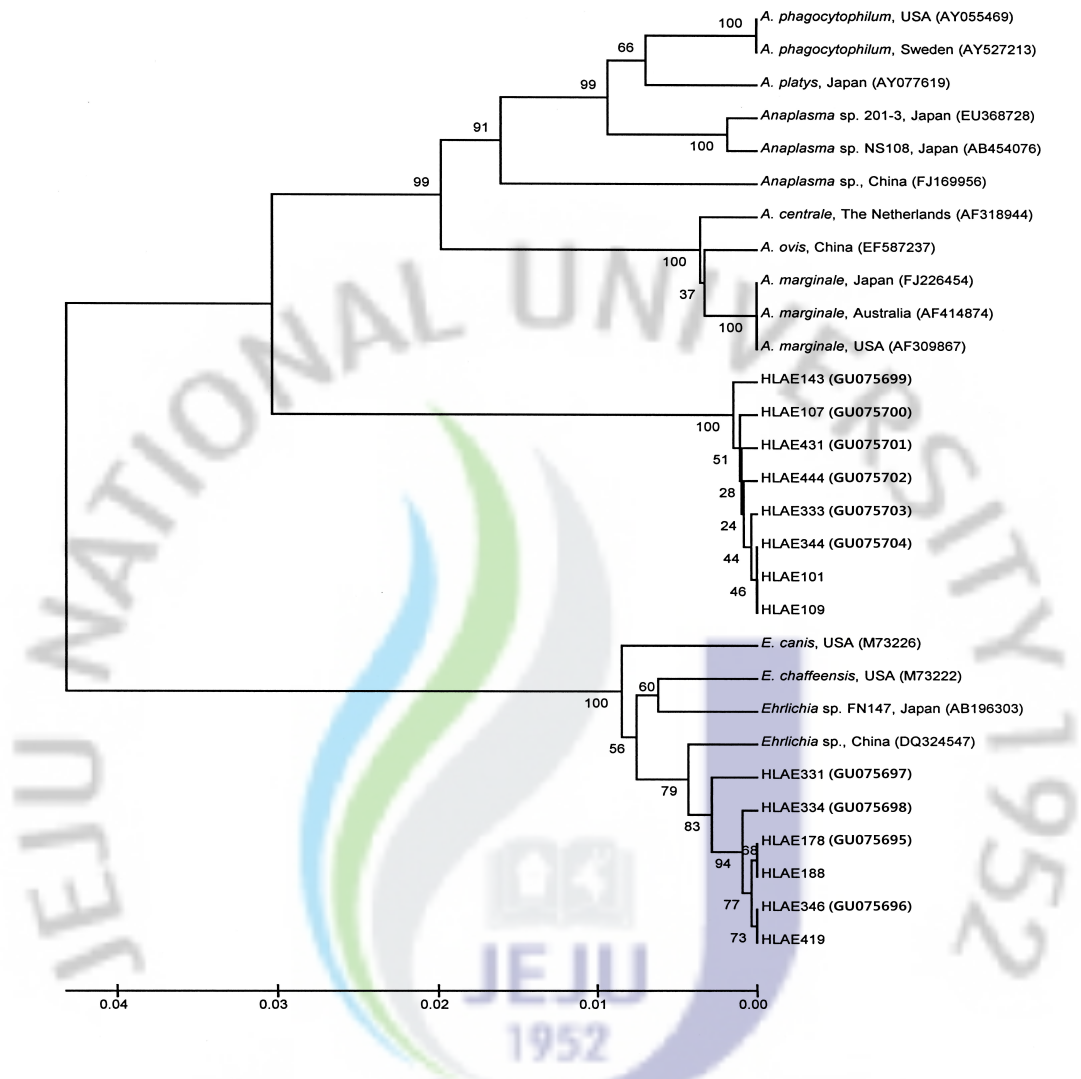


Fig. 12. Phylogenetic tree based on 1.406 bp sequence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species collected in Jeju Island of Korea. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of 16S rRNA gene sequences by CLUSTAL W and followed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software. The GenBank accession numbers are in parentheses.

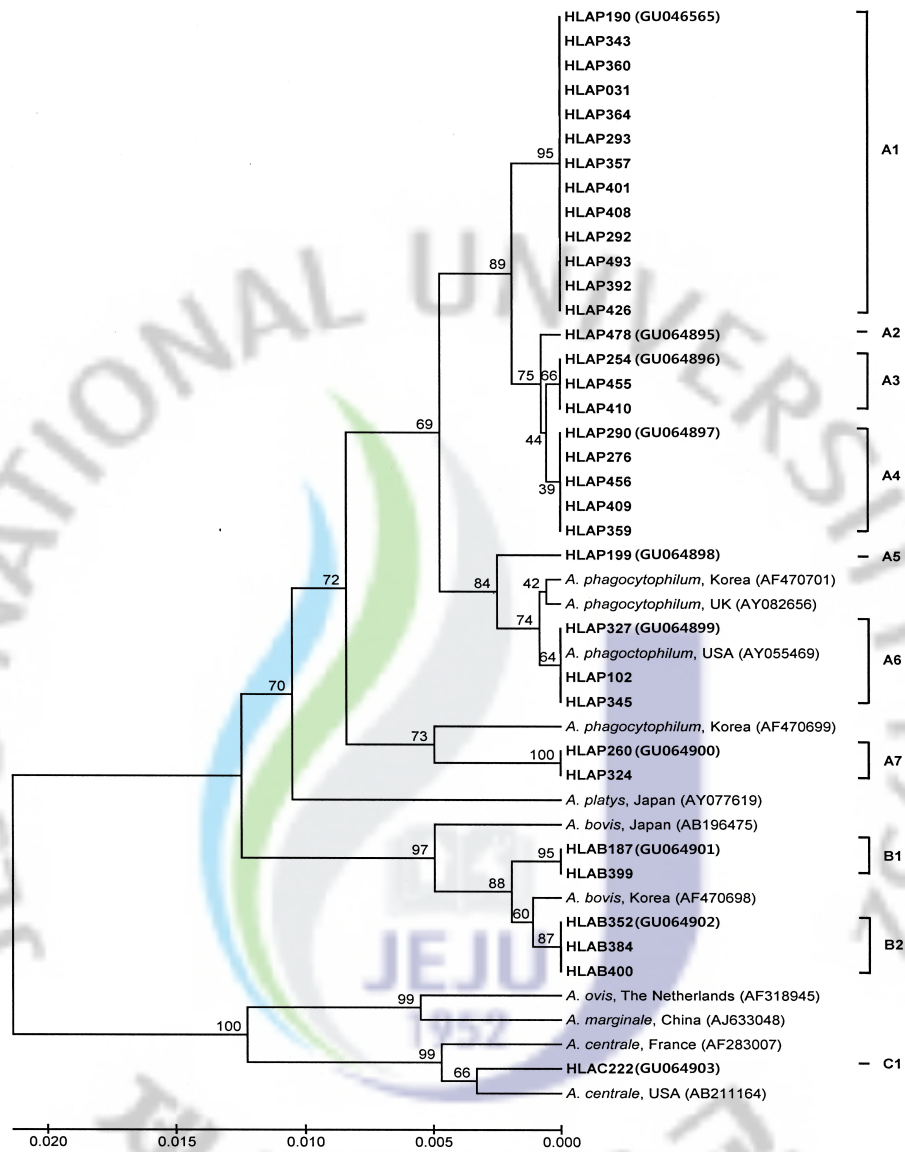


Fig. 13. Phylogenetic tree based on 390 bp gene sequence of *E. chaffeensis*. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of *Anaplasma* gene sequences obtained from species-specific nested PCR assay, by CLUSTAL W and followed by the UPGMA method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software.

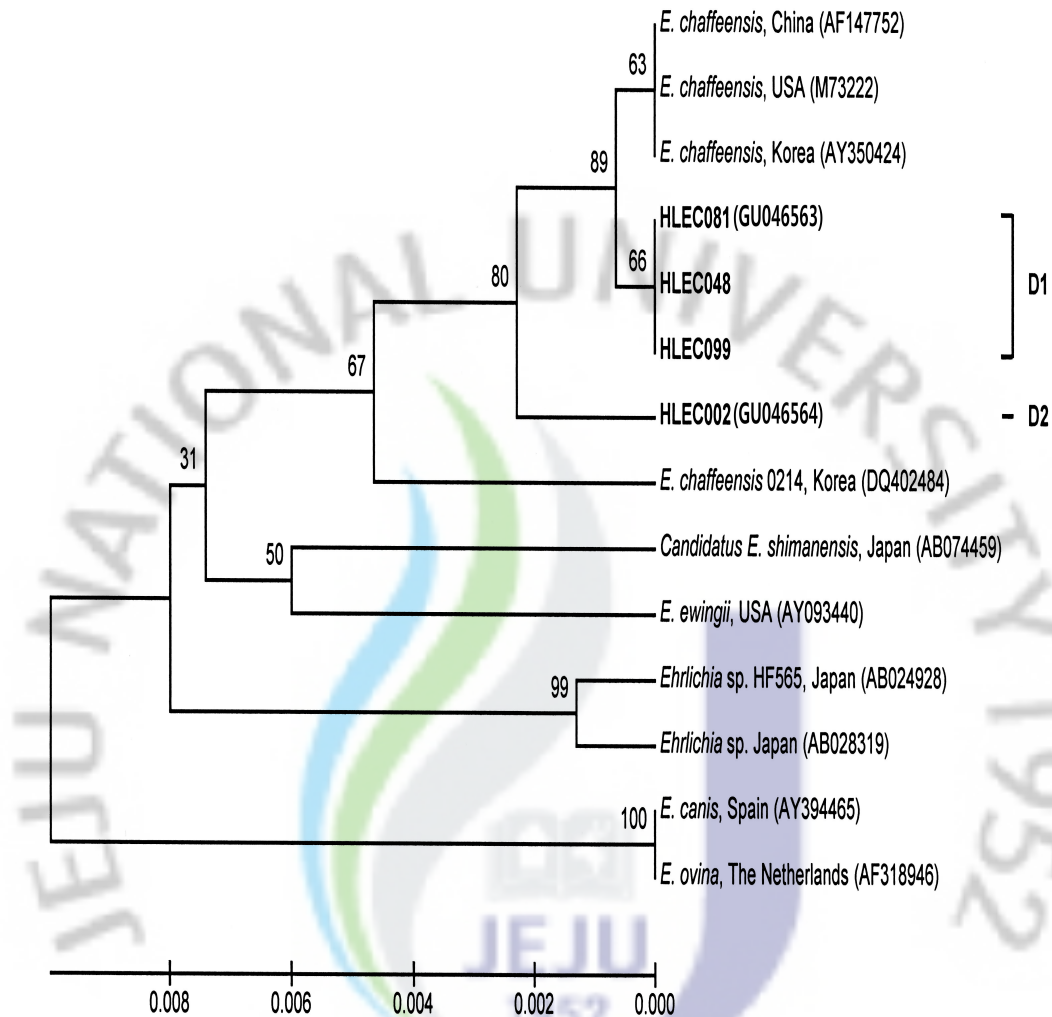


Fig. 14. Phylogenetic tree based on 926 bp gene sequence of *A. phagocytophilum*, *A. bovis*, and *A. centrale*. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of *Anaplasma* gene sequences obtained from species-specific nested PCR assay, by CLUSTAL W and followed by the UPGMA method with 1,000 bootstrap resamplings using MEGA software.

8. 진드기 DNA 추출물에서 PCR 증폭산물 확인

진드기를 성숙단계 기준으로 1,581마리의 *H. longicornis*를 247개의 pooled sample, *H. flava*를 3개의 sample로 나누어 전체 250개의 시료를 만들었다(Table 5). 250개의 시료에서 추출한 각각의 DNA를 주형으로 *ompB* 유전자를 증폭시킨 결과, *H. longicornis* 시료들은 224개(90.7%)에서 407bp 크기의 증폭산물을 보였으며, *H. flava* 시료들은 모두 음성반응을 보였다. 이러한 결과는 *H. longicornis*에 대한 *ompB* 유전자를 목표로 하는 프라이머를 사용하여 실험한 바, 홍반열균 리켓치아의 감염이 발생할 수 있다는 것을 알 수가 있었으나, 이번 실험에 사용된 *H. flava*에 대해서는 채집된 개체수가 적어 감염율을 정확하게 확인하지는 못하였다. 따라서 향후 *H. flava*의 개체수를 많이 확보하여 재차 감염율을 확인할 필요가 있다고 사료된다. 또한, 양성 반응을 보인 224개의 시료들 중 26개를 선별하여 *gltA*와 17 kDa antigen 유전자를 타겟으로 하는 nested PCR을 수행하였다. *gltA* PCR 결과 26개(100%)에서 330bp 크기의 증폭산물이 나타났으며, 17 kDa antigen PCR 결과는 25개(96.2%)에서 360bp 크기의 증폭산물을 나타내었다. 우선적으로 기존에 알려진 다양한 리켓치아 partial *ompB* 유전자 염기서열들과 *ompB* PCR 산물 클론들의 염기서열들을 비교하였는데, *R. japonica*와 가장 높은 유사도를 보였으며, 다음으로 *R. africae*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. monacensis*, *R. sibirica*의 염기서열과 각각 94.9~95.4%, 89.3~89.8%, 95.2~95.7%, 91.2~91.7%, 94.6~95.4%의 유사도를 나타내었다(Fig. 15, 16, 17).

GenBank database에는 *R. marmionii*에서 분석된 *ompB* 유전자의 염기서열이 등록되어 있지 않았으며, 등록된 *R. japonica*와 *R. marmionii*의 *gltA* 유전자 염기서열을 비교한 결과 2개의 염기가 다르게 나타났다(유사도 99.3%). 17 kDa antigen 유전자 염기서열을 비교한 결과는 3개의 염기 차이를 보였다(유사도 99.1%).

Table 5. Tick number of pools by stages of collected ticks at Jeju Island from the year 2007 to 2008

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

^a1~15 larva/pool, ^b1~15 nymph/pool, ^{c,d}1~5 adults/pool

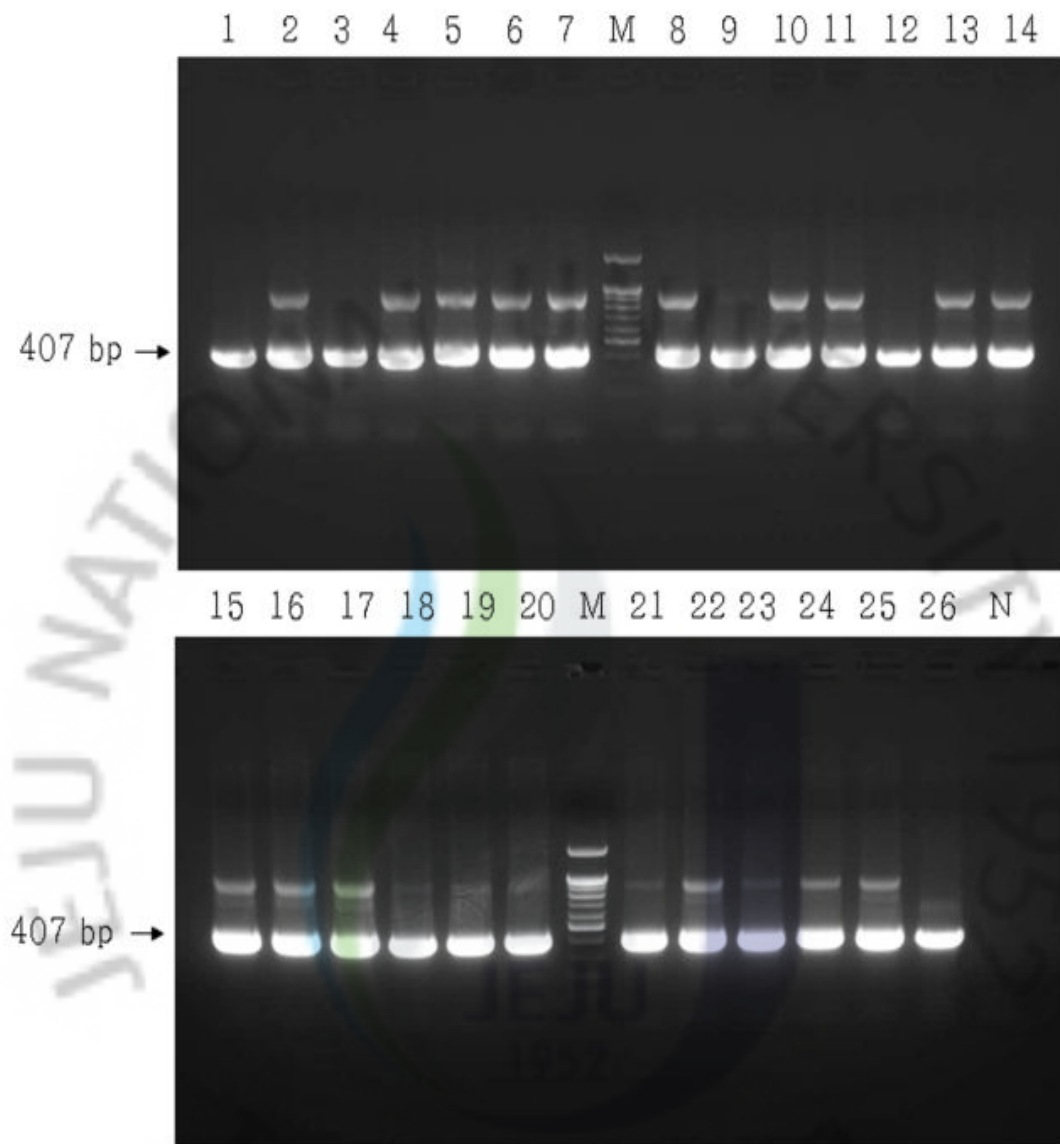


Fig. 15. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by *ompB*-nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder, lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the *ompB*-PCR products (407 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) of the amplified PCR products.

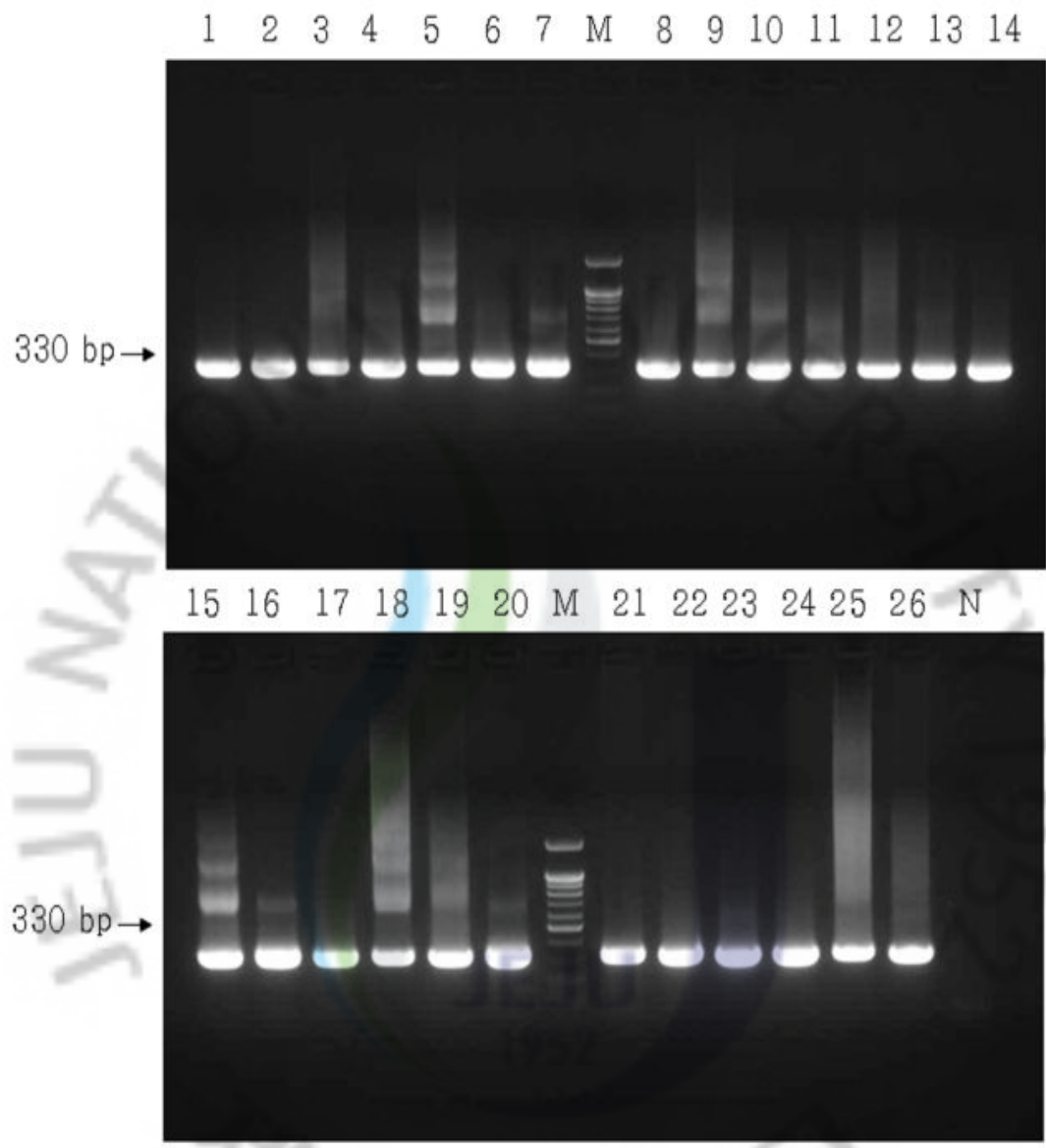


Fig. 16. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by *gltA*-nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder, lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the *gltA*-PCR products (330 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) on the amplified PCR products.

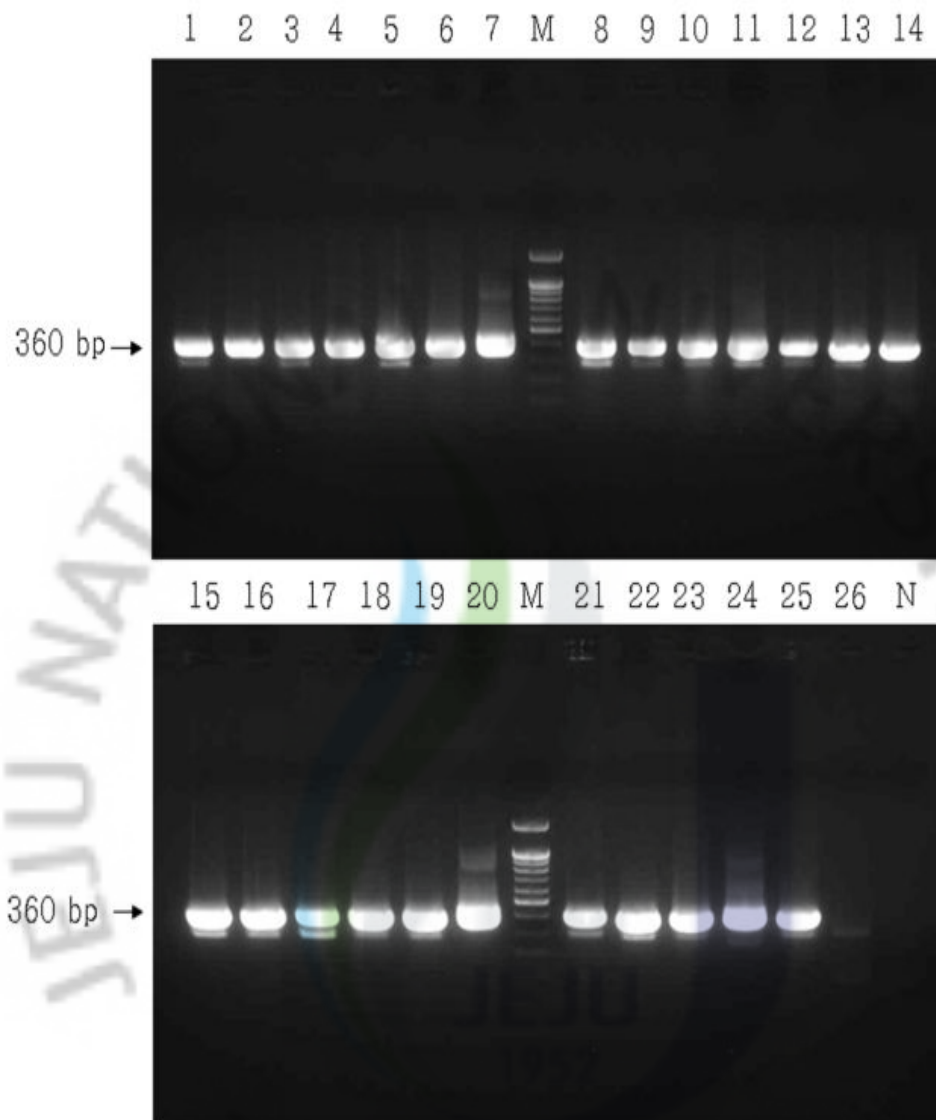


Fig. 17. Electrophoresis analysis on 1.2% agarose gel of DNAs amplified by 17 kDa antigen nested PCR assay with outer and inner primer set with template DNAs from tick samples. Lanes M, 100bp DNA ladder; lanes N, negative control, lane 1~26, each number of the 17 kDa antigen PCR products (360 bp). The number on the left indicates the molecular size (in base pairs) of the amplified PCR products.

9. Cloning, 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석

각 partial *ompB*, *gltA*, 17 kDa antigen 유전자 증폭산물은 TA vector에 cloning한 후 각 산물 당 1개의 clone을 염기서열 분석하여 GenBank database에서 얻은 다양한 리켓치아 염기서열과 비교하였다. Table 6은 GenBank database에서 얻은 리켓치아 *ompB* 염기서열들과 본 연구에서 얻은 224개의 *ompB* PCR 산물 clone 중 선별된 10개의 clone들의 염기서열을 비교한 것이다. 10개의 클론 중 9개의 클론(No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 cluster를 형성하였으며 98.7~99.2%의 유사도를 나타내었다. 10개의 클론 중 1개의 클론(No. 226)은 *R. monacensis*와 독립적인 cluster를 형성하였으며, 99.0%의 유사도를 나타내었다. 각 클론들의 리켓치아속의 분류에서 genotype의 위치를 확인하기 위하여 *ompB* 유전자의 염기서열 분석에 근거하여 phylogenetic 분석을 수행하였다. 9개의 클론들 (No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 유사도를 가지는 group 1과 *R. monacensis*와 유사도를 가지는 1개의 클론(No. 226)을 포함하는 group 2로 clustering 되었다(Fig. 18).

Table 6. Similarity matrix between partial *ompB* gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR *ompB* products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	92.9	99.2	95.4	94.2	99.0	94.9	95.2	95.4	94.9	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4	93.2
2		-	92.9	89.8	91.9	92.1	89.3	89.5	89.8	89.3	89.5	89.8	89.8	89.8	89.8	90.6
3			-	95.7	94.8	98.7	95.2	95.4	95.7	95.2	95.4	95.7	95.7	95.7	95.7	93.7
4				-	91.7	95.4	98.7	98.9	99.2	98.7	98.9	99.2	99.2	99.2	99.2	90.3
5					-	93.7	91.2	91.4	91.7	91.2	91.4	91.7	91.7	91.7	91.7	99.0
6						-	94.6	95.2	95.4	94.9	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4	92.7
7							-	99.2	99.5	98.9	99.2	99.5	99.5	99.5	99.5	90.9
8								-	99.7	99.2	99.5	99.7	99.7	99.7	99.7	91.2
9									-	99.5	99.7	100	100	100	100	91.4
10										-	99.2	99.5	99.5	99.5	99.5	90.9
11											-	99.7	99.7	99.7	99.7	91.2
12												-	100	100	100	91.4
13													-	100	100	91.4
14														-	100	91.4
15															-	91.4
16																-

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

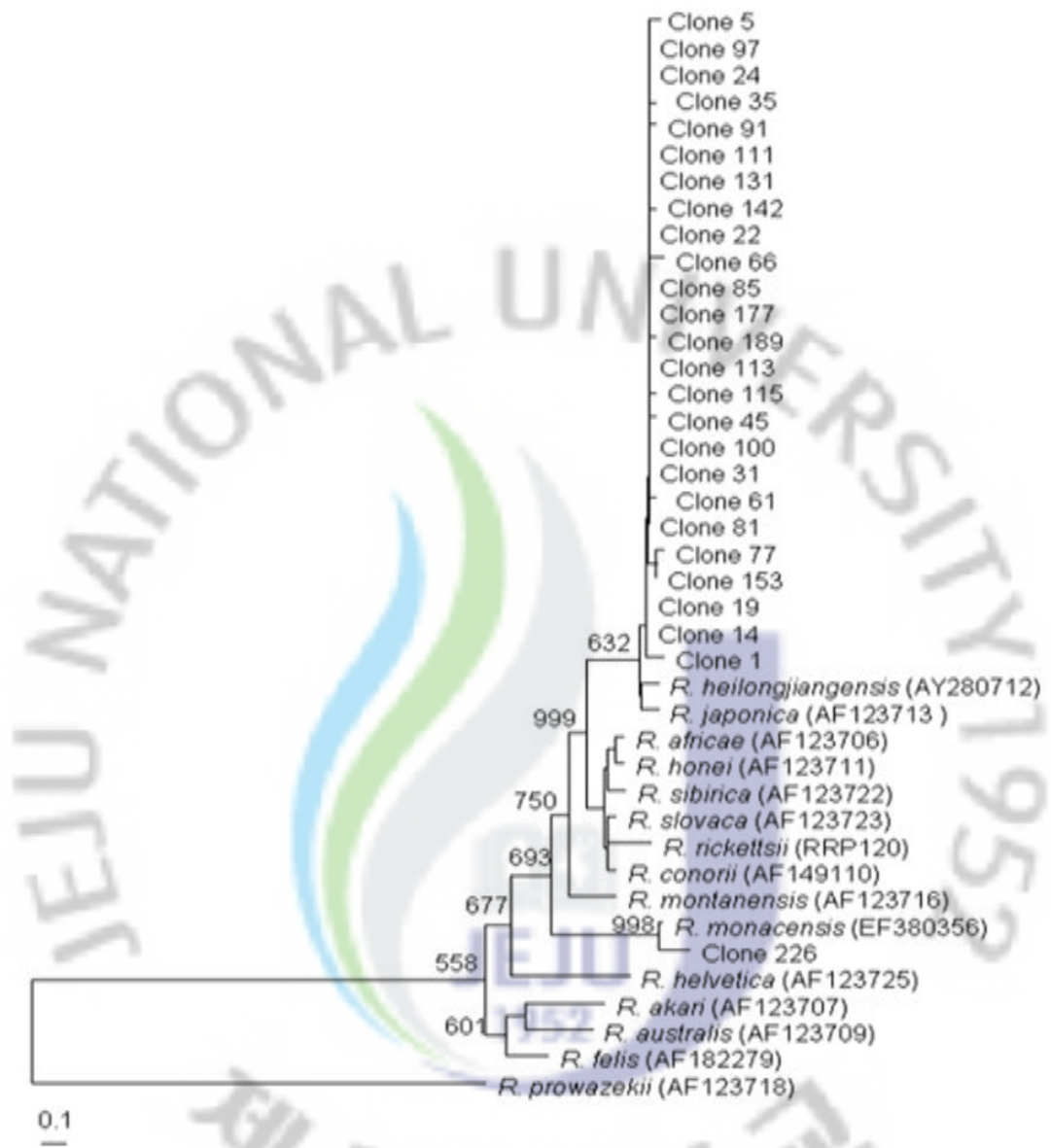


Fig. 18. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *ompB* gene sequences (the size of about 407bp) of various rickettsial strain and PCR amplified *ompB* products from tick. Phylogram were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

Table 7은 GenBank database에서 얻은 리켓치아 *gltA* 염기서열과 본 연구에서 얻은 *gltA* 클론 26개 중 10개의 클론을 비교한 것이다. 10개의 클론 중 9개의 클론(No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 *R. japonica*와 cluster를 형성하였으며, 98.7~99.3%의 유사도를 나타내었다. 10개의 클론 중 1개의 클론(No. 226)은 *R. monacensis*와 cluster를 형성하였으며, 99.7%의 유사도를 나타내었다. 각 클론들을 phylogenetic 분석을 수행한 결과 *R. japonica*와 유사도를 가지는 9개의 클론들을 포함하는 group 2로 clustering 되었다 (Fig. 19).



Table 7. Similarity matrix between partial *gltA* gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR *gltA* products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	94.6	99.3	99.3	100	96.0	100	98.3	98.0	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
2		-	93.6	94.6	94.6	96.0	94.6	93.6	94.0	94.0	93.6	93.6	93.6	94.0	94.0	94.0	96.3
3			-	98.7	99.3	95.0	99.3	97.7	97.3	98.0	97.7	97.7	97.7	98.0	98.0	98.0	94.6
4				-	99.3	96.0	99.3	99.0	98.7	99.3	99.0	99.0	99.0	99.3	99.3	99.3	95.7
5					-	96.0	100	98.3	98.0	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
6						-	96.0	95.0	94.6	95.3	95.0	95.0	95.0	95.3	95.3	95.3	99.7
7							-	98.3	98.0	98.7	98.3	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	95.7
8								-	99.0	99.7	99.3	99.3	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
9									-	99.3	99.0	99.0	99.0	99.3	99.3	99.3	94.3
10										-	99.7	99.7	99.7	100	100	100	95.0
11											-	99.3	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
12												-	99.3	99.7	99.7	99.7	94.6
13													-	99.7	99.7	99.7	94.6
14														-	100	100	95.0
15															-	100	95.0
16																	95.0
17																	-

1. Partial *gltA* of *R. africae* (RAU597336); 2. *R. akari* (RAU59717); 3. *R. conori* (RCU59730); 4. *R. japonica* (RJU59724); 5. *R. marmionii* (AY737684); 6. *R. monacensis* (DQ100163); 7. *R. sibirica* (RSU59734); 8. *gltA* PCR clone 1; 9. clone 5; 10. clone 14; 11. clone 35; 12. clone 45; 13. clone 81; 14. clone 85; 15. clone 97; 16. clone 100; 17. clone 226.

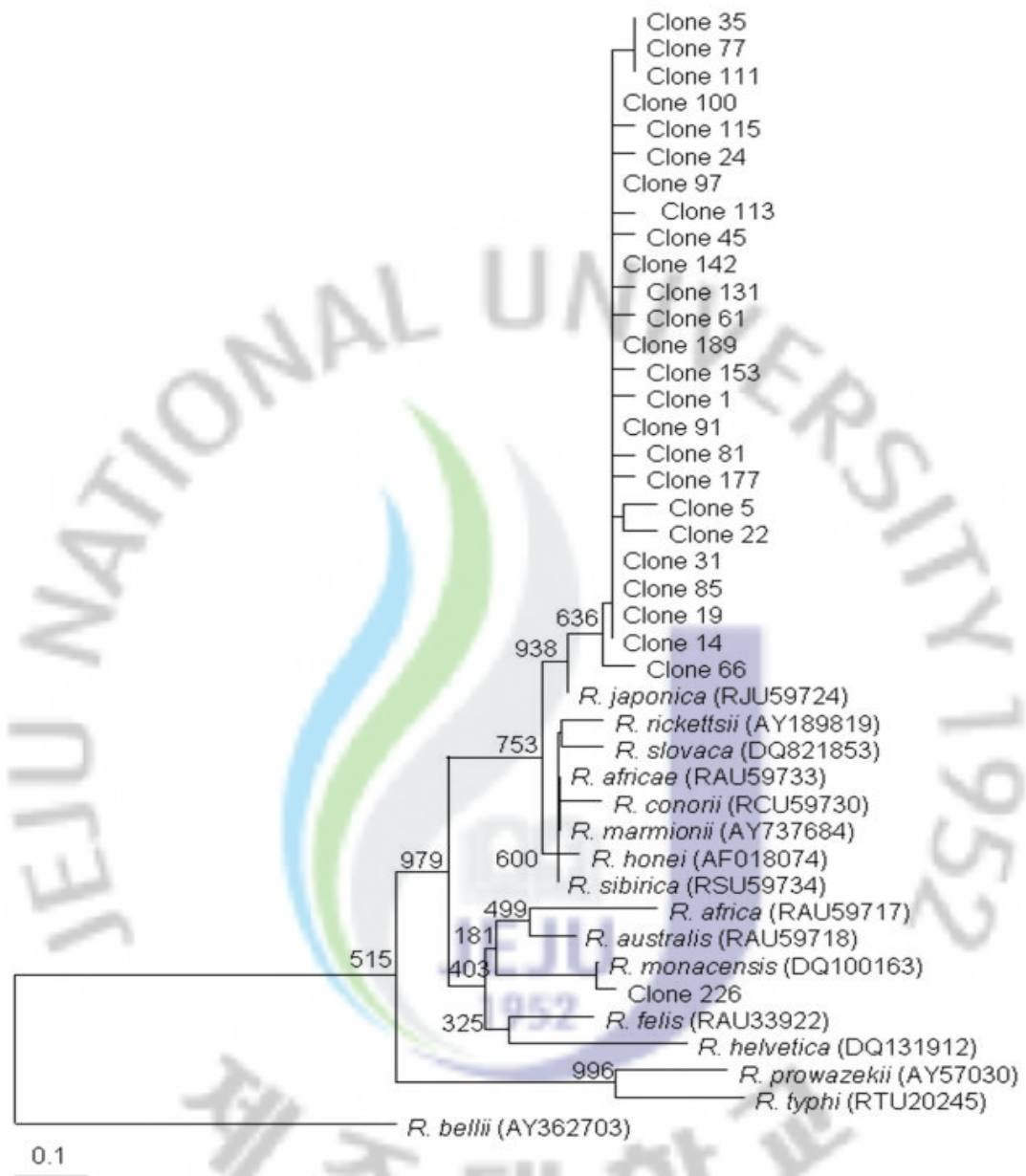


Fig. 19. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial *gltA* gene sequences (the size of about 330bp) of various rickettsial strain and PCR-amplified *gltA* products from tick. Phylogram were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

Table 8은 다양한 리켓치아 17 kDa antigen 염기서열들과 본 연구에서 얻은 25개의 17 kDa 양성 클론들 중 9개의 클론들을 비교한 것이다. 9개의 클론들(No. 1, 5, 14, 35, 45, 81, 85, 97, 100)은 모두 *R. marmionii*와 cluster를 형성하였으며 유전자 염기서열 유사도를 분석한 결과 *R. marmionii*와 cluster를 형성하고 있던 9개의 클론들은 99.4~100%의 유사도를 나타내었다. 각 클론을 phylogenetic 분석을 수행한 결과 *R. marmionii*와 유사도를 가지는 9개의 클론들을 포함하는 group 1으로 clustering 되었다(Fig. 20).

본 연구에서 검출된 홍반열균 리켓치아 핵산들을 분석한 결과 *ompB*, *gltA* 유전자 특성으로는 *R. japonica*에 가까우며, 17 kDa antigen 유전자 특성으로는 *R. manocensis*에 가까운 것으로 나타났다.



Table 8. Similarity matrix between partial 17 kDa antigen gene sequence of various rickettsial strains and nested PCR 17 kDa antigen products

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	93.6	99.1	98.3	98.0	94.2	99.1	97.4	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0
2		-	94.2	93.9	93.9	93.3	94.2	93.3	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9	93.9
3			-	98.6	98.3	94.8	99.4	97.4	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
4				-	99.1	94.5	98.6	98.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1
5					-	94.2	98.3	99.4	100	100	100	100	100	100	100	100
6						-	94.8	93.6	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2
7							-	97.7	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
8								-	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
9									-	100	100	100	100	100	100	100
10										-	100	100	100	100	100	100
11											-	100	100	100	100	100
12												-	100	100	100	100
13													-	100	100	100
14														-	100	100
15															-	100
16																-

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

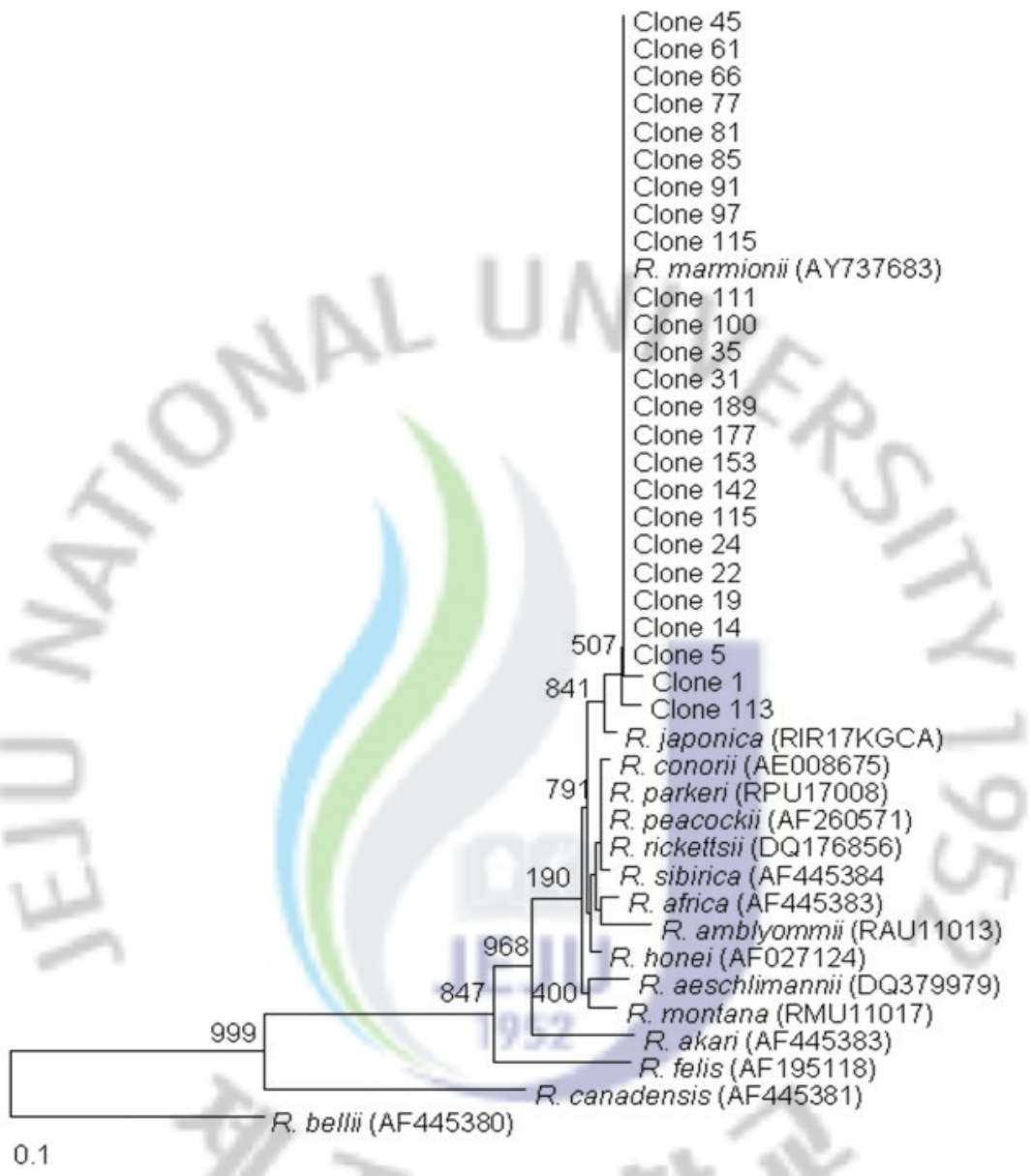


Fig. 20. Dendrogram representing phylogenetic relationships between partial 17 kDa antigen gene sequences (the size of about 360bp) of various rickettsial strain and PCR amplified 17 kDa antigen products from tick. Phylograms were generated by neighbor-joining analysis with 1,000 bootstrapped replicates.

V. 고찰

분류학상 진드기는 절지동물문(phylum Arthropoda)의 거미강(class Arachnida)에 속하며 학자에 따라서는 목(order) 또는 강(class)으로 분류하지만 최근에 들어서는 진드기 아강(subclass)으로 간주하는 경향이 강하다. 진드기류는 목 수준(ordinal rank)으로 간주해 왔으나 아강 수준(subclass rank)으로 조정하여 이 주장이 현재까지 받아들여지고 있다(23). 진드기아강은 연구자에 따라 Parsitiformes 목과 Acariformes 목으로 나누거나(28), Opilioacariformes, Parasitiformes, Acariformes로 구분하기도 한다(85). 그 후 다시 Notostigmata와 Anactinochitinosi를 묶어 Acari-Actinochaeta로 하고 Actinochitinosi를 Actinochaeta로 개칭하여 상목(superorder)의 범주에 넣었다(23). 또한, 명칭을 다르게 표현하고 있지만 크게 두 종류로 대별하고 있다(93). 이러한 진드기류의 분류는 Lindquist(1984)의 분지분석에 의하여 타당성이 입증되었다(94).

진드기목은 대부분 자유생활을 하고 있으며 그 중 일부는 기생생활을 하면서 여러 가지 질병들을 매개하고 있는데 현재 지구상에는 4만여 종이 보고되고 있지만 실제적으로는 대략 50만여 종으로 추산하고 있다. 진드기의 생활사는 불완전변태를 하며 알에서 부화하면 다리가 3쌍을 가진 유충(larva), 4쌍의 다리를 가진 약충(nymph), 성충의 단계를 거친다. 참진드기는 hard tick이라고 부르며 전체 발육기간이 일 년 이상이 걸리는데, 암컷은 흡혈 후 지상으로 떨어진 다음 흙 속 또는 돌이나 나무뿌리 등에 숨어서 알이 성숙될 때까지 수 주간 기다린다. 반면에 좀진드기(mites)는 전체 발육기간이 2~3주 또는 수개월이 소요된다. 진드기는 전 세계적으로 분포하고 있으며 서식처의 다양성과 각기 다른 생활 습성에 대한 적응 등 여러 가지 요인에 의하여 심한 형태적 변화를 가져와 진드기의 분류는 무척 복잡하고 어려워 현재까지도 분명한 개체 정립이 되지 않고 있다. 이러한 이유로 인하여 국내에 서식하고 있는 진드기의 분류에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이며, 제주지역에 대한 조사는 부분적으로 이루어지고 있을 뿐 전반적인 분포 현황은 아직까지도 분명하게 조사된 바가 없다.

한국산 진드기에 대한 분류학적 연구는 처음에 일본인 학자에 의하여 6종이 채집되었다고 보고되었으나 기록상의 부재, 도판 등의 근거 자료가 없었다.

그러나 채집 보고된 종류를 확인한 바 *Haemaphysalis bispinosa* 종이 전국적으로 분포하고 있다는 것을 보고하였지만, *H. bispinosa* 종과 *H. meumanni* 종은 *H. longicornis* 종과 동일하다는 것을 보고하였다(33). 그러나 *H. concinna* 종은 확인할 수가 없었으며 *Ixodes acuminatus* 종도 보고한 바가 있었으나, *I. persulcatus* 종의 착오임이 확인 되었다. *Boophilus decolatus* 종은 남쪽 지방 연안에 광범위하게 분포하고 있다고 하였으나, 본 종은 아프리카 지역에 분포한다고 알려져 있어, *B. microplus* 종이 오인된 것으로 보인다고 보고하였다. *Dermacentor variegatus*는 함경북도 지역에서 채집되었다는 보고를 하였지만, 확인하지는 못하였다고 보고하였다(33). *H. flava* 종은 국내에 서식하고 있다고 보고 하였으며, 본 조사에서도 3개체가 채집 확인되었다.

H. flava 종 특징은 Neumann이 처음으로 일본에서 사육되고 있는 가축 등에서 채집된 진드기를 대상으로 확인 보고하였으나, 다른 학자들은 적어도 *H. flava*와 *H. campanulata* 2가지 종이 포함되어 있다고 보고하였다. 그 이후에 Neumann은 보관된 진드기에서 상기 2종 이외에 *H. japonica*도 포함되어 있다는 사실을 발견하여 이러한 것들을 통칭하여 *H. flava*라고 동정하였다. 또한 *H. flava*를 처음에 기절 4번째 부위에 기다란 발톱을 가지고 있는 *H. flava* 숫컷을 입증하였는데, 나중에 짧은 형태도 언급하였다(95).

*H. longicornis*는 중국, 일본, 한국 등지에서 채집 확인된 *H. bispinosa*와 *H. neumanni*는 호주와 뉴질랜드에서 채집 확인된 *H. longicornis* 종과 구조적으로 매우 유사하지만 크기가 다르다는 것을 입증하였다.

지금까지 국내에서 진드기 유래 병원체 검출과 관련하여 가장 빈번하게 보고되고 있는 진드기는 *Haemaphysalis* 종이고, 다음으로 *Ixodes* 종에서 발견되고 있다. 특히, *Haemaphysalis* 종들 중에서 *H. longicornis*는 일반적으로 병원체들의 검출빈도가 높은 종으로 보고되고 있다(96, 97). 그러나 최근 보고에서는 국내 내륙지역의 여러 채집지역에서 몇몇 진드기 종들이 출현하였음에도 불구하고 제주도 지역 72곳의 채집지점에서 수집된 진드기 종들은 형태학적 패턴과 유전학적 동정결과에 기초하여 모두 *H. longicornis* 하나의 종으로만 확인되었다. 이러한 이유는 아마도 한국의 내륙지방과 지리학적으로 떨어진데다 특별한 기후조건에 따라 산이나 강, 수풀 등의 자연환경에서 *H. longicornis* 진드기가 환경에 대한 적응력과 번식력이 월등하여 제주도 지역 전역으로 확산되었을 것으로 추측된다.

하지만, 진드기의 채집지가 자연환경에 국한되었기 때문에 반추동물이나 애완동물 또는 야생동물들에 서식하는 진드기들도 동정해 보는 것이 필요하다고 판단된다. 진드기로부터 병원체들을 동정하기 위한 방법들은 real-time quantitative RT-PCR (TaqMan)이나 nested PCR에 의해 사용되어 왔다. 그러나 진드기로부터 병원체들의 16S rRNA 유전자들은 한국에서 거의 보고되어 있지 않지만 연구자들이 기술한 동정방법에서 사용된 ECC와 ECB 프라이머 세트는 단지 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 1차 프라이머로 사용되었고 이들 병원체의 유전종들을 검출하기 위해 nested PCR을 위한 주형 DNA로 사용되어졌다(96). 결국, 16S rRNA의 고유 유전자는 증폭산물은 검출하지 못하고 있는 실정이었다.

본 연구에서는 nested PCR 결과로 검출된 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 유전종들의 PCR 증폭에 의한 양성비율과 비교하여, 16S rRNA 유전자 양성율과는 정확하게 일치하지 않았다. 진드기 매개 병원체를 검출하기 위해 *TaqMan* PCR 방법이 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 속의 16S rRNA 유전자들을 확인하는데 높은 특이성을 나타내더라도 국내 진드기에서 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열을 분석하지 못하였다(96). 그러나 본 실험 결과에서는 nested PCR에 의한 증폭산물과의 양성비율과 정확하게 일치하지 않지만 새롭게 제작된 프라이머 세트를 사용하여 *Anaplasma*와 *Ehrlichia*의 16S rRNA 유전자들을 PCR로 검출하였고, 염기서열 분석을 통해 성공적으로 동정하였다. 본 실험결과에서도 대부분의 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 속의 16S rRNA PCR에 의한 증폭산물들은 전기영동 상에서 확인하였지만, 일부 보이지 않은 증폭산물들은 유전종 동정을 위한 nested PCR 결과에서 양성으로 판명되었다. 이러한 PCR 결과의 문제는 아마도 유전자 DNA를 정제하는 동안 다양한 진드기 풀링 수나 또는 발생단계별로 진드기의 크기가 일정하지 않아 감염된 병원체 DNA 양이 다르고 또한 PCR 반응액 조제과정에서 약간씩 달라질 수 있을 것으로 추측된다. 하지만 PCR을 위한 비용과 반응액의 조제시간을 고려한다면 *TaqMan* PCR 방법보다는 감도(sensitivity)와 특이성(specificity)이 뛰어난 *Taq* polymerase 효소를 선택한다면 PCR 증폭 효율은 보다 향상될 것이다. *H. longicornis*로부터 분석된 *Anaplasma*와 *Ehrlichia*의 16S rRNA 유전자 염기서열들은 계통발생학적 분석에 의해서 일본이나 중국, 미국, 유럽 등과 같은 다른 나라들의 병원체 관련 염기서열들과 비교하여 일부 genotype은 동일한 유전자 서열도 관찰되었지만, 대부분의 genotype들은 그룹들 간에 매우 높은 상동성으로 조사되었다.

또한 GenBank database에 있는 다른 염기서열들과도 분명한 차이가 있어 제주도 지역에서만 나타나는 고유한 진드기 매개 병원체들이라고 생각된다. *Haemaphysalis* 속 또는 *Ixodes* 속 진드기들은 *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. chaffeensis*, *E. canis*와 같은 진드기 매개 병원체들이 감염된 것으로 보고되고 있다(17, 97, 98). 본 연구결과에서 4 종의 병원체(*A. phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. centrale*, *E. chaffeensis*)들이 제주도 지역에서 동정되었는데, 특히 *A. phagocytophilum*에 감염된 진드기 유래 병원체들은 대부분 세 곳의 조사지역에서 편재하였고, 유충을 제외한 모든 발생단계의 진드기들에서 출현하였다. 이러한 결과는 이전 연구(97)에서 *H. longicornis* 유래 *A. phagocytophilum* 병원체가 제주도 지역에서 검출되었다는 결과와도 일치하였다. 결국, *H. longicornis*는 이 지역에서 발견된 *A. phagocytophilum* 감염과 관련하여 역학적으로 중요한 벡터(vector)인 것으로 판단되었다. *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*는 canine ehrlichiosis와 HME의 병원체로 알려져 왔고 이 중, *E. chaffeensis*는 한국의 내륙지역인 서울과 경기 지역 및 비무장지대로부터 수집된 *H. longicornis*에서 거의 검출되었다(11, 98). 그러나 최근까지 *E. chaffeensis* 감염은 사람이나 애완동물 그리고 다른 진드기 종에서 아주 드물게 보고되어 왔다(99, 100). 결과적으로 본 연구에서 제주지역에서 가장 우점종으로 확인된 *A. phagocytophilum*들과는 대조적으로, *E. chaffeensis* 병원체들은 위에서 언급한 이전 연구결과들과 일치하여 흔하게 분포하지 않은 것으로 조사되었다. *A. bovis* 감염은 소와 같은 반추동물에서 열이나 림프절병증, 우울증, 조건화 상실과 같은 증상들과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다(18). 본 연구에서 5개가 검출된 *A. bovis*는 전체 506개의 플링된 DNA에서 16S rRNA PCR과 nested PCR에 의해 *A. phagocytophilum* 증폭단편을 검출하여 염기서열 분석을 통해 동정되었다. 국내에서는 *H. longicornis*에서 *A. bovis* 염기서열과 상동성이 높은 병원체가 경기지역에서 동정되었다는 보고가 있다(20). 가까운 일본의 경우, *A. bovis*는 2001년과 2002년 동안 일본의 Hokkaido와 Honshu 섬 지역에서 사슴(deer)에서 검출된 이후에 최근 2006년에는 Okinawa의 Yonaguni 섬 지역에서 사육하는 소 혈액에서 처음으로 발견되었다(18, 101).

비록 *A. bovis*에 감염된 매개체가 다른 시기에 다른 지역에서 발견되고 역학적으로 명백한 증거는 제시할 수 없지만 감염된 진드기 병원체들은 그들의 생활사를 통해 또는 기후변화와 생태학적 요인으로 포유동물 숙주들 간의 진드기 매개로 인하여 병원체의 전파와 이로 인해 지역 간 이동에 의해 진드기 유래 병원체 감염이 확산될 수 있을 것으로 추측된다.

본 연구에서도 *A. bovis*의 검출비율은 낮지만 이들이 한 곳에 국한되지 않고 여러 채집 지역에서 확인되었다는 지역적으로 반추동물과 야생동물들이 서식하는 환경에서 이들 병원체들의 감염여부와 병원체 확산에 주목해야 할 것이다. 결국, 검출된 진드기 유래 병원체들 간의 염기서열과 계통발생학적 분석조사는 각각의 group과 genotype에서 유전적 상동성이 높거나 또는 동일하게 분류된 병원체를 가진 숙주 진드기들이 자연환경에서 번식하고 토착화 되어 다른 숙주동물로 병원체를 전파하거나 또는 사람이나 동물에 감염을 일으킬 것으로 판단된다. 따라서 제주도 지역에서 서식하는 *H. longicornis*에서 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 유전종들의 존재와 그들의 유전적 다양성을 제시하였다. 앞으로의 연구는 사람이나 야생동물들에서 동정된 *A. phagocytophilum*과 *E. chaffeensis*의 16S rRNA의 염기서열과 계통발생학적 분석에 기초한 역학적인 특성들을 연구하고, 이들 원인균들에 대한 병인기전에 관한 특성을 밝히는 것이 필요하다고 사료된다.

리켓치아는 자연에서 이, 진드기, 벼룩 등의 흡혈성 절지동물에 기생하고 이들을 매개로 하여 사람에게 전파되는 질환으로 사람에게 감염되면 심각한 질병을 야기하며(29), 이러한 질환은 그 원인이 되는 리켓치아 종에 따라 여러 그룹으로 나누어진다. 현재까지 알려진 리켓치아 종은 약 25종으로(12), *R. japonica*는 일본홍반열(Japanese Spotted Fever)을 일으키는 병원체이며 1984년에 일본에서 처음 분리 보고가 있었으며, 그 이후로 많은 환자가 보고되었다(19, 62). 국내에서는 *H. longicornis* 진드기에서 그 세균의 핵산 존재가 확인되었으며(34), 국내에서는 *H. longicornis* 진드기에서 핵산의 존재가 확인되었다(25). 최근 환자에서도 분리된 바가 있다(10). *R. monacensis*는 독일의 English Garden에서 채집된 *Ixodes ricinus* 진드기에서 처음 분리가 확인되었다. Slovakia와 Bulgaria 등지에서 *I. ricinus* 진드기에서 분리 보고도 있었다(94). 최근에는 Algeria에서 채집된 *I. ricinus* 진드기에서 분리 보고도 있었으며(12), Spain에서는 환자의 혈액에서 균주를 분리하였다(63).

Rickettsia marmionii (named in honor of the Australian rickettsiologist marmion)는 Flinders Island Spotted fever로 *R. honei*의 strain으로 알려져 있으며(39) 오스트레일리아 동부지역의 환자에서 분리되었다(7, 61).

본 연구에서는 제주지역에서 채집된 진드기의 동정을 통해 진드기 종의 분포를 확인하고 리켓치아 특이 유전자를 PCR 방법으로 검출한 후 염기서열을 분석하여 리켓치아의 존재 유무 확인과 균종의 규명에 초점을 맞추었다.

리켓치아 감염 여부를 확인하기 위하여 채집된 진드기 중 *H. longicornis* 종을 1마리에서 15마리씩 모아서 247개의 pool을, *H. flava*를 각각 1마리씩 3개로 나누어 총 250개의 시료를 만들어서 분자생물학적인 실험을 수행하였다. *ompB* 유전자를 타겟으로 하는 프라이머를 사용하여 Nested PCR을 수행한 결과, *H. longicornis* 시료에서 90.7%의 감염율을 보였으며, *H. flava* 시료에서는 전부 감염되지 않았다. 본 실험의 결과로 홍반열균 리켓치아의 감염이 일어날 수 있다는 가능성을 알 수 있었다. 그렇지만 이번 실험에 사용된 *H. flava* 진드기는 개체수가 적어 감염율을 정확하게 확인하기는 부족한 면이 있다고 할 수 있다. 따라서 향후에 *H. flava* 진드기의 개체수를 확보하여 확인할 필요가 있다고 사료된다.

H. longicornis 진드기에서 추출한 247개의 시료 중 *ompB*-PCR에서는 224개의 양성을 보인 것들 중에서 26개를 선별하여 PCR을 실시하고 그 산물을 클로닝하여 염기서열을 분석한 후 GenBank database에서 얻은 다양한 리켓치아 partial *ompB*, *gltA*, 17 kDa antigen 유전자 염기서열과 비교 분석하였다.

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

두 번째로 기존에 알려진 리켓치아 partial *gltA* 유전자의 염기서열들과 *gltA*-PCR 산물 클론들의 염기서열을 비교하였다. 총 26개의 클론들 중 25개의 클론들은 *R. japonica*와 가장 높은 유사도(98.7~99.3%)를 보였으며, *R. marmionii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. monacensis*, *R. sibirica*의 염기서열과 각각 98.0~98.7%, 98.0~98.7%, 93.6~94.0%, 97.3~98.0%, 94.6~95.3%, 98.0~98.7%의 유사도를 보였다.

25개의 클론들 중 2개의 클론들(No. 5, 22)은 *R. japonica*와 98.7%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.0%의 유사도를 보였으며, 14개의 클론들(No. 24, 35, 45, 61, 66, 77, 81, 111, 113, 115, 131)은 *R. japonica*와 99.0%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.3%의 유사도를 보였으며, 9개의 클론들(No. 14, 19, 85, 91, 97, 100, 142, 153, 177, 189)은 *R. japonica*와 99.3%의 유사도를 보인 반면, *R. marmionii*와는 98.7%의 유사도를 보였다. 그리고 26개의 클론들 중 1개의 클론(No. 226)은 *R. monacensis*와 99.7%의 높은 유사도를 나타내었다.

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

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

17 kDa antigen에서는 *R. japonica*와 98.6~99.1%, *R. marmionii*에서는 99.4~100%의 유사도를 나타내어 본 연구에서는 제주에서 채집된 진드기의 DNA를 이용하여 PCR 방법을 통해 제주지역에서 채집된 진드기가 가지고 있는 리켓치아에 대하여 확인했는데 대부분의 진드기가 홍반열균에 감염되어 있음을 확인하였다.

현재 제주지역의 진드기에서 리켓치아 검출에 관한 조사 보고는 없으나 열성질환자를 대상으로 Indirect immuno fluorescence assay(IFA)를 사용하여 혈청학적 조사를 한 결과 환자에서 *R. japonica*에 대한 항체를 보유한 환자가 있음이 확인되었다(19). 이러한 결과를 살펴볼 때에 제주지역에 서식하는 *H. longicornis* 진드기가 병원체의 매개체 역할을 할 것으로 사료된다. 또한, 본 연구에서 검출된 홍반열균 리켓치아 핵산들을 분석한 바 *ompB*, *gltA* 유전자 특성으로는 *R. japonica*에 가까우며, 17 kDa antigen 유전자 특성으로는 *R. marmionii*에 가까운 것으로 나타나 제주지역에 분포하는 리켓치아가 새로운 종일 가능성이 있음을 시사하고 있다. 하지만 제주지역에 분포하는 홍반열균 리켓치아를 명확하게 분류하기 위해서는 보다 신뢰성 있는 유전자를 분석하는 것이 필요하며, 또한 균주 분리를 하는 것이 반드시 필요할 것으로 사료된다.

이러한 결과들을 종합하여 보면 국내에서의 홍반열에 대한 지역별 항체 양성율의 조사가 전혀 이루어지지 않아 국내 발생을 추정하기는 어렵지만 환자가 발생한 주변 지역 주민들에 대하여 항체 검사를 하는 것이 필요하다고 사료된다. 또한, 계절적으로 여름철을 기점으로 진드기의 서식 환경이 좋은 조건을 가지고 있는 시골에서 봄과 가을에 많이 발생할 것이 예상된다. 제주지역은 기온이 높으므로 다른 지역과는 달리 진드기의 밀도가 높기 때문에 환자 발생 가능성이 더 많을 것으로 사료된다. 현재 진드기 매개 질환 중 쓰쓰가무시증은 전국적으로 많이 발생하고 있어 이에 대한 역학조사가 많이 이루어지고 있지만 일본홍반열과의 임상상이 약간 상이하므로 일본홍반열 발생에 대한 정확한 확인을 위해서는 역학조사가 필요하다.

VI. 요약

본 연구를 통해 제주지역에서 채집된 진드기는 참진드기과(family Ixodidae), 피참진드기속(genus *Haemaphysalis*)에 속하는 개피참진드기(*Haemaphysalis flava*)와 작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis*) 등 2종이었다.

조사기간 동안 총 72개 지점에서 3,089개체가 채집되었는데, 그 중 *H. flava* 3개체, 그리고 나머지 3,086개체는 모두 *H. longicornis* 였다. 또한 *H. longicornis*는 조사지점 모두에서 채집되었으나, *H. flava*는 3개 지점(동경 126° 33′ 29.0″, 북위 33° 25′ 36.4″, 동경 126.17′ 15.8″, 북위 33° 20′ 32.8″, 동경 126° 27′ 45.7″, 북위 33° 20′ 56.8″)에서 각각 1개체씩 3개체가 드물게 채집되었다.

*H. longicornis*종의 발육 단계에 따른 계절별 채집 비율을 보면, 성충 암컷의 경우에는 4월부터 8월까지 채집되었지만 5월과 6월을 제외하고는 점차적으로 증가하였다. 성충 수컷은 4월부터 8월까지 점진적인 증가를 나타내었으며, 자충은 전 조사기간에 걸쳐 다른 발육 단계의 개체보다 훨씬 높은 채집 비율을 보이면서 5월에 최고치를 나타내었다. 그리고 유충은 8월에 나타나기 시작하였다.

제주지역에서 수집한 총 1,395마리의 *H. longicornis* 진드기를 대상으로 16S rRNA 유전자에 기초한 nested PCR을 시행하여 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 종의 감염존재를 확인하였다. 진드기 매개 병원체들을 검출하기 위한 PCR 방법에서 주형 DNA는 506개의 진드기 풀(pools)에서 추출하여 실험에 이용하였다. PCR 증폭산물의 염기서열분석에 의해 8개의 *Anaplasma* 속과 6개의 *Ehrlichia* 속이 동정되었다.

Nested PCR과 염기서열분석에 의해 동정된 유전종들의 분포는 *A. phagocytophilum*이 27(1.9%)개로 가장 우세하게 분포하였고 다음으로 5개(0.4%)의 *A. bovis*, 4개(0.2%)의 *E. chaffeensis*, 1개(0.1%)의 *A. centrale*순이었다.

16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 계통발생학적 분석에서 8개의 *Anaplasma* 속(상동성, 99.4% 이상)은 GenBank database에 있는 *A. marginale* 균종들(AF309867, AF414874, FJ226454)과, 6개의 *Ehrlichia* 속(상동성, 99.5% 이상)은 *Ehrlichia* sp. (DQ324547)와 가장 높은 유사성을 보였다.

3개의 *Anaplasma* 유전형인 *A. phagocytophilum* (A group), *A. bovis* (B group), *A. centrale* (genotype C), 그리고 1개의 *Ehrlichia* 유전형인 *E. chaffeensis* (D group)는 GenBank database에서 *Anaplasma*와 *Ehrlichia* 관련된 염기서열들과 비교하여 동정하였다.

A group에 속하는 27개의 *A. phagocytophilum* 클론(clone)들은 7개의 유전형(genotype)으로 분류되었다. 특히, 염기서열이 일치하는 3개의 클론을 포함하는 genotype A6는 미국에서 승인된 *A. phagocytophilum* (AY055469)과 일치하였다. 반면에 A1, A2, A3, A4 genotype들의 염기서열 범위는 99.6% 이상으로 매우 높은 상동성을 나타냈다. genotype B2는 한국에서 승인된 *A. bovis*와 99.7%로 아주 높은 상동성을 보였고, genotype D1은 GenBank database에서 미국(M73222), 중국(AF147752), 한국 (AY350424)에서 승인된 *E. chaffeensis* 균주들과 99.7%의 높은 상동성을 나타내었다.

이러한 결과로 보면 제주도 지역의 자연환경에서 가장 많이 분포하는 *H. longicornis* 진드기에서 동정된 *A. phagocytophilum* (genotype A1-A7)은 거의 모든 조사지역에서 편재하였고, 고유의 진드기 매개 병원체인 리켓치아 유전형들이 염기서열 결정과 계통발생학적 분석을 통하여 평가되었다.

채집된 진드기에서 발육단계별로 진드기들을 총 250개로 pooling하여 DNA를 추출하여 홍반열군(Spotted fever group) 리켓치아에 특이하게 반응하도록 제작한 *ompB*, *gltA*, 17 kDa antigen 프라이머를 이용하여 nested PCR을 수행하였다.

250개의 시료 중 224개의 시료(90.7%)에서 *ompB*-PCR 양성 산물을 확인하였으며, 224개의 시료 중에서 26개의 시료를 선별하여 *gltA*, 17 kDa antigen PCR을 수행한 결과, 각각 26개(100%), 25개(96.2%)의 시료에서 양성 반응을 보였다. PCR 산물들을 클로닝하여 GenBank database에서 얻은 다양한 리켓치아 염기서열과 비교한 결과 *ompB*, *gltA*와 높은 유사성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Kranz GW. A manual of acarology. Oregon State University Bookstores. Corvallis. Second Edition. p. 335(1978).
2. Kranz GW. A manual of acarology (2nd edition). Oregon State University Bookstores. Corvallis. Second Edition. p. 509(1978).
3. Kim DH, Song SB. Epidemiology studies on the mites in food. Department of Preventive Medicine and Parasitology. Vol. 1(1): 37-40(1968)
4. Han TW, Kim SK, Jeon Y. The classification and distribution of Korean cattle tick. Agri. Exp. Res. Rept. 9(3): 91-103(1996).
5. Lee SO, Na DK, Kim CM, Li YH, Cho YH, Park JH, Lee JH, Eo SK, Klein TA, Chae JS. Identification and prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* infection in *Haemaphysalis longicornis* ticks from Korea by PCR sequencing and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene. J. Vet. Sci. 6:151-155(2005).
6. Kim, SH. Study on the ticks of Cheju-Do. The Korean Journal of Parasitology Vol. 8. No. 2: 51-57(1970).
7. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganizaion of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Erllichia* 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. 51: 2145-2165(2001).
8. Chae JS, Yu do H, Shringi S, Klein TA, Kim HC, Chong ST, Lee IY, Foley J. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-Do near the DMZ, Korea. J. Vet. Sci. 9: 285-293(2008).

9. Chae JS, Kim CM, Kim EH, Hur EJ, Klein TA, Kang TK, Lee HC, Song JW. Molecular epidemiological study for tick-borne disease (*Ehrlichia* and *Anaplasma* spp.) surveillance at selected U.S. military training sites/installations in Korea. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 990: 118-125(2003).
10. Chang WH, Kim IS, Choi MS, Han MJ, Seong SY, Park KH, Kim IJ, Kee SH. Seroepidemiological survey of tsutsugamushi disease in Korea. *Korean J. Infect. Dis.* 26: 181-188(1993).
11. Raoult D, Drancourt M. Taxonomic position of the rickettsiae: current knowledge. *FEMS Microbiol. Rev.* 13(1): 13-24(1994).
12. Anderson BE, Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. *J. Bacteriol.* 171: 5199-5201(1989).
13. Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1166: 1-11(2009).
14. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein *rompB* (*ompB*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1449-1455(2000).
15. Sekeova Z, Fournier PE, Rehacek J. Characterization of a new spotted fever group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *J. Med. Entomol.* 37(5): 707-713(2000).
16. Williams SG, Sacci JB, Schriber ME, Anderson EM, Fujioka KK, Sorvillo FJ, Barr AR, Azad AF. Typhus and typhus like rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles county, California. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1758-1762(1992).
17. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial disease in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32(6): 897-928(2001).
18. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigm of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 694-719(1997).
19. Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infection. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1102-1110(1995).

20. Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79: 325-39(1998).
21. Inokuma H, Ohno K, Onishi T, Raoult D, Brouqui P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 815-817(2001).
22. Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, Park MY, Dumler JS, Chae JS. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3082-3085(2002).
23. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1102-1109(2006).
24. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* 31: 554-560(2003).
25. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1828-1834(2005).
26. Uchida T, Yan Y, Kitaoka S. Detection of *Rickettsia japonica* in *Haemaphysalis longicornis* ticks by restriction fragment length polymorphism of PCR product. *J. Clin. Microbiol.* 33: 824-828(1995).
27. Shimada Y, Inokuma H, Beppu T, Okuda M, Onishi T. Survey of Ixodid tick species on domestic cats in Japan. *Vet. Parasitol.* 111: 231-239(2003).
28. Kim CM, Yi YH, Yu DH, Lee MJ, Cho MR, Desai AR, Shringi S, Klein TA, Kim HC, Song JW, Baek LJ, Chong ST, O'Guinn ML, Lee JS, Lee IY, Park JH, Foley J, Chae JS. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5766-5576(2006).

29. Sun J, Liu Q, Lu L, Ding G, Guo J, Fu G, Zhang J, Meng F, Wu H, Song X, Ren D, Li D, Guo Y, Wang J, Li G, Liu J, Lin H. Coinfection with four genera of bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* ticks from China. Vector Borne Zoonotic Dis. pp. 791-795(2008).
30. Jilintai, Seino N, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Matsumoto K, Yokoyama N, Inokuma H. Molecular survey for *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in a pastureland where sika deer appear in Hokkaido, Japan. Japan J. Infect. Dis. 62: 73-75(2009).
31. Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, Park MY, Dumler JS, Chae JS. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. J. Clin. Microbiol. 40: 3082-3085(2002).
32. Sun J, Liu Q, Lu L, Ding G, Guo J, Fu G, Zhang J, Meng F, Wu H, Song X, Ren D, Li D, Guo Y, Wang J, Li G, Liu J, Lin H. Coinfection with four general of bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* ticks from China. Vector borne Zoonotic Dis. 8: 791-795(2008).
33. Kim CM, Kim MS, Park MS, Park JH, Chae JS. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. Vector Borne Zoonotic Dis. 3: 17-26(2003).
34. Lee JH, Park HS, Jung KD, Jang WJ, Koh SE, Kang SS, Lee IY, Lee WJ, Kim BJ, Kook YH, Park KH, Lee SH. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. Microbiol. Immunol. 47: 301-304(2003).
35. Yu DH, Li YH, Yoon JS, Lee JH, Lee MJ, Yu IJ, Chae JS, Park JH. *Ehrlichia chaffeensis* infection in dogs in South Korea. Vector Borne Zoonotic Dis. 8: 355-358(2008).

36. Akasawa. The ticks parasitic on cattle in Korea. Japan Agri. Soc. Asso. Proc. pp. 1-2 (1928).
37. Kishida S. Tick from a squirrel. Zool. Mag. Japan. 34(410): 962-964(1992).
38. Itagaki S. Ticks parasitic on domestic animals of Asia. pp. 1-97(1944).
39. Noh YT. A taxonomical study on tick in Korea I. Kor. J. Zool. 8(2): 105-108(1965).
40. Noh YT. Bird Ticks in Korea(I). Kor. J. Zool. 12(3): 39-40(1969).
41. Soltys MA. A review of studies on immunization against protozoan diseases of animals. J. Trop. Med. Parasitol. 24(3): 309-322(1973).
42. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. : ethiological agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 494-497(1984).
43. Donatien A, Lestoquard A. Existence in algeric dume rickettsia du chien. Bull. Soc. Pathol. Exot. 28: 418-419(1935).
44. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minesota and Winsconsin dogs. J. Clin. Microbiol. 34: 44-48(1996).
45. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davies JP. Lyme disease a tick borne spirochetosis. Science. 216: 1317-1319(1982).
46. Steer AC. Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321: 586-596(1989).
47. Assous M, Postic D, Baranton G. Clinical and epidemiological implications of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato taxonomy. Proceeding of the International Symposium on Lyme Disease in Japan. pp. 148-162(1994).
48. Raoul D, Hechemy KE, Baranton G. Crossreaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 27: 2152-2155(1989).
49. Schimid GP. The Global distribution of Lyme disease. Yale J. Biol. Med. 57: 628-632(1984).

50. Hoogstraal H, Clifford CM, Saito Y, Keirans JE. *Ixodes* (Partipalpiger) *ovatus* Neumann, subgen, nov.: identify, hosts, ecology, and distribution (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 10: 157-164(1973).
51. Miyamoto K, Nakao M, Uchikawa K, Fujita H. Prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in Ixodid ticks of Japan, with special reference to a new potential vector, *Ixodes ovatus* (Acari:Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 29: 216-220(1992).
52. Ewing C, Scorpio A, Nelson DR, Mather TN. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 755-758(1994).
53. Marconi RT, Rubke L, Hauglum W, Garon CF. Species-Specific identification and distinction between *Borrelia burgdorferi* genomic groups by using 16S rRNA-Directed Oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 30: 628-632(1992).
54. Adam T, Gassmann GS, Rasiah C, Gobel UB. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect. Immun.* 59: 2579-2585(1991).
55. Marconi RT, Garon CF. Identification of a third genomic group of *Borrelia burgdorferi* through signature nucleotide analysis and 16S rRNA sequence determination. *J. Gen. Microbiol.* 138: 533-536(1992).
56. Park KH, Lee SH, Won WJ, Jang WJ, Chang WH. Isolation *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease from Ixodes ticks in Korea. *J. Kor. Microbiol.* 27: 307-312(1992).
57. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40(6): 2176-2181(2002).
58. Orloski KA, Hayes EB, Campell GL, Dennis DT. Surveillance for Lyme disease United States, 1992-1998. *MMWR. CDC. Surveill. Summ.* 28: 49(3): 1-11(2000).
59. Treadwell TA, Holman RC, Clarke MJ, Krebs JW, Paddock CD, Childs JE. Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1993-1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(1-2): 21-26(2000).

60. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 42: 3164-3168(2004).
61. Pietila J, He Q, Oski J, Viljanen MK. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by light cycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. J. Clin. Microbiol. 38(7): 2756-2759(2000).
62. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. Methods. Review. 25(4): 430-442(2001).
63. Anacker RL, Pickens EG, Lackman DB. Details of the ultrastructure of *Rickettsia prowazekii* grown in the chick yolk sac. J. Bacteriol. 94: 260-262(1967).
64. Chang WH, Choi MS, Park KH, Lee WK, Kim SY, Choi IH, Kee SH, Kim IS, Choi KW, Woo JH, Song YW, Choi DH, Lee JH, Kim WY, Kee JI, Park YS, Kang SK, Park SK, Yoon SY, Kim JW, Chung SS, Kim BC. Seroepidemiological survey of tsutsugamushi in Korea, 1987 and 1988. J. Korean Soc. Microbiol. 24: 185-195(1989).
65. Chang WH, Kim IS, Choi MS, Choi IH, Kee SH, Kim SY, Lee WK, Choe KW, Choi DH, Lee JH, Yoon, YT, Kim WY, Kee JI, Park YS, Kang SK, Park SK, Yoon SY, Kim JW, Chung SS, Kim BC, Kang JS. Seroepidemiological survey of murine typhus in Korea, 1987 and 1988. J. Korean Soc. Microbiol. 24: 399-409(1989).
66. Chang WH. Occurrence of tsutsugamushi disease and prototypes of *Rickettsia tsutsugamushi* in Korea. J. Korean Med. Assoc. 31: 601-607(1988).
67. Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH. Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. J. Clin. Microbiol. 28: 685-688(1990).
68. Carl M, Tibbs CW, Dobson ME, Paparello S, Dasch GA. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 161: 791-793(1990b).

69. Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS, Choi MS, Kim IS, Jang WJ. Evaluation of PCR-Based Assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12: 759-763(2005).
70. Choi YJ, Jang WJ, Kim JH, Ryu JS, Lee Sh, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. Spotted fever group and typhus group rickettsiosis in humans, South Korea. *Emerg. Infec. Dic.* 11: 237-244(2005).
71. Chung MH, Lee Sh, Kim MJ, Lee JH, Kim ES, Lee JS, Kim MK, Park MY, Kang JS. Japanese spotted fever, South Korea. *Emerg. Infec. Dis.* 12(7): 1122-1124(2006).
72. Dib L, Bitam I, Bensouilah M, Parola P, Raoult D. First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.*(2009).
73. Durden, Lance A, James E, Keirans. Nymphs of the genus *Ixodes* (Acari: ixodidae) of the United States: taxonomy, identification key, distribution, hosts, and medical/veterinary importance. Entomological Society of America, Lanham, M.D. 95(1996).
74. Evans GO. Principles of acarology. CAB International, UK. p. 563(1952).
75. Neumann LG. Revision de la familie des. 2e momoire. *Mem. Soc. Zool.* 103(4): 324-420(1897).
76. Nuttall GH, Warburton C. Ticks a monograph of the Ixodoidea. Part III. The Genus *Haemophysalis*. Camb. pp. 394-550(1915).
77. Neumann LG. Notes sur les Ixodidae. III. *Arch. Parasitol.* 9(2): 225-241(1905).
78. Neumann LG. Ixodidae. *Das Tierreich*, 26. Berlin. p. 169(1911).
79. Kishida K. Notes on the ticks of the family Ixodidae parasitic on Japanese mammals (Artiodactyla: Bunodontia). *Zool. Mag.* 34: 852-856(1922b).
80. Kishida K. Notes on the ticks of the family Ixodidae parasitic on Japanese mammals (Artiodactyla: Bunodontia). *Zool. Mag.* 34: 846-854(1922a).
81. Nakamura T, Yajima A. On morphology and distribution of the family Ixodidae in Japan, particularly species parasitizing cattle and horses. *Rep. Gov. Exp. Sta. Anim. Hyg.* 17: 133(1937).

82. Kishida K. Notes on the Acarina mites and ticks, from the island of Formosa collected in August. *Lansania. Japan.* 7(69): 129-144(1935).
83. Keegan HL, Toshioka S. Ixodid ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu Islands. *406th Med. Gen. Lab.* 37. pp. 42-43(1957).
84. Warburton C, Nuttall GH. On new species of Ixodidae with a note on abnormalities observed in ticks. *Parasit.* (2): 57-76(1909).
85. Saito Y. Studies on Ixodid ticks, I. On ecology, with reference to distribution and seasonal occurrence of Ixodid ticks in Niigata Prefecture. *Japan Acta. Med. Biol.* (3): 193-209(1959b).
86. Saito Y, Kubota M, Yajima A, Watanabe T, Kamino K. Studies on Ixodid ticks, VIII. On *Haemaphysalis bispinosa* Neumann, 1897 in Niigata Prefecture, Japan Acta. with some supplementary observation on bovine piroplasmiasis. *Acta. Med. Biol.* 13(2): 143-159(1965).
87. Neumann LG. Revision de la famille des Ixodides. 4e memoire. *Mem. Soc. Zool.* 14(2): 249-372(1901).
88. Hoogstraal H. Tick-borne Hemorrhagic fevers, encephalitis, and typhus in U.S.S.R. and Southern Asia. *Exper. Parasitol.* 21: 98-111(1967).
89. Donitz W. Die Zecken des Rindes als Krankheitsübertrager, S.B. *Ges. Naturf. Berlin.* 4: 105-134(1905).
90. Warburton C. On some new and obscure species of the genus *Haemaphysalis* of the Ixodidae. *Pro. Camb. Philos. Soc.* 14: 508-519(1908).
91. Nuttall GH, Warburton C. Ticks a monograph of the Ixodoidea. Part II. Ixodidae Sec. I. Classification Sec. II. The Genus Ixodes. pp. 165-348(1911).
92. Kranz GW. A manual of acarology. Oregon State University Bookstores. Corvallis (1970).
93. Kranz GW. A manual of acarology. Oregon State University Bookstores. Corvallis. Second Edition(1978).
94. Kim YW, Min CH, Cho MK, Cho CS, Yoon SI, Cho MK, Kang JS, Chang WJ. Murine typhus and scrub typhus in Kangwon-Do in Korea. *Korean J. Infec. Dis.* 20: 105-116(1988).

95. Lindquist EE. Current theories on the evolution of major groups of Acari and on their relationship with other groups of Arachnida. In Griffiths and Bowman. *Acarology IV*. (1): 28-62(1984).
96. Ooshiro M, Zakimi S, Matsukawa Y, Katagiri Y, Inokuma H. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan *Vet. Parasitol.* 154: 360-364(2008).
97. Furuya YT, Katayama T, Toshida Y, Kaio I. Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 487-489(1995).
98. Lee JS, Ahn CR, Kim SK, Lee MH. Thirteen cases of rickettsial infection including nine cases of tsutsugamushi disease first confirmed in Korea. *J. Korean Med. Assoc.* 29: 430-438(1986).
99. Park JY, Lee WY, Cho SN, Park YS, Park KS, Youn HJ, Kang YB, Koh CM. Isolation and cultivation of a *Coxiella burnetii* strain from new milk of dairy cows in Korea. *J. Korea Soc. Microbiol.* 28: 285-293(1993).
100. Pang H, Winkler HH. Analysis of the peptidoglycan of *Rickettsia prowazekii*. *J. Bacteriol.* 176(3): 923-926(1994).
101. Schattner A, Leitner M, Keysary A, Geltner A. Fatal seronegative rickettsial infection diagnosed by the polymerase chain reaction. *Am. J. Med. Sci.* 303: 392-394(1992).

감사의 글

항상 자애로우심과 따뜻한 마음으로 부족한 저에게 논문을 완성할 수 있도록 많은 지도편달을 아끼지 않으셨던 고영환 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다.

만날 때마다 힘을 낼 수 있도록 반갑게 맞이하여 주시고 진심어린 마음으로 다독거리 주시면서 논문도 세심하게 교정을 봐주셨던 하진환 교수님, 미약한 제 논문 심사를 흔쾌히 허락하여 주시고 세세하게 내용을 다듬어 주신 김광표 교수님, 환경자원연구원 보건연구부 김영주 과장님, 질병관리본부 질병매개곤충과 신이현 박사님 계도 감사를 드립니다.

언제나 웃으면서 세심하게 배려해 주셨던 김수현 교수님, 강영주 교수님, 임상빈 교수님, 동물자원과학과 김중계 교수님과 논문을 시작할 수 있도록 많은 도움을 주신 건국대학교 의과대학 미생물학교실 장원종 교수님, 서울대학교 수의과대학 채준석 교수님, 국립수의과학검역원 오재영 박사님과 음양으로 많은 도움을 준 식품생명공학과 생물공학 실험실 후배들에게도 감사의 말씀을 전합니다.

지금은 고인이 되셨지만 제 모습을 보시면 가장 많이 기뻐하실 아버지와 장인 어른에게 이 논문을 바치며, 건강이 좋지 않으시면서 제가 잘 되기를 늘 바라시는 어머니와 장모님, 옆에서 항상 건강을 챙겨주면서 가장 마음을 조아려 왔던 아내 송복은, 큰 아들 찬호, 작은 아들 태호, 사랑스런 동생들과 매제들, 조카들, 동서와 처형, 처남들과 가족들, 힘내라고 많이 격려해 주었던 친구들과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

바쁜 업무 부담을 덜어주면서 이러한 결실을 맺게 해주신 고권택 원장님, 김성홍 부장님과 직원 동료 여러 분들에게도 감사의 마음을 전하면서 지금부터 시작한다는 마음으로 최선을 다하여 정진하겠다고 다짐해 봅니다.