



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주도내 개에서 진드기매개 질병과 *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP

제주대학교 대학원

수의학과

문 미 래

2016년 2월

제주도내 개에서 진드기매개 질병과 *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP

지도교수 윤 영 민

문 미 래

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2015년 12월

문미래의 수의학 석사논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_(인)

위 원 \_\_\_\_\_(인)

위 원 \_\_\_\_\_(인)

제주대학교 대학원

2015년 12월

## Abstract

# Prevalence of canine tick-borne diseases in Jeju Island and SNP of *Babesia gibsoni* cytochrome *b* gene in dogs

Mirae Moon

(Supervised by Prof. Youngmin Yun)

Department of Veterinary Internal Medicine, Graduate School,  
Jeju National University, Jeju, Korea

There are several diseases such as anaplasmosis, ehrlichiosis, borreliosis, babesiosis, and hepatozoonosis in canine tick-borne diseases. A survey on previous researches has shown that canine infection cases of some diseases have been reported and the number of *Babesia* spp. infection cases in Jeju has been increasing in the past few years. However, treatment using drugs that are currently used such as diminazene aceturate and atovaquone often leads to relapses of infection.

For these reasons, this study did research on the prevalence of canine tick-borne diseases in Jeju. Also, a survey on SNP (single nucleotide polymorphism) of cytochrome *b* gene in

clinical cases of dogs infected with *B. Gibsoni* was performed.

Total 363 dogs, 125 shelter dogs and 238 owned dogs, were randomly selected during 2008 to 2015 in Jeju. A screening test using Anigen Rapid CaniV-4 Test Kit (Anigen Rapid CaniV-4 Test Kit (Bionote, Inc., Republic of Korea)) was conducted in 125 shelter dogs to detect antibodies of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi*. Additionally, PCR and PCR-RFLP were given to detect pathogens in all dogs. CBC tests were conducted in 16 dogs infected with *Babesia* spp. that were patients at Jeju National University Animal Hospital (JNUAH). Also, to survey on SNP of *B. gibsoni* cytochrome *b* gene in 11 dogs that were patients at JNUAH, dogs were divided into two groups that have history of relapse and non-relapse of babesiosis.

The result of kit tests shows that all samples were negative for antibodies of *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis*, and *B. burgdorferi* from 125 dogs. As a result of PCR and PCR-RFLP, 69(19.01%), 44(12.12%), and 21(5.79%) out of 363 dogs were infected with *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., and both, respectively. *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. were not detected in all samples using PCR. According to the CBC tests, the average of RBC, Hb, HCT, MCHC and platelet were lower and the average of RDW was higher than normal reference range. Although the comparative analysis of CBC results from 16 dogs revealed that the average of RDW was slightly elaborated, there were no differences in the results between 2 groups. Total 12 SNP were found in 24 samples of *B. gibsoni* cytochrome *b* from 11 dogs. However, there were no significant differences between 2 groups and between before/after treatment using diminazene aceturate.

These results indicate that dogs in Jeju might be in the risk of getting infected with *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp.. The CBC results revealed that dogs infected with *B.*

*gibsoni* may have symptoms such as thrombocytopenia and severe anemia. The comparative analysis of CBC results shows that there were no significant differences between two groups. This result indicates that PCR test should be performed to diagnose whether the infection with *B. gibsoni* is relapsed or not, because glucocorticoid can cause clinical symptoms in chronic infection case if the infection with *Babesia* spp. still exists. Additionally, the result from the survey on SNP shows that there are no relationship between drug resistance and *B. gibsoni* cytochrome *b* gene.

---

**Key words:** anaplasmosis, ehrlichiosis, hepatozoonosis, *Babesia gibsoni*, cytochrome *b*, dog, Jeju

# 목 차

## 영문초록

I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
III. 결 과 .....	15
IV. 고 찰 .....	25
V. 결 론 .....	29
VI. 참고문헌 .....	31

## I. 서 론

개의 진드기매개 질병인 anaplasmosis, ehrlichiosis, lyme borreliosis, hepatozoonosis와 babesiosis는 임상적으로 중요한 질병이다. 이들의 병원체는 혈구에 감염되어 전신적인 임상증상을 나타내고 빈혈, 혈소판 감소증과 같은 조혈계 질병을 일으키며, 때로는 생명에 위협적이다. 이들 원인체는 공통적으로 *Ixodes* spp. 진드기에 의해 전파되며, 국내에는 *Haemaphysalis longicollis*가 주로 분포한다(3). 이들 병원체들은 한 개체가 많은 수의 진드기에 노출된 경우, 여러 진드기 매개 병원체들 혹은 한 병원성 종의 여러 유전자형에 의한 감염이 일어날 수 있다(14, 25). 또한 한 종의 진드기가 여러 병원체의 매개체가 될 수 있으며, 한 마리의 진드기가 여러 병원체에 중복감염 될 수 있다(35).

Anaplasmosis는 세균성 질병으로 근육통, 혈소판감소증, 백혈구감소증, 두통, 고열, 무감각, 식욕부진, 무기력과 설사 혹은 신경증상을 유발하며, 개에서는 *Anaplasma phagocytophilum*과 *A. platys*가 감염성을 가진다. 이들 중 *A. phagocytophilum*은 사람에서 granulocytic anaplasmosis의 원인체로도 알려져 있으나(16), 전형적인 숙주인 반추수와 설치류 이외에도 개와 고양이에서 감염되기도 한다(11, 41).

Ehrlichiosis는 그람 음성균에 의한 세균성 질병으로, 개의 단핵구, 과립구, 그리고 혈소판에 기생한다. 원인체는 *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*이며, 이들 중 아시아에 보고된 것은 *E. canis*와 *E. chaffeensis*이다(29,

37, 42). 임상증상으로는 무기력, 식욕부진, 근육통, 비장종대, 림프병증과 출혈성 소인을 나타낸다.

Lyme borreliosis는 *Borrelia burgdorferi* complex에 의한 감염으로 발생한다. 임상증상은 종종 관절염형으로 나타나며, 이 경우 사지의 염증을 동반하며 주로 한쪽이나 양쪽의 손발목 관절이 종창되고, 서혜부와 전건갑부 림프절의 종대가 나타난다. 이 증상들은 발열, 식욕부진, 피로와 함께 나타나며, 며칠 후 과행을 보인다. 심근염은 개에서는 드물게 나타나며, 나이든 개체의 경우 신장형과 신경증상이 나타날 수 있다(38).

Hepatozoonosis의 경우, *Hepatozoon canis*와 *H. americanum* 감염에 의해 발생하는데, 이들 중 아시아에서는 *H. canis*에 의한 감염만이 알려져 있다(7). 임상증상은 무증상부터 심각한 무기력증, 악액질, 그리고 빈혈을 동반한 생명을 위협하는 심각한 상태까지 다양하다. 낮은 수준의 기생충혈증(1-5%)을 나타낼 때 주로 무증상을 나타내며, 이 경우가 가장 일반적이다. 심각한 병증의 경우는 말초혈액 호중구의 100%에 달하는 고기생충혈증이 관찰되며, 때로는 극심한 호중구증가증을 동반한다(8, 9).

Canine babesiosis는 진드기 매개 주혈원충에 의해 발생하는 질병으로서 *B. gibsoni*, *B. canis* supsp. *canis*, *B. canis* supsp. *vogeli*, *B. canis* supsp. *rossi*, *B. microti*, *B. equi*, *B. conradae*, 그리고 *B. vitalii*가 그 원인체로 알려져 있다(12). *Babesia* spp.에 의한 급성 감염의 경우 주로 용혈성 빈혈, 발열, 무기력, 식욕부진, 구토, 비장종대, 림프절종대, 혈소판감소 등의 임상증상을 나타낸다(21,

22). 만성 babesiosis의 경우 일반적 증상은 잘 알려져 있지 않지만(22), 저감염 혹은 무증상 감염을 보일 수 있으며, 이 경우에는 스트레스나 당질글루코코이드 치료에 의해 질병이 촉발될 수 있다(5).

국내의 경우 이들 개의 진드기매개 질병 중 anaplasmosis, ehrlichiosis, lyme borreliosis, babesiosis의 개에서 발병 사례가 있으며(2, 6, 17, 42), 제주지역에서는 진드기에서 *A. phagocytophilum*과 *E. chaffensis*(23), 개에서 *Babesia* spp.가 검출되었다(6).

이들 질병 중 *Babesia* spp.의 경우, 현재 감염 치료에 사용되는 약물로는 diminazene aceturate (DA), imidocarb dipropionate, pentamidine, atovaquone (ATV), clindamycin, azithromycin (AZM), metronidazole 및 doxycycline 등이 있으며, 이들 중 *B. gibsoni*에는 DA와 ATV가 가장 효과적인 약물로 알려져 있다(32). 하지만 현재 치료에 사용되는 화학치료제의 권장용량으로는 canine babesiosis의 완전한 치료가 어렵고 재발이 종종 일어나며(19), 현재까지 DA나 ATV의 *B. gibsoni*에 대한 작용 기전과 DA에 대한 저항성 획득 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. *Trypanosoma* spp.와 *Leishmania* spp. 같은 타 혈액기생충에서 aromatic diamine 유사체 약물에 노출된 후, 미토콘드리아 초미세구조의 변화나 막전위의 감소를 나타냈으며(28, 36), 이로 인해 *Leishmania* spp.에서는 cytochrome *c* oxidase 활성도의 감소(39), *Trypanosoma brucei brucei*의 경우 P2 뉴클레오타이드 수송 기능의 손실을 야기한다(15, 40). 또한 *Babesia gibsoni*에서 ATV과 AZM 혹은 ATV 단독으로 치료 후 재발한 경우, cytochrome *b* 특정위치에 SNP (Single nucleotide polymorphism)가

나타났다는 조사결과가 있다(31, 34). 이와 같이 *Trypanosoma*와 *Leishmania*의 경우 DA 저항 기전은 알려져 있으며, *B. gibsoni*의 경우 ATV에 의한 저항성으로 인한 것으로 추측되는 cytochrome *b*의 SNP에 대한 보고가 있다.

이에 본 연구에서 제주도 내의 사육견과 유기견을 대상으로 진드기매개 질병인 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., 그리고 *Borrelia burgdorferi* 감염률을 조사하고, *B. gibsoni* 감염 치료 후 종종 재발됨에 따라 재발과 *B. gibsoni*의 cytochrome *b* 유전자의 SNP와 관계를 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 제주도내 개에서 진드기매개 질병 조사

#### 1) 대상동물 및 혈액 시료

제주지역 개에 분포하는 진드기매개 질병을 조사하기 위하여 2008 년부터 2015 년 사이 제주도내 유기견 125 마리 및 사육견 238 마리, 총 363 마리를 무작위로 선택하였다. 혈액은 경정맥 또는 요골쪽피부정맥으로부터 채취하였으며, 혈액시료는 EDTA 로 항응고 처리하였으며, 실험 전까지 냉장보관 하였다.

#### 2) 진드기매개 질병 항체검사

Anaplasmosis, ehrlichiosis, borreliosis 에 대한 스크리닝 검사로, 총 363 마리 중 125 마리의 유기견을 대상으로 키트를 이용하여 항체 검사를 실시하였다. 혈액시료는 키트검사 직전까지 3-6 시간 가량 냉장보관 하였다. 사용한 키트는 Anigen Rapid CaniV-4 Test Kit (Bionote, Inc., Republic of Korea)로, 실험

대상견에서 채취한 혈액 10  $\mu$ l와 키트와 함께 동봉된 희석액 3 방울을 각 시료  
홈에 넣고 10 분 뒤 선을 확인하였다. Control 선과 test 선 중 control 에만  
붉은색의 선이 나타난 경우를 음성으로, control 과 test 선 둘 다 붉은색으로  
나타난 경우를 양성으로 판단하였다. 키트 검사 결과로 *Anaplasma*  
*phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis* 와 *Borrelia burgdorferi*에 대한 항체  
존재를 확인함으로써 감염여부를 평가하였다.

### 3) 원인체 동정

혈액으로부터 *Borrelia burgdorferi* 를 제외한 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp.,  
*Babesia* spp., *Hepatozoon* spp.는 PCR 검사로 확인하였다.

#### (1) DNA 추출

EDTA 처리하여 냉장 보관한 혈액시료는 3 일 이내에 G-DEX™ II b Genomic  
DNA Extraction Kit for Blood (Intron Biochnology, Korea)를 사용하여 genomic  
DNA 를 추출하였다. 전혈 300  $\mu$ l를 1.5 ml 튜브에 넣고 RBC lysis solution  
900  $\mu$ l를 넣은 뒤, vortexing 하여 실온에 5 분간 둔 후, 10,000 $\times$ g 로 5 분간  
원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 펠릿을 포함하여 100  $\mu$ l 정도 남겨두고

버린 뒤, Cell lysis solution 을 300  $\mu$ l 를 넣고 피펫을 이용하여 균질한 용액이 되도록 섞어주었다. 혈구를 용해시키기 위해 37°C에서 1 시간 가량 배양한 뒤, PPT buffer 를 100  $\mu$ l 넣고 1 분간 vortexing 후 10,000 $\times$ g 로 1 분간 원심분리 하였다. 상층액 400  $\mu$ l 를 취하여 1.5 ml 튜브에 넣은 뒤, 차가운 100% isopropanol (2-propanol)을 400  $\mu$ l 넣어준 후, 인버팅하여 DNA 를 확인하고 13,000 $\times$ g 로 5 분간 원심분리하였다. 펠릿을 확인한 뒤, 상층액은 버리고 70% ethanol 을 넣어 인버팅하였고 13,000 $\times$ g 로 5 분간 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 버리고 펠릿이 반투명해질 때까지 10-15 분간 말린 후, DNA rehydration buffer 를 100  $\mu$ l 넣어 4°C에서 overnight 하였다. 추출한 DNA 는 분광광도계(NanoVu, GE healthcare bioscience, USA)를 이용하여 최종 농도가 100 ng/ $\mu$ l가 되도록 조정된 뒤 사용시까지 -20°C에 보관하였다.

## (2) PCR

실험 대상견의 혈액에서 추출한 gDNA 에서 *Babesia/Hepatozoon* spp. 18S rRNA 유전자와 *Anaplasma/Ehrlichia* spp. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 Birkenheue(10)와 Oh(23)가 보고한 primer 를 이용하여 PCR 을 수행하였다. 2X TOPsimple™ DyeMIX-Tenuto (Enzynomics, Korea), 혹은 Dr. MAX MasterMix (2X) with Dye (Docterprotein, Korea)를 이용하여 PCR (C1000™ Thermal

Cycler, BIO-RAD, USA)을 실시하였다. PCR 에 사용된 primer 와 PCR 조건은 Table 1 과 같다. PCR 산물은 100 bp DNA ladder marker (Enzynomics, Korea)와 함께 1.5% agarose gel 에 전기영동하여 확인하였다.

### (3) PCR-RFLP

PCR 산물 중 전기영동하여 *Babesia/Hepatozoon* spp. 가 확인된 시료는 PCR-RFLP 를 실시하였다. 증폭된 PCR 산물 6  $\mu$ l와 제한효소 *Pst* I (TaKaRa Bio Inc., Japan) 1  $\mu$ l, 제한효소와 동봉된 10X buffer 1  $\mu$ l, 3 차 증류수 2  $\mu$ l를 넣어 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다(Table 2). 반응 종료 후 100 bp DNA ladder marker (Enzynomics, Korea)와 함께 1.8% agarose gel 에 전기영동하여 확인하였다.

**Table 1.** PCR primer sets and reaction conditions used in this study

Species and target gene	Primer	Oligonucleotide sequences (5'–3')	Product size (bp)	PCR condition				Ref.
				Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	
<i>Babesia/Hepatozoon</i> spp. 18S rRNA	BH-F	GTTGATCCTGCCAGTAGT	1676– 1761	94°C/30s	60°C/30s	72°C/60s	35– 40	(10)
	BH-R	AACCTTGTTACGACTTCTC						
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp. 16S rRNA	AE1-F	AAGCTTAAACACATGCAAGTCGAA	1406	94°C/30s	59°C/30s	72°C/30s	35	(23)
	AE1-R	AGTCACTGACCCAACCTTAAATG						

**Table 2.** PCR-RFLP profile information to identify *Babesia/Hepatozoon* spp.

Restriction enzyme	Species	Fragment size (s) (bp) after digestion
<i>Pst</i> I	<i>Babesia</i> spp.	1642
	<i>Hepatozoon</i> spp.	805, 956

## 2. *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 의 SNP 조사

### 1) 대상동물 및 시료 선정

2014 년 5 월부터 2015 년 11 월까지 제주대학교 동물병원에서 babesiosis 로 진단받고 치료받은 개체 중 16 마리(재발한 개체 12 마리, 재발하지 않은 개체 4 마리)를 대상으로 일반혈액검사(CBC)를 하였다. 혈액은 경정맥 또는 요골쪽피부정맥에서 채취, EDTA 로 항응고 처리하였다. CBC 검사는 모든 개체를 대상으로 치료 전과 치료 2-4 주 후에 실시하였다.

이들 중 11 마리를 대상으로 *Babesia gibsoni* cytochrome *b* gene 의 SNP 를 확인하였다. EDTA 항응고 처리된 혈액으로 각각 CBC 검사 및 PCR 검사를 실시하였다. Babesiosis 에 대한 치료로 첫 치료 시 DM (Berenil®, MSD Animal Health, USA)을 4-6 mg/kg의 용량으로 근육투여 하였다. 이후 10-14 일

간격으로 내원하여 *Babesia* spp. 감염여부를 PCR 로 확인하여, *Babesia* spp.가 검출된 경우 동일용량의 DM 을 근육투여 하였다. 감염이 재발한 개체 6 마리와 재발하지 않은 5 마리, 두 군으로 나누어 실험을 진행하였으며, 감염이 재발한 개체의 경우 치료 후의 변이를 알아보기 위해 추가적으로 2 회 또는 3 회 10-14 일 간격으로 총 24 개의 혈액시료를 채취하였으며, 치료 전 채취한 혈액과 동일한 방법으로 처리하여 검사를 실시하였다. 치료 후 증상이 완화되었다가 다시 악화 된 경우, 약물 치료에도 불과하고 *Babesia* spp.가 PCR 검사에서 지속적으로 양성인 경우 재발로 판단하였다.

## 2) 일반혈액검사

Babesiosis 가 재발한 개체 12 마리와 재발하지 않은 개체 4 마리에서 채취한 EDTA 처리한 혈액으로 MEK-6450 (Nihon Kohden, Japan)을 이용하여 일반혈액검사(CBC, complete blood cell count)를 실시하였다. CBC 검사로 WBC (white blood cell), RBC (red blood cell), Hb (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW (red cell distribution width)와 혈소판 수를 확인하였다. 치료 전과 치료 이후 총 16 마리를 대상으로 CBC 검사를 실시하였으며, CBC 결과는 두 군을 대상으로 비교분석 하였다.

### 3) *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP

#### 1 DNA 추출

모두 11 마리에서 채취한 24 개의 혈액시료에서 gDNA 를 추출하였다. 각 혈액시료 300  $\mu$ l에서 G-DEX™ IIb Genomic DNA Extraction Kit for Blood (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 genomic DNA 를 추출하였으며, 추출은 원인체 DNA 추출방법에 준하여 실시하였다. 추출한 DNA 는 분광광도계(NanoVu, GE healthcare bioscience, USA)를 이용하여 최종 농도가 100 ng/ $\mu$ l 되도록 조정 한 뒤 사용시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다

#### 2 PCR 및 염기서열분석

혈액에서 추출한 gDNA 에서 *Babesia gibsoni* 미토콘드리아의 cytochrome *b* 를 증폭하기 위하여 primer set 을 제작하였다. Primer 제작은 Asian *Babesia gibsoni* cytochrome *b* (Genbank accession number AB215096)를 기준으로, primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>)와 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하였다. PCR 조건은 Table 3 와 같이 설정하였으며, Dr. MAX MasterMix (2X) with Dye (Docterprotein, Korea)를 이용하여 PCR (C1000™ Thermal

Cycler, BIO-RAD, USA)을 실시하였다. PCR 산물은 100 bp DNA ladder marker (Enzynomics, Korea)와 함께 1.5% agarose gel 에 전기영동하여 확인하였다. 전기영동하여 밴드가 확인된 PCR 산물은 염기서열분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

**Table 3.** PCR primer set and reaction conditions used in this study

Species and target gene	Primer	Oligonucleotide sequences (5'–3')	Product size (bp)	PCR condition			
				Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
<i>Babesia gibsoni</i> <i>cytb</i> gene	Bgcytb-F	ACCAACAAGTTAACATTTGC	1144	95°C/30s	58°C/30s	72°C/60s	35
	Bgcytb-R	ATGCAAACCTCCCGGCTAAAC					

### III. 결 과

#### 1. 제주도내 개에서 진드기매개 질병 조사

##### 1) 항체검사

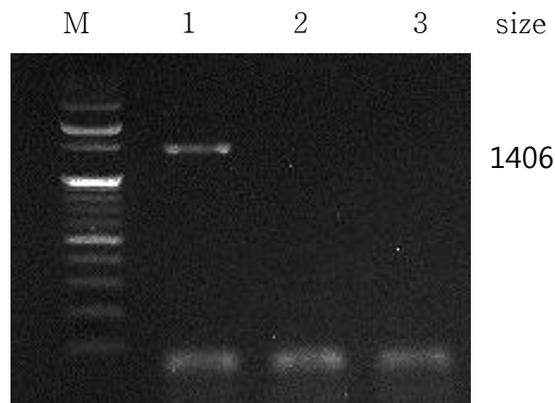
Anaplasmosis, ehrlichiosis, borreliosis 에 대한 스크리닝 검사로 Anigen Rapid CaniV-4 Test Kit (Bionote, Inc., Korea)를 사용하여 *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*와 *Borrelia burgdorferi*의 항체 존재 여부를 확인한 결과, 키트 검사에 양성인 결과를 나타낸 개체는 한 마리도 없었다.

**Table 4.** Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* investigated by Anigen Rapid CaniV-4 Test Kit

Bacterial agents	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
The number of dogs positive for (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

## 2) 원인체 동정

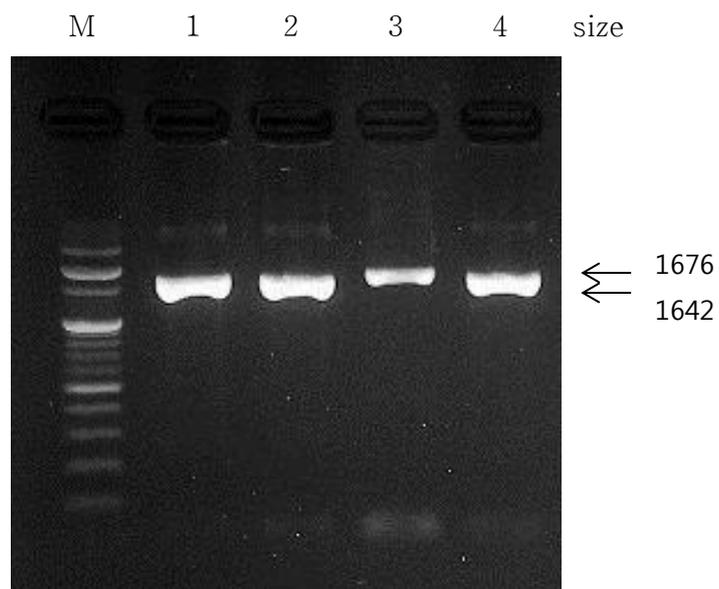
총 363 마리의 혈액에서 추출한 gDNA 시료 중 *Anaplasma/Ehrlichia* spp. 양성인 개체는 한마리도 없었다(Figure 1).



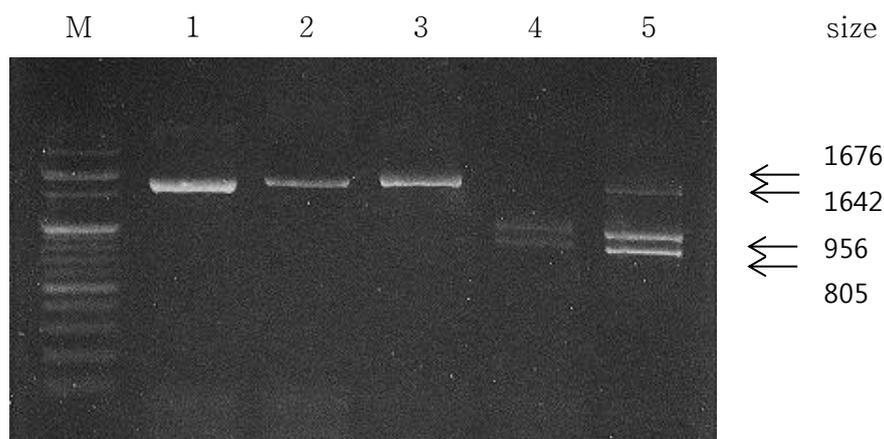
**Figure 1.** Analysis of PCR product of *Anaplasma/Ehrlichia* spp. by 1.5% agarose gel electrophoresis. The size of amplified 16s rRNA product using AE1 primer set is 1406 bp. Lane M, 100bp DNA ladder marker; 1, positive control; 2,3,4, gDNA from dogs.

*Babesia/Hepatozoon* spp. 검사에서, 92마리(25.34%)가 1642와 1676bp 크기의 PCR 산물이 증폭되어 양성으로 관찰되었다(Figure 2). 이 PCR 산물을 제한효소 *Pst*I 을 사용하여 반응한 후 전기영동할 결과, 절단되지 않은 1642bp의 단일 밴드를 유지하는 *Babesia* spp.에 양성인 개체는

69마리(19.01%), 두 개의 밴드로 절단되어 956bp와 805bp로 나누어지는 *Hepatozoon* spp.에 양성인 개체는 44마리(12.12%)였다. 그리고 1642bp, 956bp와 805bp 3개의 밴드로 절단되어 *Babesia* spp.와 *Hepatozoon* spp.에 중복감염된 개체는 21마리(5.79%)로 나타났다(Figure 3, Table 5).



**Figure 2.** Analysis of PCR products of *Babesia/Hepatozoon* spp. by 1.5% agarose gel electrophoresis. The sizes of PCR product of amplified 18s rRNA of *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. are 1642 bp and 1676 bp, respectively. Lane M, 100bp DNA ladder marker; Lane 1, 2, 4, *Babesia* spp.; Lane 3, *Hepatozoon* spp.



**Figure 3.** Analysis of PCR and PCR-RFLP products of *Babesia/Hepatozoon* spp. by 1.5% agarose gel electrophoresis. The size of PCR-RFLP fragment of *Babesia* spp. after digestion with *Pst* I is 1642bp and the size of *Hepatozoon* spp.'s are 956bp and 805bp. Lane M, 100bp DNA ladder marker; Lane 1, PCR product of *Babesia* spp.; Lane 2, PCR product of *Hepatozoon* spp., Lane 3, PCR-RFLP product of *Babesia* spp.; Lane 4, PCR-RFLP product of *Hepatozoon* spp.; Lane 5, PCR-RFLP product of coinfection of *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp.

**Table 5.** Result of PCR and PCR-RFLP for detecting *Babesia/Hepatozoon* spp. (n=363)

The number of <i>Babesia/Hepatozoon</i> spp. (%)		
<i>Babesia</i> spp.	<i>Hepatozoon</i> spp.	Coinfection
69/363	44/363	21/363
(19.01)	(12.12)	(5.79)

## 2. *Babesia gibsoni* cytochrome *b*의 SNP 조사

### 1) 일반혈액검사

Babesiosis로 제주대학교 동물병원에 내원한 16마리의 환자를 대상으로 *Babesia gibsoni* 치료 전 CBC 검사에서 WBC와 MCV, MCH의 평균은 정상범위로 나타났다. 그러나 RBC, Hb, HCT, MCHC와 혈소판 수의 감소가 나타났으며, RDW는 증가하였다(Table 6). 이들 16마리 중 DA (Berenil<sup>®</sup>, MSD Animal Health, USA)로 치료 후 재발한 개체 12마리의 일반혈액검사 결과와 재발하지 않은 개체 4마리의 일반혈액검사 결과를 비교 분석한 결과, 두 군 모두 RDW가 약간 상승한 것으로 나타났으나, 검사결과 간의 유의적 차이는 없었다(Table7).

**Table 6.** The CBC results of dogs infected with *Babesia gibsoni* before treatment using DA (n=16)

	Mean	Values		Reference range
		Minimum	Maximum	
WBC ( $10^9/L$ )	15.41 $\pm$ 9.10	4.0	39.24	6–17
RBC ( $10^{12}/L$ )	2.93 $\pm$ 1.46†	1.06	5.92	5.5–8.5
Hb (g/dL)	6.30 $\pm$ 2.81†	2.3	11.7	12–18
HCT (%)	19.49 $\pm$ 7.89†	9.8	34.0	37–55
MCV (fL)	69.62 $\pm$ 8.68	56.9	87.0	60–77
MCH (pg)	22.73 $\pm$ 3.21	17.7	31.8	19.5–24.5
MCHC (g/dL)	31.90 $\pm$ 2.24†	25.5	35.5	32–36
RDW (%)	19.39 $\pm$ 4.64†	13.5	29.4	12–16
Platelet ( $10^9/L$ )	75.75 $\pm$ 86.81†	2	377	200–500

† Values, out of reference range

**Table 7.** The comparative analysis of CBC results from dogs between relapse and non-relapse of babesiosis after treatment against *B. gibsoni* using DA

	Relapse (n=16)	Non-relapse (n=4)	p value	Reference range
WBC ( $10^9/L$ )	11.74 $\pm$ 5.06	9.86 $\pm$ 1.93	0.58	6–17
RBC ( $10^{12}/L$ )	6.33 $\pm$ 0.62	4.57 $\pm$ 1.48	0.16	5.5–8.5
Hb (g/dL)	13.93 $\pm$ 1.27	12.13 $\pm$ 2.50	0.12	12–18
HCT (%)	42.33 $\pm$ 3.28	38.03 $\pm$ 7.30	0.81	37–55
MCV (fL)	67.39 $\pm$ 7.20	72.48 $\pm$ 5.95	0.65	60–77
MCH (pg)	22.15 $\pm$ 2.26	23 $\pm$ 0.85	0.61	19.5–24.5
MCHC (g/dL)	32.90 $\pm$ 1.23	31.83 $\pm$ 1.56	0.69	32–36
RDW (%)	17.40 $\pm$ 2.99†	16.43 $\pm$ 1.25†	0.34	12–16
Platelet ( $10^9/L$ )	255.64 $\pm$ 158.94	256.25 $\pm$ 181.24	0.58	200–500

† Values, out of reference range

## 2) PCR 및 염기서열 분석

*Babesia gibsoni* cytochrome *b* 의 염기서열을 확인하여 Asian *Babesia gibsoni* cytochrome *b* (Genbank accession number AB215096)를 기준으로 비교 분석한 결과, 모두 24 개 시료 중 총 12 곳에서 SNP 가 나타났다. 이들 중 nt 44 와

nt 51 은 모든 24(100%)개의 시료에서 변이가 나타났으며, nt 96 에 변이가 나타난 시료는 13 개(54.17%), nt456 과 nt741 은 2 개(8.33%)로 나타났다. 이들 중 아미노산의 치환이 확인된 부위는 모두 3 곳이었으며, 류신(Leu)이 페닐알라닌(Phe)으로 치환된 nt 507 의 SNP 는 1 개(4.17%), 발린(Val)이 이소류신(Ile)으로 치환된 nt 604 와 nt 856 의 SNP 는 각각 2 개(8.33%)와 1 개(4.17)로 나타났다(Table 8). 이 아미노산 치환은 2 개의 시료에서 확인되었으며, 둘 다 babesiosis 가 재발하지 않은 개체에서 검출된 *B. gibsoni* 로 나타났다. 또한 babesiosis 치료 후 재발한 개체와 재발하지 않은 개체 사이의 *B. gibsoni* cytochrome *b* 의 SNP 위치를 비교한 결과, 모든 시료에서 변이가 나타난 nt 44 와 nt 51 이외에, 재발한 개체의 *B. gibsoni* cytochrome *b* 에서 재발하지 않은 것과 다른 nt 96(CTG>CTT)과 nt 726(CCA>CCG)의 SNP 가 나타났으나, 잠재성 돌연변이로 아미노산의 치환은 나타나지 않았다(Table 9). 또한 재발한 개체 사이에서 DA 로 치료 전과 후의 유의한 차이도 나타나지 않았다.

**Table 8.** The frequency of nucleotide and deduced AA substitutions in *B. gibsoni* *cytb* gene, compared with standard sequence of the *B. gibsoni* *cytb* gene (DDBJ/GenBank/EMBL accession number, AB215096)

Site	Substitutions		Frequency (%)
	Nucleotide	Amino acid	
nt 44	ACT>AAT	–	24/24 (100.00)
nt 51	GGG>GGA	–	24/24 (100.00)
nt 96	CTG>CTT	–	11/24 (45.83)
	CTG>CTA		2/24 (8.33)
nt 201	GCT>GCC	–	1/24 (4.17)
nt 396	CTG>CTA	–	1/24 (4.17)
nt 456	CCA>CCG	–	2/24 (8.33)
nt 507	TTG>TTT	L169F	1/24 (4.17)
	TTG>TTA	–	1/24 (4.17)
nt 604	GTT>ATT	V604I	2/24 (8.33)
nt 726	CCA>CCG	–	1/24 (4.17)
nt 741	TTA>TTG	–	2/24 (8.33)
nt 856	GTT>ATT	V286I	1/24 (4.17)
nt 945	TTA>TTG	–	1/24 (4.17)

L; Leucine, F; Phenylalanine, V; Valine , I; Isoleucine

**Table 9.** Substitution sites of *B. gibsoni cytb* gene in dogs, (A) SNP of *B. gibsoni cytb* in relapse dogs, (B) SNP of *B. gibsoni cytb* in non-relapse dogs, after treatment against *B. gibsoni* using DA

(A)	Substitution sites		(B)	Substitution sites
	Relapse			Non-relapse
	Before treatment	After treatment		
JAHBg01	–	–	JAHBg07	–
JAHBg02	–	–	JAHBg08	nt 201
JAHBg03	nt 96 (G>T), 742	–	JAHBg09	–
JAHBg04	nt 96 (G>T), 742	nt 96 (G>T), 742	JAHBg10	nt 96 (G>A), 396, 456, 507, 604, 856
JAHBg05	nt 96 (G>T), 742	nt 96 (G>T), 742	JAHBg11	nt 96 (G>A), 456, 604, 726, 945
JAHBg06	nt 96 (G>T), 742	nt 96 (G>T), 742		

Except SNP in nt 44 and nt 51

## IV. 고 찰

국내에 분포하는 진드기 중 개를 숙주로 하는 진드기로는 *Haemaphysalis longicornis*, *H. flava* 와 *H. japonica* 가 보고되어 있으며(24), 국내에 보고된 개의 진드기매개 질병으로는 anaplasmosis, ehrlichiosis, lyme borreliosis, babesiosis 가 있다(2, 6, 17, 42). 국내의 개(4)와 사람(20)에서 *Ehrlichia* spp. 와 *Anaplasma* spp.에 대한 항체가 검출되었으며, 개에서 *A. phagocytophilum*(2)과 *E. chaffeensis*(42)가 검출되었다. 제주지역의 *H. longicornis* 에서도 *A. phagocytophilum* 과 *E. chaffeensis* 가 발견되었으며(23), 노루에서의 *A. phagocytophilum* 감염 보고도 있으나(1), 개에서의 감염은 보고된 바 없다. Lyme borreliosis 의 경우 사람에서 *Borrelia burgdorferi*에 의한 감염사례는 있으나 제주지역에서 감염된 경우는 없었으며(33), 경기도내의 사냥견에서 항체가 검출된 경우는 있었으나(17), 아직까지 항원 검출에 대한 보고는 없다. 또한, 살쥬이에서 *H. canis* 가 검출되었으며(26), 제주지역에서 감염 보고는 없으나 동물병원에서의 임상감염 사례는 종종 있다. Babesiosis 의 경우 제주지역에서 *Babesia* spp. 감염 사례가 있으며(6), 아시아 전역에서는 *B. gibsoni*에 의한 canine babesiosis 가 주로 발생하고 있다(13).

제주도내 363 마리의 개를 대상으로 진드기 매개 질병을 조사한 결과, *Babesia* spp.와 *Hepatozoon* spp.가 각각 19.01%, 12.12%로 확인되었으며, *Hepatozoon* spp.에 단독감염인 경우도 23 마리(6.34%)였다. 또한, *Babesia* spp.에 양성을

보인 개체 69 마리 중 *Hepatozoon* spp.에 감염된 경우가 21 마리로 30.43%로 나타났다. 한 개체에서 여러 진드기매개 질병의 중복 감염도 가능하며, 이러한 경우에는 여러 복합적인 증상으로 인해 진단을 내리거나 예후 판단을 하는 것이 어렵다(25). 또한, Hepatozoonosis 치료에 주로 사용하는 약물은 imidocarb dipropionate 로(7), 현재 *B. gibsoni* 에 가장 효과적인 약물 중 하나인 diminazene aceturate 에 대한 효과는 알려져 있지 않다. 이러한 이유로 diminazene aceturate 를 이용하여 *B. gibsoni* 감염에 대한 치료 시 *Hepatozoon* spp. 중복 감염 여부를 확인하는 것이 바람직 할 것이다.

제주지역에서 발견된 *H. longicolnis* 에서 *Anaplasma phagocytophilum* 과 *Ehrlichia chaffeensis* 가 검출되었으나(1, 23), 본 연구 결과 개에서 감염 사례는 아직 없는 것으로 나타났다. 이는 anaplasmosis 와 ehrlichiosis 의 경우 계절적인 영향을 많이 받기 때문에(18) 채혈의 시기와도 연관이 있는 것으로 추정된다. 진드기에서는 검출되었으나 개에서의 감염은 확인되지 않았으므로 발병이 많은 봄과 여름을 기점으로 향후 추가적인 조사가 필요하다.

개에서 분리된 *B. gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP 에 대한 조사에 앞서 진행된 CBC 검사 결과 babesiosis 로 제주대학교 동물병원 내원 시 현저한 hemoglobin, HCT, RBC 와 혈소판 수의 감소가 있었으며, RDW 의 증가를 보였다. 그러나 치료 후 약간의 RDW 의 증가는 보였으나, 재발하지 않은 개체와 재발한 개체 사이의 CBC 결과 상의 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. 재발한 개체의 경우, 치료 이후에도 여전히 *B. gibsoni* 에 감염되어 있지만 CBC 검사상 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이에 따라, CBC 결과는 정상범위지만 *Babesia*

spp.에 여전히 감염되어 있는 개체의 경우 추후 당질글루코코이드의 사용에 의해 임상증상이 나타날 수 있으므로(5), 치료 후 CBC 검사와 더불어 PCR 을 통해 병원체가 제거되었는지 확인하여야 할 것이다.

Babesiosis 로 진단된 환자를 diminazene aceturate 로 치료한 후 *B. gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP 를 조사한 결과 총 12 곳의 SNP 가 확인되었다. 그러나 기존의 *B. gibsoni* 감염에서 atovaquone 으로 치료 후 cytochrome *b* nt363 의 SNP 로 M121I 변이가 확인되었다는 연구결과와 달리(31), 본 연구에서는 치료 전과 후, 재발 여부에 따른 SNP 유무와 위치의 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. *Trypanosoma* spp.와 *Leishmania* spp.의 경우, DB75 (diamidine 2,5-bis (4-amidinopheyl) furan 75)와 DB820(diamidine 2,5-bis (4-amidinopheyl) furan 820)과 같은 aromatic diaminine 유사체들은 미토콘드리아 내에 국한되며(27, 30), *Leishmania* 는 이들 약물에 노출된 후 미토콘드리아 초미세구조의 변화와 미토콘드리아 막 전위 감소를 보였다(28, 36). 또한 저항성을 가진 경우, 감소된 미토콘드리아 막전위는 많은 수의 미토콘드리아 dehydrogenases 와  $F_1F_0$ -ATPase 의 발현의 하향조절과 관련이 있으며, 이는 cytochrome *c* oxidase 활성도의 다면 발현성의 감소를 야기한다(39). 게다가 *Trypanosoma brucei* 의 경우, P2 뉴클레오시드 수송 기능의 손실이 DA 에 대한 저항성과 연관이 있다(15, 40). *Babesia gibsoni* 의 경우, ATV 과 AZM 혹은 ATV 단독으로 치료 후 재발한 경우 그 기전은 아직 알려지지 않았지만, cytochrome *b* 특정위치에 SNP (Single nucleotide polymorphism)가 나타났다는 조사결과가 있다(31, 34). 이와 같이

*Trypanosoma* 와 *Leishmania* 의 경우 DA 혹은 유사체에 대한 저항 기전은 알려져 있으며, *B. gibsoni* 의 경우 ATV 에 의한 저항성으로 인한 것으로 추측되는 cytochrome *b* 의 SNP 에 대한 보고가 있다.

이와 같이 *Babesia* spp.의 경우에도 미토콘드리아와 관련된 약물 저항성 기전을 가질 수도 있으나, cytochrome *b* 유전자와 diminazene aceturate 에 대한 내성과 관련된 것으로 보이는 SNP 는 나타나지 않았다. 그러나 본 연구에서 확인한 부위는 cytochrome *b* 에 국한되었으므로 향후 cytochrome *c* 에 대한 추가적인 조사가 필요하다.

## V. 결 론

제주 지역에서 개의 진드기매개 질병을 조사하기 위해, 125 마리의 유기견과 238 마리의 사육견을 대상으로 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp.의 감염률을 확인하였고, 이들 중 *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP 에 대해 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제주 지역 야외견 363 마리의 혈액에서 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp.의 감염률을 조사한 결과 *Babesia* spp.가 69 마리(19.01%), *Hepatozoon* spp.가 44 마리(12.12%)에서 발견되었으며, 두 병원체 모두 발견된 개체는 21 마리(5.79%)였다. *Anaplasma* spp.와 *Ehrlichia* spp.가 검출된 개체는 없었다. 또한, 125 마리를 대상으로 항체 키트 검사를 한 결과 *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis* 와 *Borrelia burgdorferi*의 항체 형성이 확인된 개체는 없었다.

2. Babesiosis 로 제주대학교 동물병원에 내원한 16 마리를 대상으로 치료 후 감염 재발여부에 따라 CBC 결과를 비교한 결과, 재발한 개체와 재발하지 않은 개체 사이 CBC 결과의 유의성은 없었다.

3. Babesiosis 로 제주대학교 동물병원에 내원하여 diminazene aceturate (Berenil<sup>®</sup>, MSD Animal Health, USA)로 치료받은 11 마리 개체에서 *Babesia gibsoni* 를 검출하여 cytochrome *b* 유전자의 SNP 를 조사한 결과, 재발한 개체와 재발하지 않은 개체 사이의 유의한 차이는 없었으며, 치료 전과 후의 유의한 차이도 없었다.

이상의 결과로 개의 진드기매개 질병 중 제주지역에서 *Babesia* spp.와 *Hepatozoon* spp. 가 확인되었으며, 이들 중 상당수는 중복감염이었다. 또한, *Babesia gibsoni* cytochrome *b* 유전자의 SNP 를 조사한 결과, 감염 재발과 cytochrome *b* 유전자와의 연관성은 없는 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. 이상. 2013. 제주 노루의 흡혈절지동물 매개에 의한 주혈기생충성 질병 조사. 제주대학교 대학원. 제주.
2. 이숙이. 2013. Molecular and Serological Detection of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Shelter Dogs in Seoul. 경북대학교 대학원. 대구.
3. 한국동물분류학회. 한국동물명집. 서울: 고려과학 1997.
4. Kim TH, Kim YH, Choi JH, Park HJ, Chung DW, Kim DH, Song KH. Seroprevalence of Dogs with *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia canis* Infection in the Daejeon City and Kangwon Province. J Vet Clin 2010; 27: 631–634.
5. Masuda T, Baba E, Arakawa A. Relapse of canine babesiosis after prednisolone treatment. Mod Vet Pract 1983; 64: 931–932.
6. Seung Tae O, Ho Choon W. Prevalence of *Babesia* spp. in dogs of Seogwipo-si, Jeju-do, South Korea. Korean journal of veterinary service 2009; 32: 377–380.
7. Baneth G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. Vet Parasitol 2011; 181: 3–11.
8. Baneth G, Harmelin A, Presentey BZ. *Hepatozoon canis* infection in two

- dogs. J Am Vet Med Assoc 1995; 206: 1891–1894.
9. Baneth G, Weigler B. Retrospective case–control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. J Vet Intern Med 1997; 11: 365–370.
  10. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 4172–4177.
  11. Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis—a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. J Small Anim Pract 1999; 40: 20–24.
  12. Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 885–904.
  13. Boozer L, Macintire D. *Babesia gibsoni*: An emerging pathogen in dogs. Compend Contin Educ Vet 2005; 27: 33–42.
  14. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2645–2651.
  15. Carter NS, Berger BJ, Fairlamb AH. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen–sensitive and –resistant *Trypanosoma brucei brucei*. J Biol Chem 1995; 270: 28153–28157.

16. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32: 589–595.
17. Choi US, Kim HW, You SE, Youn HJ. A suspected case of Lyme borreliosis in a hunting dog in Korea. J Vet Sci 2009; 10: 89–91.
18. Dryden MW, Payne PA. Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. Vet Ther 2004; 5: 139–154.
19. Farwell GE, LeGrand EK, Cobb CC. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. J Am Vet Med Assoc 1982; 180: 507–511.
20. Heo E, Park J, Koo J, Park M, Park M, Dumler J, Chae J. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. J Clin Microbiol 2002; 40: 3082–3085.
21. Irwin PJ, Hutchinson GW. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. Aust Vet J 1991; 68: 204–209.
22. Jacobson LS, Clark IA. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. J S Afr Vet Assoc 1994; 65: 134–145.
23. Jae Young O, Bong Chun M, Bo Kyoung B, Shin EH, Young Hwan K, Young Joo K, Yong Ho P, Joon Seok C. Genetic Identification and Phylogenetic Analysis of *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species in

- Haemaphysalis Longicornis* Collected from Jeju Island, Korea. JBV 2009; 39: 257–267.
24. Kim BJ, Kim H, Won S, Kim HC, Chong ST, Klein TA, Kim KG, Seo HY, Chae JS. Ticks collected from wild and domestic animals and natural habitats in the Republic of Korea. Korean J Parasitol 2014; 52: 281–285.
25. Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, McPherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. J Clin Microbiol 1999; 37: 2631–2638.
26. Kubo M, Jeong A, Kim SI, Kim YJ, Lee H, Kimura J, Agatsuma T, Sakai H, Yanai T. The first report of *Hepatozoon* species infection in leopard cats (*Prionailurus bengalensis*) in Korea. J Parasitol 2010; 96: 437–439.
27. Lanteri CA, Tidwell RR, Meshnick SR. The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 875–882.
28. Lanteri CA, Trumpower BL, Tidwell RR, Meshnick SR. DB75, a novel trypanocidal agent, disrupts mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3968–3974.
29. Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010; 40: 1121–1140.

30. Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2185–2191.
31. Matsuu A, Miyamoto K, Ikadai H, Okano S, Higuchi S. Cloning of the *Babesia gibsoni* cytochrome *B* gene and isolation of three single nucleotide polymorphisms from parasites present after atovaquone treatment. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 593–597.
32. Matsuu A, Yamasaki M, Xuan X, Ikadai H, Hikasa Y. In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against *Babesia gibsoni* (Aomori strain). *Vet Parasitol* 2008; 157: 1–8.
33. Moon S, Hong Y, Hwang KJ, Kim S, Eom J, Kwon D, Park JH, Youn SK, Sohn A. Epidemiological features and clinical manifestations of Lyme borreliosis in Korea during the period 2005–2012. *Jpn J Infect Dis* 2015; 68: 1–4.
34. Sakuma M, Setoguchi A, Endo Y. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 493–498.
35. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2215–

2222.

36. Sereno D, Michon P, Brajon N, Lemesre JL. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes. Modulation of the resistance during in-vitro developmental life cycle. C R Acad Sci III 1997; 320: 981–987.
37. Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol 2001; 17: 74–80.
38. Skotarczak B. Canine borreliosis—epidemiology and diagnostics. Ann Agric Environ Med 2002; 9: 137–140.
39. Soto IC, Fontanesi F, Valledor M, Horn D, Singh R, Barrientos A. Synthesis of cytochrome *c* oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1F0-ATP synthase. Biochim Biophys Acta 2009; 1793: 1776–1786.
40. Teka IA, Kazibwe AJ, El-Sabbagh N, Al-Salabi MI, Ward CP, Eze AA, Munday JC, Maser P, Matovu E, Barrett MP, de Koning HP. The diamidine diminazene aceturate is a substrate for the high-affinity pentamidine transporter: implications for the development of high resistance levels in trypanosomes. Mol Pharmacol 2011; 80: 110–116.
41. Tozon N, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Clinical and laboratory features of the first detected cases of *A. phagocytophila* infections in dogs from Slovenia. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 424–428.

42. Yu D, Li Y, Yoon J, Lee J, Lee M, Yu I, Chae J, Park J. *Ehrlichia chaffeensis* infection in dogs in South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 355–358.