

국내에서 채집한 진드기에서 중합효소연쇄반응을 이용한 라임병균 및 Ehrlichiosis 원인체의 검출

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

김종배[†] · 송혜원 · 박성언 · 박상욱 · 안준환 · 엄용빈 · 김영미

국문초록: 국내에서 채집한 진드기의 라임병 및 ehrlichiosis 원인체 보균 상태를 조사하기 위하여 총 516마리 (*Ixodes* spp. 22마리, *Haemaphysalis* spp. 494마리)의 ixodid 진드기를 봄과 가을에 걸쳐 강원도 고산지대 일원에서 채집하였다. 수집한 진드기에서 DNA를 추출·정제한 후 추출한 DNA를 template로 이용하여, *Borrelia burgdorferi sensu lato* 및 *Ehrlichia* spp.에 특이하게 반응하도록 제작한 primer를 이용한 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였으며, 이 결과를 oligonucleotide probe를 사용한 southern blotting을 통하여 다시 확인하였다. 총 516마리의 진드기중 *B. burgdorferi sensu lato* DNA 양성인 진드기는 68 (13.2%)마리 (*B. burgdorferi sensu stricto*, 2; *B. afzelii*, 1; *B. garinii*, 33; *B. tanukii*, 8; *B. turdae*, 4)로 나타났으며 이 중 37 (7.2%)마리의 진드기는 southern blot analysis에서도 양성으로 확인되었다. 또한 101 (19.2%)마리의 진드기가 *Ehrlichia* spp.에 대한 PCR에서 양성이었으나, 이들 중 25 (4.8%)마리만이 southern blot analysis에서 양성으로 확인되었다. 그러나 사람의 병원체로 추정되는 human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent DNA를 보균한 진드기는 확인되지 않았다. 한편 라임병균과 ehrlichiosis 원인체를 동시에 보균한 것으로 밝혀진 진드기가 3마리에서 (0.6%) 확인되어, 국내에서도 진드기 교상시 이들 두 가지 열성질환이 동시에 감염될 가능성이 있는 것으로 사료됨으로 진드기 매개성 열성질환에 대한 적절한 진단법 등을 보다 체계적으로 연구하여야 할 것으로 판단된다.

서 론

최근 절지동물 매개성 열성질환으로 Lyme borreliosis와 ehrlichiosis가 새롭게 주목받고 있다. 라임병은 1975년 미국 Connecticut주의 라임지방에서 환자가 다수 발생한 것이 보고²⁰⁾된 이후, 1984년 Burgdorfer는 진드기로부터 원인균의 분리에 성공한 바 있다¹¹⁾. 한편 ehrlichiosis는 1935년 Algeri 지방의 개에서 리켓치아에 의한 감염증으로 최초로 보고된 이래⁵⁾, 1994년 사람에서도 최초의 환자 발생이 보고⁷⁾된 바 있으며, 이에 따라 진드기 매개성 열성질환에 대한 연구가 구미 여러 나

라에서 활발히 진행되고 있다.

진드기는 포유동물에 기생하여 흡혈함으로써 리켓치아 등과 같은 병원체를 전파할 수 있으며¹⁾, 사람은 진드기의 자연숙주는 아니나 우발적 공격에 의해 병원체에 감염될 가능성이 있다¹⁰⁾. 국내에서도 다른 나라에서와 마찬가지로 진드기에 교상되는 환자가 있으며, human granulocytic ehrlichiosis (HGE)를 전파하는 진드기는 *Ixodes scapularis*와 *I. pacificus*로서 라임병을 전파하는 진드기와 동일한 종류로 보고되고 있다^{2,16,19)}.

사람에서의 라임병 및 ehrlichiosis의 국내 발생 보고는 아직까지 이루어지지 않고 있다. 그러나 1992년 국내에서 수집한 진드기 *I. persulcatus*와 *I. nipponensis*에서 라임병균이 분리되어 *B. afzelii*와 *B. garinii*에 속하는 것으로 보고된 바 있으며^{17, 18)}, 특히 *I. persulcatus*가 주로 서식하는 강원도 영동지방 주민을 대상으로 라임병균에 대한 항체를 측정 한 결과 양성반응을 나타내는 사람이 상

* 논문접수 : 1998년 9월 30일
수정재접수 : 1998년 11월 30일

[†] 별책요청 저자

** 이 논문은 1997년도 연세대학교 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

당수 있음이 증명되었다⁴⁾. 최근 *Babesia microti*, HGE agent, *B. burgdorferi* 등의 진드기 매개성 병원균들의 항체가 공존하고 있음이 보고된 바 있으며¹³⁾, 이것은 사람이나 동물이 진드기에 교상되었을 때 이 병원균들이 동시에 혼합감염될 수 있음을 의미한다^{13,15)}. 이상의 보고를 종합하여 고려할 때 국내에도 라임병 및 ehrlichiosis에 이환된 환자가 존재할 가능성이 매우 높은 것으로 사료되어 진드기에 의하여 전파될 수 있는 라임병 및 ehrlichiosis에 대한 병인학적 및 역학적인 연구가 시급한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 국내에서 채집한 진드기를 이용하여 진드기 매개성 열성질환을 유발하는 병원체의 분포상태를 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 조사하였다. 강원도 고산지대 일원에서 수집한 진드기에서 DNA를 추출·정제한 후 추출한 DNA를 template로, 각 병원체에 특이하게 반응하도록 제작한 primer를 이용하여 PCR을 실시하였으며, 이 결과를 oligonucleotide probe를 이용한 southern blotting을 실시하고 확인하였다.

재료 및 방법

라임병균 표준균주: 본 실험과정 중 대조로 이용한 표준균주로 *B. burgdorferi* sensu stricto B31 (ATCC35210) 균주와 *B. afzelii*의 KK-1, KK5PI, KM-10, *B. garinii* KW1, KK-3 균주는 건국대학교 의과대학 미생물학교실에서, *B. burgdorferi* sensu stricto 297과 *B. afzelii*의 10MT, 934U, S13, Y5, Y7, Y18과 *B. garinii*의 HP1, 935T 균주는 국립보건원 특수세균과에서 각각 분양받아 본 실험에 사용하였다. 분양받은 각각의 라임병 원인균주의 배양은 Barbour-Stoenner-Kelly (BSK II)배지⁹⁾에 접종하여 34℃ CO₂ incubator에서 2~4 주간 배양한 후 각각의 세균 수를 확인한 후 boiling법에 의하여 DNA를 분리하여 PCR과 southern blotting시 positive control로 사용하였다.

진드기 채집: 본 연구에 사용한 진드기는 강원도 고지대 (청태산, 치악산 및 원주시 매지리 일원)에서 4월부터 5월까지, 9월부터 10월까지 봄과 가을 2차에 걸쳐 flannel 천을 이용하여 채집하였다. 채집한 진드기는 습도가 유지되도록 물에 적신 솜을 넣은 보관병에 넣어 실험에 사용할 때까지 4℃ 냉장고에 보관하였다.

진드기로부터 DNA 추출: 수집한 진드기를 Ep-

pendorf 시험관에 넣고 상품화된 DNAzol[®] (Life Technologies, Rockville, M.D., U.S.A.) 30 μl를 가한 다음 micropestle을 사용하여 파쇄하였다. 이것을 원심분리한 후 상층액만 모아 ethanol로 DNA를 침전시키고 다시 70% ethanol로 세척 후 건조하여 TE 완충액 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) 30 μl에 용해하여 실험에 이용하였다.

중합효소연쇄반응: 중합효소연쇄반응은 각각의 진드기 시료에서 추출한 DNA 2 μl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP를 2 μl 넣은 후 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5 μl, primer set (20 pmol/μl)를 각각 2.5 μl, Taq DNA polymerase 0.3125 U를 첨가하고 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 25 μl이 되도록 한 후 thermal cycler (Hybaid Limited, U. K.)에서 표적 DNA 증폭을 시도하였다. 각각의 PCR 반응에 사용한 primer sets는 검출 대상균종에 따라 적절한 것을 사용하였다 (Table 1). 즉, PMod, PC5 primer set는 prokaryote의 16S rDNA에 특이한 primer set로, BB uni primer set는 *B. burgdorferi* sensu lato 특이 primer로 (*B. burgdorferi* sensu lato specific), BB primer set는 *B. burgdorferi* sensu stricto 특이 primer로, BA primer set는 *B. afzelii*, BG primer set는 *B. garinii*, TN primer set는 *B. tanukii*, TR primer set는 *B. turdae* 특이 primer로 사용하였다. Ehrlichiosis agent에 대해서는 *Ehrlichia* spp. (genus specific) 특이 primer로 PER primer set를 사용하고 HGE 16S rDNA primer로 GER primer set를 사용하였다.

PCR 반응은 총 35 cycle을 시행하였으며 첫 cycle이 시작하기 전에 94℃에서 2분 30초간 가온한 후 매 cycle 당 94℃에서 45초 동안 denaturation, primer set 종류에 따라 42~52℃ 내외의 온도에서 45초 동안 annealing, 72℃에서 1분 30초 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 마지막 extension은 72℃ 15분간 지속함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다. 반응이 종료된 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 target sequence의 증폭여부를 확인하였다.

먼저 진드기에서 추출한 DNA를 template로 사용하여 prokaryote의 16S rDNA specific primer set (PMod, PC5)를 이용한 PCR을 수행하였다. 이와 같이 증폭된 DNA를 template로 위와 동일한 방법으로 *Borrelia* spp.에 대해서는 BB uni primer set, *Ehrlichia* spp.에 대해서는 PER primer set로 각 균

중에 특이한 16S rDNA의 증폭여부를 확인하였다. 여기에서 양성으로 판독된 진드기 DNA만을 선택하여 각각의 라임병 원인체에 특이한 각 primer set를 이용하여 각종 라임병균 원인체의 보균여부를 확인하였다. 한편 *Ehrlichia* spp.에 특이한 PER primer set에 양성인 검체는 HGE 특이 primer set인 GER을 이용하여 DNA 증폭, 1.5% agarose gel에 전기영동하여 target sequence의 증폭여부를 확인하고자 하였다.

Southern blot analysis: PCR 결과 증폭된 DNA band 중 target이 되는 *B. burgdorferi sensu lato*에 특이한 16S rDNA sequence와 *Ehrlichia* spp.에 특이한 16S rDNA sequence에 해당하는 band를 확인하기 위하여 southern blotting을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel을 depurination 용액 (0.2 M HCl)에 10분, 변성용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 10분, 중화용액 (0.5 M Tris, pH 7.0, 3.0 M NaCl)

에 10분 처리한 후 transfer solution (20X SSC)에 90분간 vacuum transfer system을 이용하여 nylon membrane에 전사하였다. 이 membrane을 80℃ 진공오븐에 2시간 정치한 후 본 실험에서 design한 B16S와 E16S oligonucleotide probe를 ECL kit (Amersham, RPN 2131)를 사용하여 제작회사의 권장술식에 따라 labelling 시키고, hybridization, membrane washing 과정을 거친 다음 detection 용액을 처리하여 X-ray film에 25분 노출시킨 후 band가 나타나는 것을 확인하였다.

결 과

국내에 서식하고 있는 진드기 체내에서 라임병 및 ehrlichiosis 원인체의 분포상태를 조사하기 위하여 강원도 고산지대 일원에서 봄과 가을 2차에 걸쳐 flannel 천을 이용하여 ixodid 진드기 총

Table 1. The sequences of PCR primers and oligonucleotide probes used in this study for the detection of *B. burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia* spp.

Primers or Probes	Sequence (5' to 3')	Target gene (16s rDNA) specific to	Reference
P0mod	AGAGTTTGATCMTGG	prokaryote	21
PC5	TACCTTGTTACGACTT	prokaryote	21
BBuni +	AAGGTCAGTTAATTTGTGA	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	This study
BBuni -	ATATAGTTTCCAACATAG	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	This study
BB+	GGGATGTAGCAATACATTC	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	14
BB-	ATATAGTTTCCAACATAGG	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	14*
BA+	GCATGCAAGTCAAACGGA	<i>B. afzelii</i>	14
BA-	ATATAGTTTCCAACATAGC	<i>B. afzelii</i>	14*
BG+	GGGATGTAGCAATACATCT	<i>B. garinii</i>	14
BG-	ATATAGTTTCCAACATAGT	<i>B. garinii</i>	14
TN+	GGGATGTAGCAATACATCT	<i>B. tanukii</i>	6
TN-	ATATAGTTTCCAACATAGC	<i>B. tanukii</i>	6
TR+	GGGATGATGTAATACATTC	<i>B. turdae</i>	6
TR-	TTTATGCATAGACTTATAC	<i>B. turdae</i>	6
PER1	TTTATCGCTATTAGATGAGCCTATG	<i>Ehrlichia</i> spp.	8
PER2	CTCTACACTAGGAATTCGCTAT	<i>Ehrlichia</i> spp.	8
GER3	TAGATCCTTAACGGAAGGGCG	HGE agent	8
GER4	AAGTGCCCGGCTTAACCCGCTGGC	HGE agent	8
B16S**	GAACGGGTGAGTAACGCG	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	This study
E16S***	TACCCACAGAAGAAGTCCCG	<i>Ehrlichia</i> spp.	This study

* From Marconi and Garon¹⁴ with corrections of errors in published sequences.

** Oligonucleotide probe designed in this study binding specifically to 16S rDNA of *B. burgdorferi sensu lato*.

*** Oligonucleotide probe designed in this study binding specifically to 16S rDNA of *Ehrlichia* spp.

Table 2. The results of PCR reaction and southern blot analysis for the detection of *B. burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Kangwon Province, Korea

	Positives in	
	PCR reaction	PCR & Southern blotting
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	68/516 (13.2%)	37/68 (54.4%)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	2/68	0/2
<i>B. afzelii</i>	1/68	1/1
<i>B. garinii</i>	33/68	26/33
<i>B. tanukii</i>	8/68	6/8
<i>B. turdae</i>	4/68	4/4
unidentified	20/68	0/20
<i>Ehrlichia</i> spp.	101/516 (19.2%)	25/101 (24.8%)
HGE agent	0/101	0/101

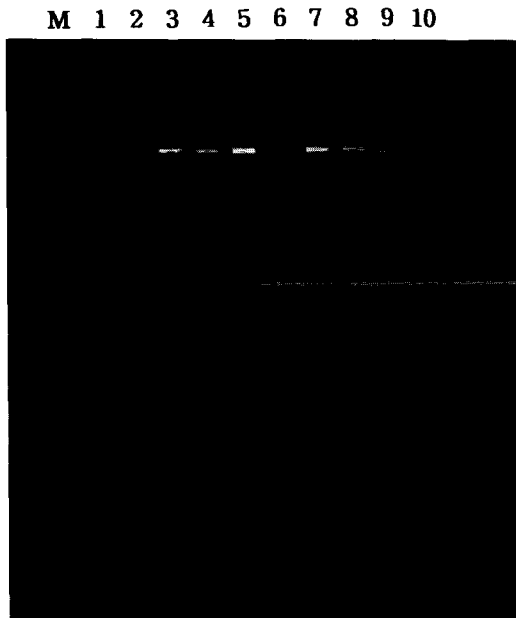


Figure 1. PCR amplification products and southern blot analysis with DNAs extracted from ticks and reference strains with BB, BA, BG, TN, TR primer sets. Lane M, *Hinfl* digested pBH20 marker; Lane 1, *B. burgdorferi* 297 (575 bp); Lane 2, *B. afzelii* Y18 (590 bp); lane 4, *B. garinii* 935T (575 bp) and tick DNAs (lane 3, UD119; lane 5, BBVA67; lane 6, BBVA64; lane 7, UD16; lane 8, D3; lane 9, B5; lane 10, B6).

516마리 (*Ixodes* spp. 22 마리, *Haemaphysalis* spp. 494마리)를 채집하였다.

채집한 516마리의 진드기에서 추출한 DNA를

template로 하여 *B. burgdorferi sensu lato* 세균의 16S rDNA를 target DNA로 하여 PCR을 수행한 결과 68 (13.2%)마리의 진드기가 양성으로 나타났으며, 이를 다시 southern blot analysis한 결과 37 (7.2%)마리가 양성인 것으로 판정되었다 (Table 1). 이 결과를 각각의 세균별로 살펴보면 *B. burgdorferi sensu stricto*에 대해서는 2마리가 PCR 양성이었으나 southern blot analysis에서는 모두 음성이었으며, *B. afzelii*에 대해서는 1마리의 진드기가 PCR 및 southern blot analysis에서 모두 양성을 나타내었다. *B. garinii*에 대해서는 총 33마리의 진드기가 PCR 결과가 양성이었으며, southern blot analysis에서는 26마리가 양성인 것으로 판정되어 가장 높은 양성율을 보였다. *B. tanukii*에 대해서는 8마리의 진드기가 PCR에서 양성으로, southern blot analysis에서는 6마리가 양성인 것으로 나타났다. *B. turdae*에 대하여는 4마리의 진드기가 PCR 및 southern blot analysis에서는 모두 양성으로 확인되었다.

동일한 진드기에서 얻은 DNA를 이용하여 *Ehrlichia* spp.에 대해 PCR을 실시한 결과는 101 (19.6%)마리의 진드기가 *Ehrlichia* spp.에 특이한 16S rDNA에 양성을 나타내었으며, southern blot 분석 결과 25 (4.8%)마리가 양성인 것으로 확인되었다 (Table 1). 그러나 사람에게 질병을 야기하는 HGE agent에 특이한 16S rDNA를 보유한 진드기는 한 마리도 검출되지 않았다. 진드기에서 추출한 DNA를 이용한 PCR 및 southern blot analysis의 전형적인 결과는 Figure 1 (*Borrelia* spp.)과 Figure

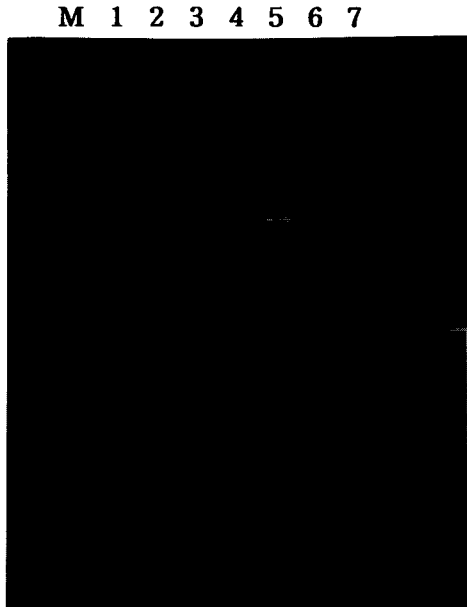


Figure 2. PCR amplification products and southern blot analysis with DNAs extracted from ticks with PER primer sets. M is the *Hinfl* digested pBH20 marker. Respective tick DNAs were all positive with PER primer sets (lanes 1 to lane 7). However, lane 1 PCR product was negative in southern blot analysis.

2 (*Ehrlichia* spp.)와 같다.

한편 PCR 및 southern blot 분석 결과 *B. burgdorferi* sensu lato와 *Ehrlichia* spp.에 대한 DNA를 동시에 보유하고 있는 것으로 판정된 진드기도 3마리 (0.5%)가 검출되어 진드기 체내에 열성질환 원인체가 공존하고 있다는 사실도 확인할 수 있었다.

고 찰

우리 나라에서는 봄과 가을철에 열성질환 환자 및 만성 유주성 홍반의 피부병변을 나타내는 환자가 많이 발생한다. 특히 열성질환 환자의 경우 리케치아 혹은 바이러스 감염으로 유발되는 것으로 생각되어 이것들에 대한 혈청학적, 면역학적 연구가 이루어지고 있으나 그밖에 알 수 없는 원인체에 의한 열성질환이 종종 나타나고 있어 이에 대한 연구가 시급한 실정이다. 이러한 원인균명이 어려운 열성질환 중에 *B. burgdorferi*에 의하여 유발되는 라임병이 있을 것으로 사료되며, 이미 우리 나라에서도 *B. afzelii* 및 *B. garinii*가 분

리된 바가 있어 이에 대한 연구가 더욱 필요한 것으로 판단된다.

특정 DNA sequence만을 증폭하는 중합효소연쇄반응 (PCR)은 원인균의 배양이 까다롭고 배양 시간이 오래 걸리는 *Borrelia* spp.를 배양하지 않고 검체에서 원인균의 특정 DNA 부분만을 선택적으로 빠르게 증폭한 다음 검출함으로써 라임병의 진단에 효과적으로 이용할 수 있다. 또한 라임병이나 ehrlichiosis agent로 야기되는 진드기 매개성 열성질환의 초기 진단이 가능하므로 이들 질병의 조기 치료를 가능케 한다고 여겨진다.

본 연구에서는 강원도 일원의 ixodid 진드기 (*Ixodes* spp. 및 *Haemaphysalis* spp.)를 수집하여 추출한 DNA로부터 PCR 방법과 southern blot을 병행하여 시행한 결과, *Haemaphysalis* spp. *B. afzelii*와 *B. garinii*, *B. tanukii*, *B. turdae*의 DNA를 검출하여 총 516마리의 진드기 중 *Borrelia* spp.의 DNA에 대하여 7.2%의 양성율을 얻었다. 한편 HGE agent의 DNA는 검출되지 않았으나 동물에 질병을 야기할 수 있는 *Ehrlichia* spp. DNA는 4.84%의 양성율을 보였다. Chang 등³⁾은 New York과 Massachusetts에서 채집한 ixodid ticks 중에서 9% 및 25%의 진드기에서 HGE agent를 PCR을 통해 검출했으며, 동일한 진드기에서 54% *B. burgdorferi* DNA가 검출되었다고 보고한 바 있다. Park 등¹⁷⁾은 국내에서 채집한 *Ixodes* spp.에 속하는 진드기에서 *B. afzelii*와 *B. garinii*를 분리 동정하였다고 보고한 바 있다. 본 조사에서는 *Haemaphysalis* spp.에서만 *B. burgdorferi* DNA가 검출되어 Park 등¹⁷⁾의 결과와 차이가 있었으나, 이는 본 실험에서 채집한 *Ixodes* spp.에 속하는 진드기의 개체수 (22마리)가 너무 적었던 까닭으로 사료된다. 한편 Kee 등¹²⁾은 국내에서 채집한 진드기로부터 *B. afzelii*가 가장 높은 빈도로 검출되었다고 하였으나, 본 실험에서는 *B. garinii*가 가장 높은 빈도로 검출되어 진드기로부터 라임병균의 검출율에서도 다소 차이가 있었다.

그러나 본 실험의 결과 *B. burgdorferi* sensu lato나 *Ehrlichia* spp.의 DNA가 이제까지의 보고와는 달리 특이하게도 *Haemaphysalis* spp.에 속하는 진드기에서만 검출되었으며, 일본에서만 국한하여 분리되었던 *B. tanukii*⁶⁾와 *B. turdae*⁶⁾의 DNA도 우리 나라에서 채집한 진드기에서 확인되었다는 점에 의의가 있다고 하겠다. 또한 516마리의 진드기 중 3마리 진드기에서는 *B. burgdorferi*와 *Ehrl-*

ichia spp.의 DNA가 동시에 검출된 것으로 미루어 보아 진드기 교상시 이러한 진드기 매개성 병원균들이 동시에 혼합 감염할 수 있는 가능성을 나타내고 있다. 그러므로 국내에도 라임병 및 ehrlichiosis에 혼합감염증이 발생할 가능성이 매우 높은 것으로 사료되며, 진드기매개성 질환에 대한 보다 체계적인 진단 및 치료법의 개발이 시급한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) 조백기, 이준영, 김진우 (1985): 참진드기 교상 1예, 대한피부학회지, **23**: 480-485.
- 2) Appel MJG, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, Thomford TW, Tothunter RT and Summers BA (1993): Experimental lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis*, **167**: 651-664.
- 3) Chang YF, Novosel V, Chang CF, Kim JB, Shin SJ, and Lein DH (1998): Detection of human granulocytic ehrlichiosis agent and *Borrelia burgdorferi* in ticks by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, **10**: 56-59.
- 4) Cho SN, Kim JD, Chong Y, Lee MG and Ahn EW (1990): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, among residents in Youngdong area of the Kangwon province. *J Korean Soc Microbiol*, **25**: 163-169.
- 5) Donatien A and Lestoquard A (1935): Existence in Algeric dume rickettsia du chien. *Bull Soc Pathol Exot*, **28**: 418-419.
- 6) Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M (1996): *Borrelia tanukii* sp. nov. found from Ixodid Ticks in Japan: Rapid species identification By 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol*, **40**(11): 877-881.
- 7) Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ and Dumler JS (1996): Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol*, **34**: 44-48.
- 8) Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurti TJ and Munderloh UG (1996): Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*, **334**(4): 209-215.
- 9) Hyde FW, Johnson RC, White TJ and Shelburne CE (1989): Detection of antigens in urine of mice and humans infected with *B. burgdorferi*, etiological agent of Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **27**: 58-61.
- 10) Johnson RC, Hyde FW and Rumpel CM (1984): Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, **57**: 529-537.
- 11) Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG and Brenner DJ (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.; ethiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 494-497.
- 12) Kee S, Hwang KJ, Oh HB, Kim MB, Shim JS, Ree HI and Park KS (1994): Isolation and Identification of *Borrelia burgdorferi* in Korea. *J Korean Soc Microbiol*, **29**: 301-309.
- 13) Magnarelli LA, Dumler JS, Anderson JF and Fikrig E (1995): Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis and Lyme disease in human sera. *J Clin Microbiol*, **33**: 3054-3057.
- 14) Marconi RT and Garon CF (1992): Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease isolates by 16S rRNA signitre nucleotide analysis. *J Clin Microbiol*, **30**: 2830-283.
- 15) Mitchell PD, Reed KD and Hofkes JM (1996): Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minesota. *J Clin Microbiol*, **34**: 724-727.
- 16) Mitchell PD, Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, Reed KD Jr, Dumler JS, Bakken JS, Telford SR, Persing DH (1995): *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis*, **172**: 1007-1012.
- 17) Park KH, Chang WH and Schwan TG, Reed KD Jr, Dumler JS, Bakken JS, Telford SR III and Persing DH (1993): Identification and Characterization of Lyme Disease Spirochetes, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, Isolated in Korea.

- J Clin Microbiol*, **31**(7): 1831-1837.
- 18) Park KH, Lee SH, Won WJ, Jang WJ and Chang WH (1992): Isolation of *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease from Ixodes ticks in Korea. *J Kor Microbiol*, **27**: 307-312.
- 19) Richter PJ, Kimsey RB, Madigon JE, Barlough JE, Dumler JS and Brooks DL (1996): *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol*, **33**: 1-5.
- 20) Steere AC (1989): Lyme disease. *N Engl J Med*, **321**: 586-596.
- 21) Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC (1990): Amplification of Bacterial 16S ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*, **28**: 1942-1946.

=Abstract=

Detection of *Borrelia burgdorferi* and Ehrlichiosis Agent in Ticks Collected in Korea Using Polymerase Chain Reaction

**Jong-Bae Kim[†], Hye-Wone Song, Sung-Un Park, Sang-Wook Park,
Joon-Hwan Ahn, Yong-Bin Eom and Young-Mi Kim**

*Department of Medical Technology, College of Health Science,
Yonsei University, Wonju, 220-710, Republic of Korea*

To investigate the distribution of *Borrelia burgdorferi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in ticks, adult ixodid ticks of *Ixodes* spp. and *Haemaphysalis* spp. were collected from the high mountain areas of Kangwon Province. Using DNAs extracted and purified in the collected ticks, polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the specific nucleotide sequences of both agents. Of the 516 ticks, a total of 68 (13.2%) ticks was positive for *Borrelia burgdorferi* sensu lato with PCR analysis (2 for *B. burgdorferi* sensu stricto; 1 for *B. afzelii*; 33 for *B. garinii*; 8 for *B. tanukii*; 4 for *B. turdae*). However a little more than half of PCR-positive ticks (37/68) was found to be positive in the southern blot analysis with B16S oligonucleotide probe. One hundred and one (19.2%) ticks were positive for *Ehrlichia* spp. in PCR, and a quarter of them (25/101) was positive in southern blot with E16S oligonucleotide probe. But none of them was found to be the DNA of HGE agent. And 0.6% (3/516) ticks were positive for both of *B. burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. These findings might implicate the possibility of the outbreak of lyme borreliosis and ehrlichiosis in Korea, and more extensive studies may be need for the diagnosis of multiple tick-borne diseases.

Key Words: *Borrelia burgdorferi*, Ehrlichiosis, Tick, PCR

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(2): 113-120, December, 1998]

[†]Corresponding author