



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

Babesia gibsoni 자연 감염견에서의
Atovaquone/Proguanil 합제와
Azithromycin 병용 투여에 따른 치료 효과



제주대학교 대학원

수의학과

이 대 근

2015년 2월

Babesia gibsoni 자연 감염견에서의
Atovaquone/Proguanil 합제와
Azithromycin 병용 투여에 따른 치료 효과

지도교수 이 경 갑

이 대 근

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함



이대근의 수의학 석사논문을 인준함

심사위원장 _____(인)

위 원 _____(인)

위 원 _____(인)

제주대학교 대학원

2015년 2월

Abstract

Clinical Efficacy of Atovaquone/Proguanil and Azithromycin Combination Therapy in Dogs Naturally Infected with *Babesia gibsoni*

Daekeun Lee

(Supervised by professor Kyoungkap Lee)

Department of Veterinary Medicine,
Graduate School, Jeju National University

This study was performed to estimate evaluate the clinical use of combination therapy with atovaquone/proguanil and azithromycin combination as an equivalent treatment in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. Eight mixed-dogs infected naturally with *B. gibsoni* were used in this study. Four dogs of experimental group (No. 1-4) were received atovaquone/proguanil and azithromycin therapy and the other four dogs of control group (No. 5-8) were administered diminazene aceturate. All the dogs in this study showed mild to severe anemia and thrombocytopenia. *B. gibsoni* in blood smears was also disappeared after initiation of treatment. All of the experinmental group PCR analysis showed

negative results during the observation period, but more than 1 dog of control group PCR analysis showed continuous positive results during the observation period. In this study, we evaluate therapeutic effectiveness of atovaquone/proguanil and azithromycin combination drug therapy. atovaquone/proguanil and azithromycin combination drug therapy can significantly lower *B. gibsoni* parasite levels and the results suggest that the therapeutic protocol is a new candidate for effective treatment in dogs infected with *B. gibsoni*.

Key words : *Babesia gibsoni*, Atovaquone/Proguanil, Azithromycin, Diminazene aceturate, Dog.



목 차

영문 초록

| | | | |
|-------------|-------|-------|----|
| I. 서 | 론 | | 1 |
| II. 재료 및 방법 | | | 3 |
| III. 결 | 과 | | 8 |
| IV. 고 | 찰 | | 17 |
| V. 결 | 론 | | 21 |
| VI. 참 고 문 헌 | | | 22 |

I. 서 론

바베시아는 전세계적으로 소, 양, 돼지, 말, 개, 사람에서 진드기에 의해 발생하는 원충성 질병이다[4, 7]. 개의 바베시아는 크게 형태학적으로 소형과 대형으로 나뉘며, 우리 나라를 비롯한 아시아 전역에서는 *Haemaphysalis longicornis* 와 *Haemaphysalis bispinosa*가 매개하는 *Babesia gibsoni*가 주로 발생하고 있다 [13]. 이러한 *B. gibsoni*는 일반적으로 진드기의 흡혈에 의해 감염되며[7], 감염견으로부터 수혈[4] 및 모체이행을 통한 태반감염 등에 의해서도 감염된다 [6]. *B. gibsoni*는 진드기가 주로 활동하는 봄부터 초겨울에 이르기까지 발생하지만, 최근 제주도 뿐만 아니라 한강 이북지역까지 발생되고 있다[15, 24].

바베시아의 주된 임상증상은 용혈성 빈혈에 따른 점막창백, 혈색소뇨이며, 빈맥, 빈 호흡, 발열, 식욕저하, 침울, 황달 및 비장종대가 나타난다[3, 6]. 현재까지 바베시아에 대한 주된 치료법으로 diminazene aceturate가 사용되어 왔으나, 근육주사 부위의 괴사[23], 소뇌 출혈에 의한 신경증상, 발작 및 간 독성 등의 부작용이 있으며[8], 약물에 대한 내성의 발현 및 높은 재발률과 같은 문제점이 보고되고 있다[31]. 더욱이 diminazene aceturate는 더 이상 생산이 되지 않기 때문에 이를 대신할 대체 약물이 필요한 실정이다. 항원충 효과를 가진 약물로 lincosamide계 항생제인 clindamycin, tetracycline계 항생제인 tetracycline과 doxycycline 그리고 nitroimidazole계 항생제인 metronidazole 등이 *B. gibsoni* 치료에 사용되고 있으나, 3개월 이상의 긴 투여 시간이 소요되며, 급성 바베시아 감염 시에는 수혈과 같은 보조적인 치료가 필요한 것으로 알려져 있다[18, 32].

이러한 문제점으로 인하여 최근 *B. gibsoni*의 치료에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. Atovaquone의 *B. gibsoni*에 대한 치료 효과가 보고되어 사용되었으나[1, 17, 19, 22], atovaquone의 단독 치료에서 cytochrome *b*의 nt363에서 methionine이 isoleucine으로 대체되는 M121I의 발현으로 atovaquone에 대한 저항성 원충이 나타나며 재발된다고 하였다[14, 21, 30]. 이를 보완할 수 있는 azithromycin합제 치료가 보고되었으나, 이 또한 초기 바베시아 치료에 효과적이지만 충체를 완벽히 사멸시키지 못하는 것으로 알려져 있다[2, 12, 26]. 최근에는 사람에게서 원충성 질병인 말라리아를 예방, 치료하는 약물로써 사용되는 atovaquone과 proguanil합제를 통한 *B. gibsoni* 치료 효과가 보고되었다[9, 10, 25, 29]. 현재 atovaquone/proguanil 합제가 M121I의 발현을 억제하는 기전은 연구되지 않았으나, 초기 *B. gibsoni* 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다 [9, 10].



본 연구에서는 *B. gibsoni*에 자연 감염된 개에서 atovaquone/proguanil과 azithromycin의 병용 투여를 통해 기존의 치료제인 diminazene aceturate와의 치료 효과를 비교 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

*B. gibsoni*에 자연 감염된 1년령 이하의 8마리 개를 실험에 사용하였다. 실험 전 기본 검사(나이, 성별, 임상증상, 신체검사) 및 혈액검사를 실시하였다 (Table 1). 실험은 제주대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 받아 실험지침에 준하여 실시하였다(2014-0008). 모든 실험 개는 실험 전 기본적인 백신과 구충을 모두 마친 상태였으며, 바베시아 발생 이전 항원충 치료를 했던 병력은 없었다. 실험 개 모두 비슷한 시기에 빈혈, 점막창백, 침울, 혈색소노 등의 임상증상을 나타내었다. 모든 개체의 혈액 Giemsa 염색 후 현미경 검사상에서 적혈구내 바베시아 의심 충체가 확인되었다.

2. 실험군 설정 및 투여 방법

바베시아 감염이 확인된 8마리의 개를 무작위로 선정하여 atovaquone / proguanil과 azithromycin 병용 투여 실험군 4마리(No. 1~4)와 기존 치료제인 diminazene aceturate를 주 치료로 하는 대조군 4마리(No. 5~8)로 나누어 실험하였다. 실험군의 1, 2, 3번 개체와 대조군의 5, 6, 7번 개체는 모두 한 어미의

자견으로 같은 장소에서 사육되고 있었으며, 실험군의 4번, 대조군의 8번 개체는 어미가 다른 개체였다. 실험군은 atovaquone(13~20 mg/kg)/proguanil(5~8 mg/kg)을 1일 8시간 간격으로 10일간 경구 투여하였으며, azithromycin(8~12 mg/kg)은 1일 1회 10일간 경구 투여하였다. 대조군은 diminazene aceturate(4~5 mg/kg)을 1주일에 1회 총 3회 근육 주사하였으며 동시에 tetracycline(5 mg/kg)과 clindamycin(10 mg/kg)을 1일 12시간 간격으로 14일 동안 경구 투여하였다[17, 25, 30]. 혈액검사, 혈청검사, Giemsa 염색 도말 검사 및 PCR 검사는 두 군 모두 실험 개시 3일, 10일, 20일과 30일째 실시하였다(Figure 1).

Table 1. The clinical signs of dogs before treatment and medicine administration protocol

| No | Age (month) | Sex | HCT (%) | PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | Parasitemia(%) | Clinical signs | Administration protocol |
|----|-------------|--------|---------|-----------------------------------|----------------|---|---|
| 1 | 6 | male | 31.8 | 388 | 8 | Anorexia | Atovaquone 13~20 mg/kg, PO, q8 hrs for 10 days |
| 2 | 6 | male | 34.3 | 266 | 14 | Anorexia | Proguanil 5~8 mg/kg, PO, q8 hrs for 10 days |
| 3 | 6 | male | 16.0 | 2 | 42 | Anorexia, Depression | Azithromycin 8~12 mg/kg, PO, q24 hrs for 10days |
| 4 | 12 | female | 13.0 | 100 | 36 | Anorexia, Pale mucus membrane | Diminazene aceturate 4~5 mg/kg, IM, once a week total 3 times injection |
| 5 | 6 | male | 25.4 | 3 | 44 | Anorexia Depression | Tetracycline 5 mg/kg, Clindamycin 10 mg/kg PO, q12 hrs for 14days |
| 6 | 6 | female | 34.0 | 377 | 22 | Anorexia | |
| 7 | 6 | male | 19.8 | 28 | 42 | Anorexia, Pale mucus membrane, Hemoglobinuria | |
| 8 | 8 | male | 33.7 | 2 | 48 | Anorexia | |

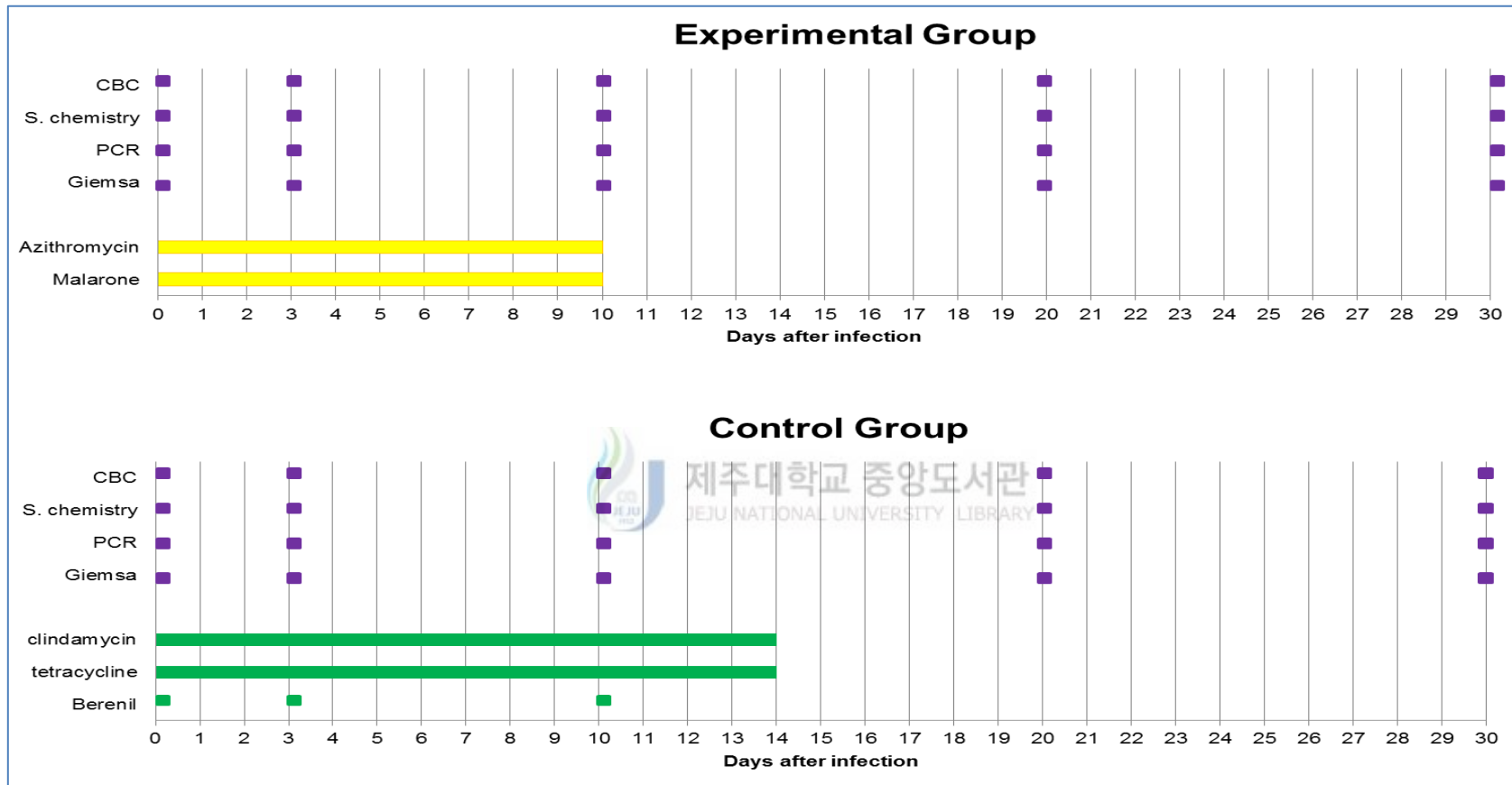


Figure 1. Schedule of CBC, serum chemistry, PCR, Giemsa staining and administration in each group.

3. 혈액검사 및 혈청검사

모든 실험 개의 혈액은 실험 3일, 10일, 20일과 30일째에 동일하게 경정맥으로 채혈하였으며, EDTA-3K와 Heparin 튜브에 각각 분주하였다. 혈액도말 표본을 Giemsa 염색약(Sigma-Aldrich, USA)과 인산 완충액(pH 6.6)을 1:9 희석하여 1시간동안 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 감염률은 도말 표본에서 적혈구 1,000개당 원충이 감염된 적혈구수(percentage; %)로 나타내었다. 완전 혈구계산(CBC)는 MEK-6450 (NIHON KODEN, Japan) 장비로 측정하였으며, 혈청검사는 Cobas C111 (ROCHE, Switzerland)을 이용하여 alkaline phosphatase(ALP), alanine aminotransferase(ALT), total bilirubin(T-BIL), blood urea nitrogen(BUN), creatinine(CREA), total protein(TP), albumin(ALB)을 측정하였다.



4. PCR 검사

혈중 DNA 는 G-DEX™ II b DNA Extraction Kit 를 (iNtRON Biotechnology, Korea) 이용하여 추출했다. PCR 에 사용할 모든 시료의 DNA 농도는 100 ng/ μ l (NanoVue, GE Healthcare, UK)로 적정하였다.

실험에 사용된 primer set 는 18S rRNA 의 일부로, *Babesia/Hepatozoon* 모두 증폭시키는 공통 primer set 를 사용하였다 (Table 2) [5, 11, 20].

Table 2. Oligonucleotide sequences of primers used to detect *Babesia gibsoni* and *Hepatozoon canis*

| Primer set | Tm | Sequence (5'-3') | Size (bp) |
|-------------|-----|---------------------------|------------|
| CBabe-18sF | 59℃ | GTT GAT CCT GCC AGT AGT | 1676, 1761 |
| CBabeB-18sR | | AAC CTT GTT ACG ACT TCT C | |

PCR 은 Forward primer 10 pmole, Reverse primer 10 pmole, 10× PCR Buffer 1×, dNTP mixture 2.5 mM each, Top-Taq™ 0.5 unit, DNA(100 ng/μl)를 포함한 20 μl 반응액에서 수행하였다. PCR 은 TM 600 thermal cycler(TAKARA Shuzo, Japan)을 이용하였으며, 도입단계는 94 °C 8 분, 다음단계는 38 사이클에서 94 °C 30 초, 59 °C 20 초, 72 °C 30 초, 그리고 마지막 72 °C 5 분으로 하였다. 공통 primer 를 이용한 *Babesia spp.* 의 증폭크기는 1,676 bp, *Hepatozoon canis* 의 증폭크기는 1,761 bp 이다.

PCR 산물은 1.8% agarose(EtBr) 젤 전기영동으로 확인하였으며, 공통 primer 양성 시료 중 *Babesia spp* 와 *Hepatozoon canis* 를 구별하기 위해서 PCR-RFLP 를 수행하였다. PCR-RFLP 는 PCR 산물 5 μl, Enzyme (PSTI) 1 μl, 10× H Buffer 1 μl, 증류수 3 μl를 포함한 10 μl mixture 를 2 시간동안 37 °C 에서 배양하고, 2% agarose(EtBr) 젤 전기영동으로 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈액도말검사

모든 실험 개의 혈액도말 현미경 검사에서 적혈구 내 난원형 모양의 $1.1\sim 2 \times 1.2\sim 4 \mu\text{m}$ 의 원충인 *B. gibsoni* 가 관찰되었다(Figure 2).

실험 개 8마리 모든 개에서 치료 전, 3일, 10일, 20일 그리고 30일째 채혈하여 적혈구 1,000개당 원충 감염률을 조사한 결과, 실험군의 원충 감염 정도는 치료 시 후 급속히 감소하여 치료 10일 후 충체를 현미경상에서 관찰 할 수 없었으며, 대조군 역시 치료 20일 후 충체를 현미경 상에서 관찰할 수 없었다 (Table 3).



Figure 2. Microscopic observation of *B. gibsoni* merozoite in circulating erythrocyte (red arrow), Giemsa staining ($\times 1,000$).

Table 3. Parasitemia(‰) in experimental and control group

| Parasitemia (‰) | | Day | | | | |
|--------------------|---|-----|---|----|----|----|
| | | 0 | 3 | 10 | 20 | 30 |
| Experimental | 1 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 14 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 42 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 36 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Control | 5 | 44 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 22 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| | 7 | 42 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 48 | 5 | 0 | 0 | 0 |

2. 임상증상



실험 시작 전 임상증상은 식욕저하, 기력저하, 점막창백, 혈색소뇨 등이 관찰되었으며, 실험 개 모두 치료 후 10일째부터 빈혈, 점막창백, 혈색소뇨 등의 임상증상을 나타내지 않았다(Table 4).

Table 4. Clinical signs in experimental and control group

| Clinical signs | Day | | | | | |
|----------------|-----|----------------------------|-------------------------|----|----|----|
| | | 0 | 3 | 10 | 20 | 30 |
| Experimental | 1 | AN(++) | AN(+) | - | - | - |
| | 2 | AN(++) | AN(+) | - | - | - |
| | 3 | AN(++) DE(++) | AN(+) | - | - | - |
| | 4 | AN(++) PM(+++) | AN(++) PM(+) | - | - | - |
| Control | 5 | AN(++) DE(++) | AN(+) | - | - | - |
| | 6 | AN(++) | AN(+) | - | - | - |
| | 7 | AN(++) PM(++) HU(++) | AN(+) PM(+) HU(+) | - | - | - |
| | 8 | AN(++) | AN(+) | - | - | - |

(AN: Anorexia, DE: Depression, PM: Pale mucus Membrane, HU: Hemoglobinuria)



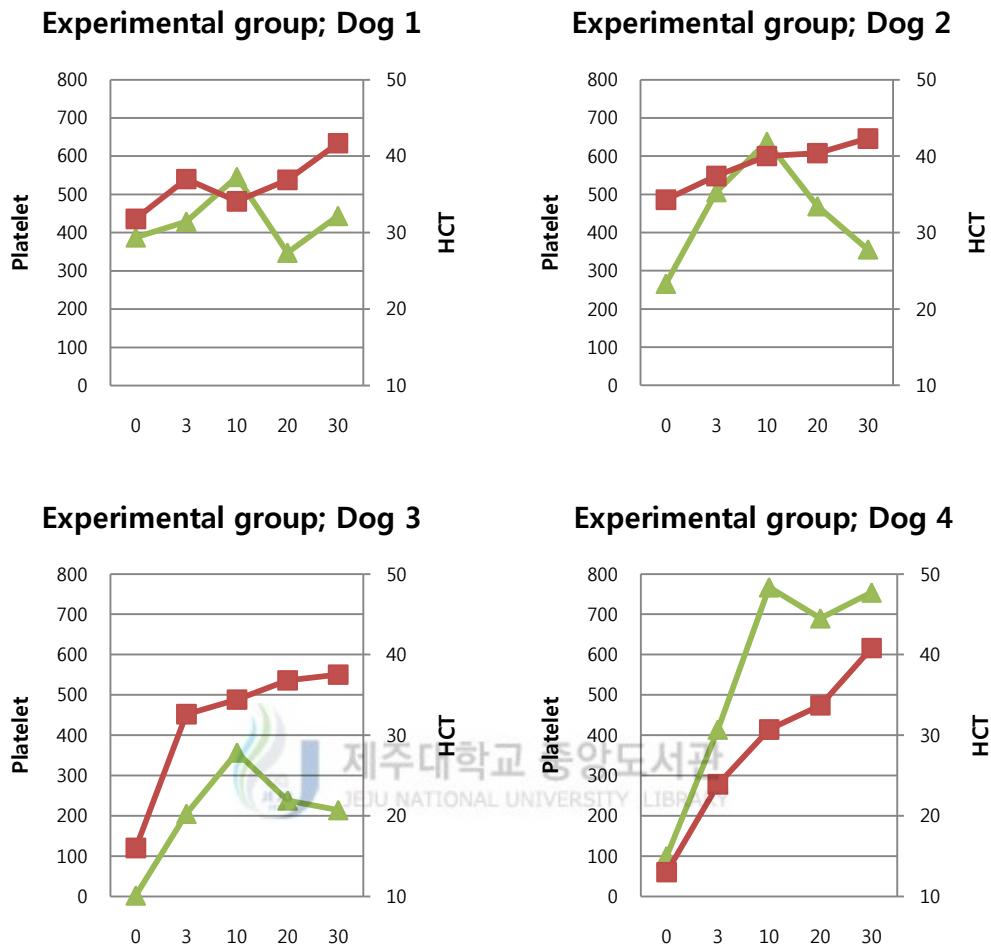


Figure 3. Changes of HCT and Platelet value in each dog of experimental group. (■: HCT, ▲: Platelet)

대조군 또한 중증의 빈혈을 보였던 5번과 7번 개체를 포함하여 HCT의 상승과 혈소판이 증가됨을 확인 할 수 있었지만 치료 20일 이후 7번 개체에서 다시 HCT의 감소 및 혈소판 감소증을 나타내었다(Figure 4).

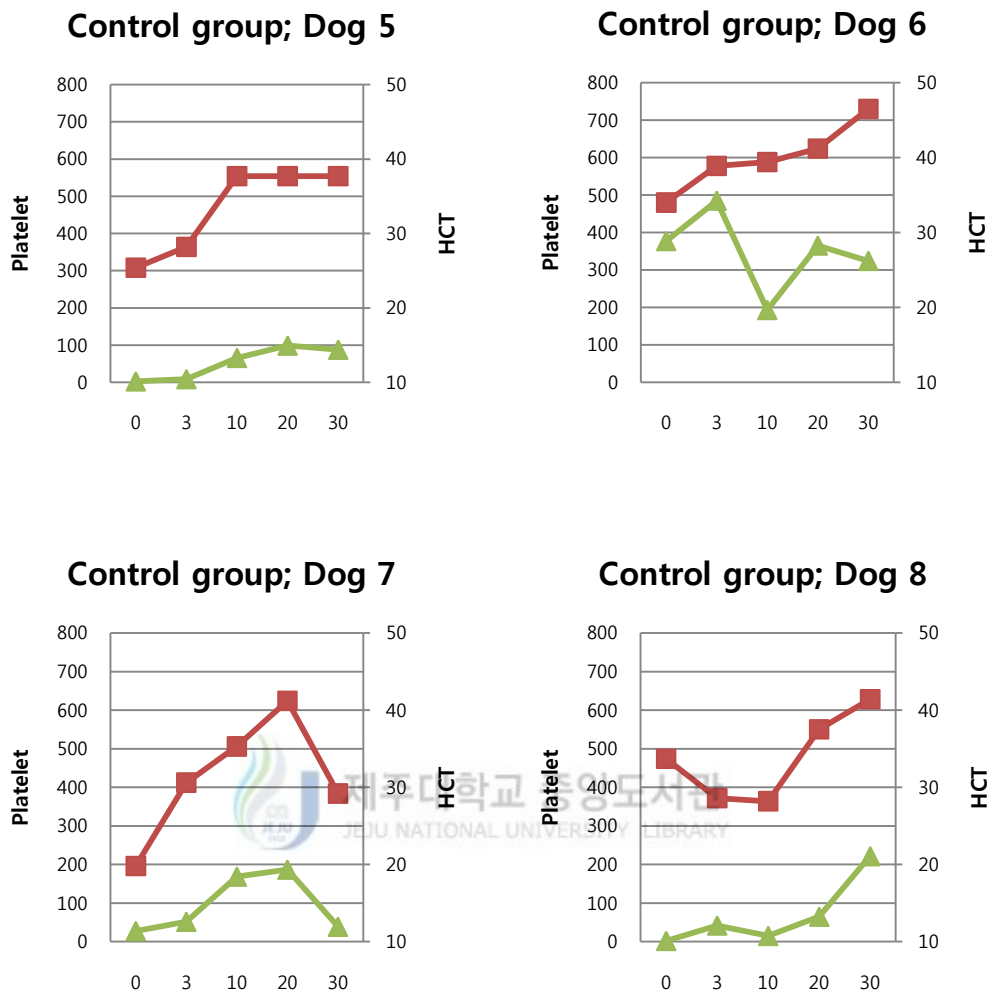


Figure 4. Changes of HCT, and Platelet value in each dog of control group. (■: HCT, ▲: Platelet)

실험군과 대조군 모두 치료 경과에 따른 혈청검사상 특이사항은 확인 할 수 없었다(Table 5). 치료에 따른 두 군 모두에서 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다.

Table 5. Serum chemistry of the experimental and control group

| | | Day | | | | |
|------------------|--------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 3 | 10 | 20 | 30 |
| ALP (U/L) | Experimental | 163±67 ^a | 171±141 | 164±99 | 134±54 | 114±47 |
| | Control | 114±43 | 120±56 | 168±62 | 129±55 | 137±27 |
| ALT (U/L) | Experimental | 23.3±7.6 | 11.5±5.9 | 31.5±23.8 | 19.0±9.0 | 18.8±5.6 |
| | Control | 13.8±2.2 | 24.3±27.3 | 21.0±10.1 | 16.8±14.4 | 21.8±19.0 |
| T-BIL (mg/dL) | Experimental | 0.28±0.35 | 0.15±0.17 | 0.15±0.10 | 0.13±0.06 | 0.10±0.04 |
| | Control | 0.1±0.01 | 0.1±0.08 | 0.12±0.05 | 0.11±0.03 | 0.13±0.02 |
| BUN (mg/dL) | Experimental | 10.5±1.0 | 9.8±2.9 | 13.5±1.7 | 13.8±3.6 | 13.8±3.6 |
| | Control | 16.0±1.8 | 10.5±4.8 | 16.0±2.7 | 12.0±2.2 | 12.3±3.5 |
| CREA (mg/dL) | Experimental | 0.35±0.17 | 0.38±0.17 | 0.43±0.05 | 0.43±0.09 | 0.50±0 |
| | Control | 0.75±0.57 | 0.43±0.26 | 0.55±0.13 | 0.5±0.14 | 0.50±0.11 |
| TP (g/dL) | Experimental | 4.5±0.3 | 4.8±1.2 | 4.9±0.7 | 4.4±0.7 | 4.2±0.7 |
| | Control | 4.1±0.6 | 4.6±0.3 | 4.9±0.4 | 3.9±1.2 | 4.0±1.1 |
| ALB (g/dL) | Experimental | 2.2±0.17 | 2.3±0.33 | 2.8±0.29 | 2.7±0.62 | 2.3±0.36 |
| | Control | 2.1±0.34 | 2.6±0.47 | 3.0±0.30 | 2.4±0.88 | 2.1±0.50 |

^a: Mean ± SD

4. PCR 검사

PCR 공통 primer로 양성을 보이는 개체(Figure 5)는 *B. gibsoni*와 *Hepatozoon canis*을 감별할 수 없기에 특이 제한효소를 통한 PCR-RFLP 검사에서 모두가 *B. gibsoni*의 단독감염을 확인하였다(Figure 6). 이후 치료 3일, 10일, 20일과 30일째에 PCR로 치료경과 및 감염 상태를 확인하였다. 치료 10일째 되는 날의 실험견의 PCR 결과에서, 실험군에서는 *B. gibsoni*가 PCR상에 확인되지 않았으며, 대조군의 6번과 8번 개체에서 여전히 감염이 되어있는 모습을 확인할 수 있다(Figure 7). 치료 20일째의 PCR 결과상에서도 실험군에서는 *B. gibsoni*가 확인되지 않으며, 대조군에서는 5번과 7번 개체에서 *B. gibsoni*가 감염되어 있는 모습을 확인할 수 있었다. 또한 치료 30일째의 PCR 결과상에서 여전히 실험군에서는 *B. gibsoni*가 확인되지 않았으며, 대조군의 7번 개체에서만 *B. gibsoni*가 감염되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7).

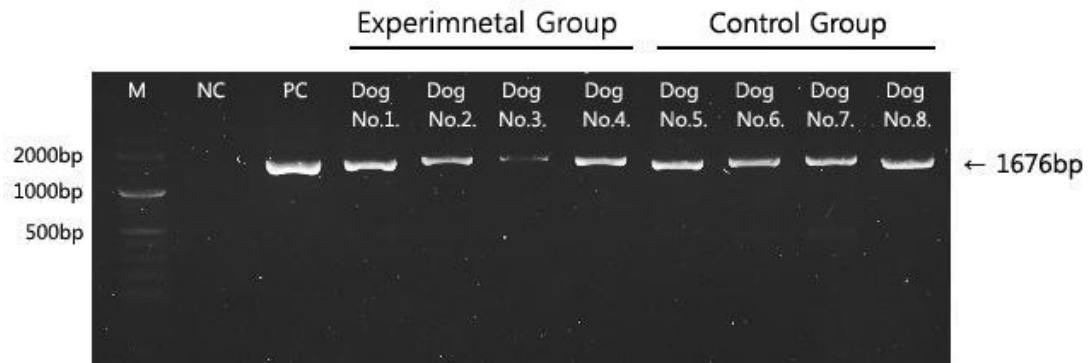


Figure 5. PCR (Day 0) ; Representative electrophoretic agarose gel showing the results of single PCR assay for detection of *B. gibsoni* and *H. canis* 18s rRNA gene; All the dogs were infected with *B. gibsoni* or *H. canis* (M): 100 bp ladder, (NC): negative water control (PC): positive control sample.

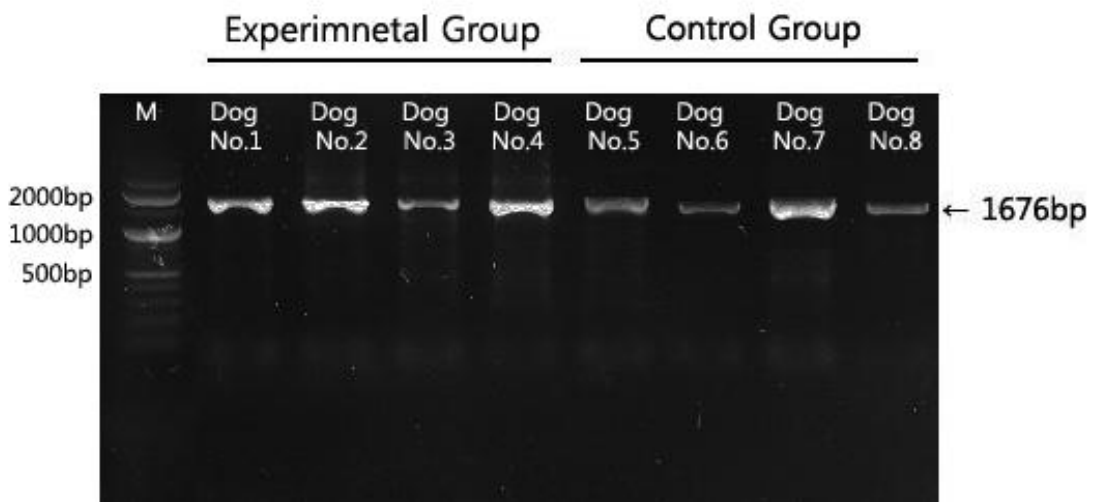


Figure 6. PCR-RFLP (Day 0); *Pst*I digest PCR-RFLP banding patterns using 1.8% agarose gel; All the dogs were infected with *B. gibsoni* only.

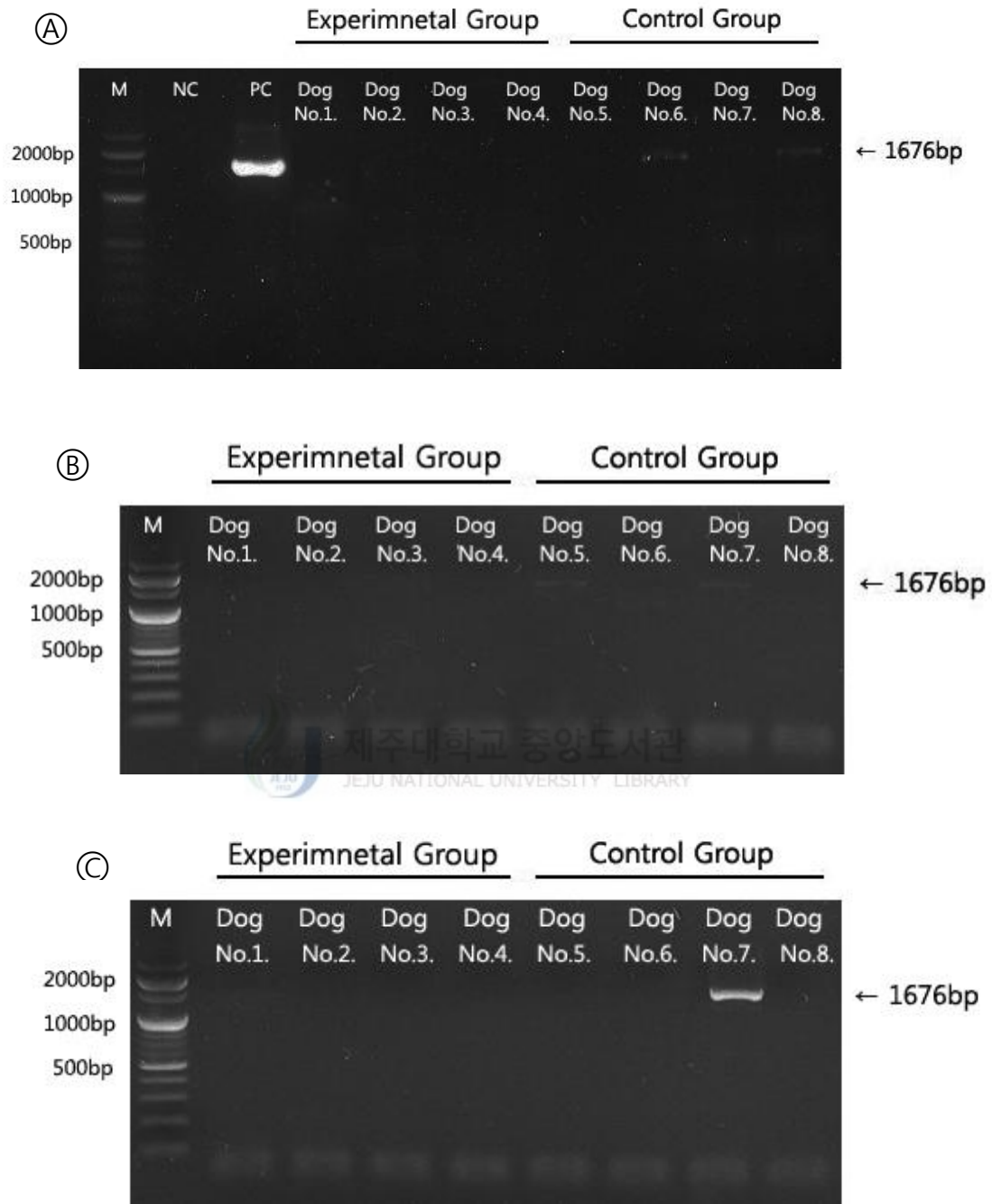


Figure 7. Electrophoresis analysis of DNAs amplified by PCR.

(A) (Day 10); dog 6, dog 8 infected with *B. gibsoni*.

(B) (Day 20); dog 5, dog 7 infected with *B. gibsoni*.

(C) (Day 30); dog 7 infected with *B. gibsoni*.

IV. 고 찰

최근 지구 온난화와 더불어 진드기 발생의 확산과 이에 따른 진드기 매개 질병인 바베시아의 감염이 증가하고 있는 추세이다[27]. 우리나라에서는 제주도에 서의 발병이 두드러지지만, 최근에는 한강 이북 지역까지 바베시아가 보고되는 등 발생 지역이 광범위해지고 있다[15, 24]. 현재 우리나라를 비롯한 아시아 전역에는 작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis*)와 가시들피참진드기(*Haemaphysalis bispinosa*)가 매개하는 *B. gibsoni*가 발생되고 있다[13]. 이러한 이유로 세계적으로 *B. gibsoni*에 대한 다양한 연구가 진행되고, atovaquone의 단독 치료[1, 14, 19, 21], atovaquone과 azithromycin 합제[2, 26], 그리고 atovaquone과 proguanil의 합제 등 다양한 치료 방법에 대한 연구가 진행되고 있다[9, 10, 17, 22, 28]. 위 약물들은 모두 초기 바베시아에 특히 효과가 있는 것으로 보고 되었으며, 내성 발현의 문제로 인하여 이를 보완하기 위한 합제가 추천되고 있다. 특히 atovaquone과 proguanil의 합제인 Malarone® (GlaxoSmithKline, U.K)은 뛰어난 항원충작용과 적은 부작용을 가지고 있으며, 사람의 말라리아 예방 및 치료를 위해 사용되고 있는 약물이다. Atovaquone은 미토콘드리아 내의 에너지 생성 과정을 중단시켜 항원충 작용을 하며, 이 약의 내성방지와 효과상승을 위해 배합되는 proguanil은 원충의 단백질합성에 작용하는 엽산 작용을 억제하여 항원충 작용을 한다고 보고되어 있다[25, 29]. 현재 atovaquone/proguanil 합제가 M121I의 발현을 억제하는 기전은 연구되지 않았으나, 초기 *B. gibsoni* 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다[9, 10]. 또한

macrolide계 항생제인 azithromycin 호흡기 질환을 포함한 세균감염에 널리 사용되고 있으며, 안전역이 넓은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 세 가지 성분의 두 가지 약제의 합제에 대한 바베시아 치료 효과를 알아보기 위해서 기존 diminazene aceturate와 비교하여 효과를 검증해보고자 하였다.

*B. gibsoni*에 자연 감염된 8마리의 개를 각각 4마리씩 atovaquone/proguanil 합제와 azithromycin을 병용 투여하는 실험군과 diminazene aceturate를 주 치료제로 하는 대조군, 두 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였는데, 8마리의 개들 중 6마리는 한 어미에게서 태어나 모두 같은 장소에서 사육된 개체로써 실험동물의 다양성과 환경에 따른 실험 결과의 변화를 최소화할 수 있었다. 두 군 모두 수혈 및 보조제의 처치는 하지 않았다. 혈액검사, 혈청검사, Giemsa 염색을 통한 혈액 도말 검사, PCR 및 PCR-RFLP 를 실시하였으며, *B. gibsoni*에 감염된 개에게서 총 30일간 실험을 진행하였다,

대조군의 치료 프로토콜은 기존의 *B. gibsoni*에 대한 diminazene aceturate 치료 방법에 따라 적용하였다[17]. Diminazene aceturate의 치료 효과 및 부작용에 대해서는 과거 많은 연구를 통해 확인되었으며, 치료 효과의 상승과 높은 재발률의 보완을 위해 항원충작용을 가지고 있는 것으로 알려진 tetracycline과 clindamycin을 보조적으로 치료하였다. Clindamycin은 과거부터 면역력을 강화시키는 항생제로 알려져 있으며, 항원충제로써 *B. gibsoni*를 비활성화시키는 효과가 보고되었다[32]. 또한 실험군의 치료에 관한 용량 및 용법은 atovaquone과 azithromycin, 그리고 proguanil 합제에 관한 기존의 연구를 토대로 치료하였으며, 실험군에서는 atovaquone이 치료의 주된 역할을 하며, proguanil과 azithromycin은 내성을 억제하고 치료 효과를 상승시키는 데 도움을 주는 것으로 보고되었다[9].

치료의 시작과 함께 실험군과 대조군 모두 임상증상과 혈액학적 수치가 개선되었다. 실험군 모두 치료 과정에서 특이한 부작용 및 거부반응은 나타나지 않았다. 실험군에서 심한 빈혈과 혈소판 감소증을 나타냈던 3번과 4번 개체는 치료 3일 후 HCT의 상승과 혈소판 감소가 개선되었고, 빈혈이 다소 심하지 않던 1번과 2번 개체도 치료 후 HCT와 혈소판이 정상범위로 상승되었으며, 다소 불규칙한 혈소판 수를 나타내었다.

대조군에서도 마찬가지로 4마리의 개체에서 빈혈 및 혈소판 수가 개선되었으나, 대조군의 7번 개체에서는 치료 20일 이후 HCT와 혈소판이 다시 감소되는 경향을 나타낸 것으로 치료 효과가 불충분하거나, 치료 종료 후 재발의 가능성을 의심해 볼 수 있다. 8마리 모두 실험이 진행되는 30일 동안 혈청학적 검사 결과는 정상 범위를 벗어나지 않았으며, 유의적인 변화와 간 독성, 신장기능 이상 등의 다른 부작용은 관찰되지 않았다.

PCR 결과 상에서 실험군은 치료 3일 이후 *B. gibsoni*가 확인되지 않았으며, 치료 종료 20일 후에도 음성으로 나타났다. 이는 Matsuu 등(2004)의 atovaquone 단독치료, Jefferies 등(2007)의 atovaquone과 azithromycin 병용 치료, 그리고 Iguchi 등(2013)의 atovaquone/proguanil 합제 치료 등의 결과와 비교하여 바베시아 치료에 보다 빠른 효과를 보였으며, 치료 20일 이후에도 재발의 모습이 없는 것으로 보아 더욱 안정적인 치료 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

이는 atovaquone의 babesiacidal 효과, proguanil의 보조적인 항원충 효과, 그리고 azithromycin의 내성발현 억제 효과가 세 가지 약물의 병용 투여로 더욱 효과적으로 작용한 것으로 판단된다.

대조군은 치료 3일 이후 임상증상 및 혈액검사 상에서 개선의 모습이 보였으

나, PCR 결과에서 실험 10일 후 6번과 8번 2개체, 20일 후 5번과 7번 2개체, 30일 후 7번 1개체에서 아직 *B. gibsoni*가 확인되는 모습을 나타내었다. 이러한 이유는 14일간의 치료가 불충분했거나, 체내 약물 발현이 지연되었을 것으로 생각된다. 특히 대조군의 7번 개체는 동일한 치료과정 중에 20일 이후부터 PCR 검사상에 *B. gibsoni*가 확인되는 것으로 보아 diminazene aceturate에 대한 내성의 발현 혹은 재발을 추측해 볼 수 있다. 이는 Wickramasekara 등(2012)의 연구에서 보고된 바와 같이 유전자의 변이에 따른 diminazene aceturate에 대한 내성의 발현으로 판단되며, Lin 등(2010)의 연구에서 제시된 것처럼 재발과 내성의 발현에 따른 후속 조치로 doxycycline과 metronidazole과 같은 항생제의 3개월 이상의 긴 처치가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구의 결과를 통해서 atovaquone/proguanil 합제와 azithromycin의 병용투여에 따른 *B. gibsoni* 치료에 대해서 확실하고 안정적인 효과를 확인할 수 있었으며, diminazene aceturate 치료와 비교하여 바베시아 감염의 초기 치료에 보다 빠른 효과가 있는 것을 확인하였다. 정확한 치료기전과 각 약물의 치료 효과를 알아보기 위하여 추후 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다. 그리고 치료 과정을 정확히 파악하기 위해서는 재감염과 재발을 구분할 수 있어야 하고, *B. gibsoni* 총체를 정량 검사할 수 있는 검사(RT-PCR)를 병행한다면 좀 더 정확하게 치료효과를 정량화할 수 있었을 것으로 사료된다.

V. 결 론

*Babesia gibsoni*에 자연 감염된 총 8마리의 개들 중 atovaquone/proguanil 합제와 azithromycin을 병용 투여한 4개체의 실험군과 diminazene aceturate와 tetracycline, clindamycin을 병용 투여한 4개체의 대조군에서 치료 효과를 비교할 결과는 다음과 같다.

1. 임상증상, 혈액검사, 그리고 Giemsa 염색 도말 검사 결과 실험군 4개체에서 치료 3일 후부터 빈혈과 혈소판 감소증 개선 및 총체 감소가 나타났으며, 이 후 실험기간 동안 재발되지 않았다. 대조군에서도 치료 시작 이 후 총체감소, 빈혈, 혈소판 감소가 개선되었으나, 치료 20일 이 후 다시 4개체 중 1개체에서 HCT 및 혈소판 수가 감소되었다.

2. PCR 검사에서 실험군은 치료 시작 후 *B. gibsoni*가 나타나지 않았고, 이 후 실험기간 동안 재감염은 확인되지 않았다. 대조군은 치료 10일 후 2개체, 20일 후 2개체 그리고 30일 후 1개체에서 *B. gibsoni*가 확인되었다.

이상의 결과로 diminazene aceturate를 대신하여 atovaquone/proguanil 합제와 azithromycin의 병용 투여 치료가 *B. gibsoni* 감염견에서 효과적인 치료방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1163–1173.
2. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (asian genotype) infections in dogs. *J Vet Intern Med* 2004; 18:494–498.
3. Conrad P, Thomford J, Tamane I, Whiting J, Bosma L, Uno T, Holshuh HJ, Shelly S. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199:601–605.
4. Farwell GE, LeGrand EK, Cobb CC. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infection in dogs. *J AM Vet Med Assoc* 1982; 180:507–511.
5. Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Vet Med Sci* 2001; 63:977–981.
6. Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Fetal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol* 2005; 35:1031–1035.
7. Groves MG, Dennis GL. *Babesia gibsoni*; field and laboratory studies of canine infections. *Exp Parasitol* 1972; 31:153–159.
8. Hwang MJ, Lee HS, Lee KW, Hematological and serum chemical findings following repeated medication of diminazene aceturate in canine babesiosis. *Korean J Vet Clin Med* 2000; 17:349–358.
9. Iguchi A, Matsuu A, Fujii Y, Ikadai H, Hikasa Y. The in vitro interactions and in vivo efficacy of atovaquone and proguanil against *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vet Parasitol* 2013; 197:527–533.

10. Iguchi A, Shiranaga N, Matsuu A, Hikasa Y. Efficacy of Malarone(®) in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci* 2014; 76:1291–1295.
11. Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K, Onishi T, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet Parasitol* 2004; 121:341–346.
12. Jefferies R, Ryan UM, Jardine J, Robertson ID, Irwin PJ. *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Exp Parasitol* 2007; 117:115–123.
13. Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer AJ, Cummings J, Boudreaux MK, Sockham SL, Irizarry–Rovira A, Conrad PA. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *Int J Parasitol* 2000; 30:1501–1505.
14. Korsinczky M, Chen N, Kotecha B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug–binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2100–2108.
15. Lee MJ, Yu DH, Yoon JS, Li YH, Lee JH, Chae JS, Park j., Epidemiologic and clinical surveys in dogs infected with *Babesia gibsoni* in South Korea , *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009,
16. Lee KW, Jang IH, Song JC, Yi SJ. Changes of blood chemical values on dogs infected with *Babesia gibsoni*. *Korean J Vet Clin Med* 1998; 15: 219–221.
17. Lin EC, Chueh LL, Lin CN, Hsieh LE, Su BL. The therapeutic efficacy of two antibabesial strategies against *Babesia gibsoni*. *Vet Parasitol* 2012; 186:159–164.
18. Lin MY, Huang HP. Use of a doxycycline–enrofloxacin–metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. *Acta Vet Scand* 2010; 52:27.
19. Matsuu A, Koshida Y, Kawahara M, Inoue K, Ikadai H, Hikasa Y, Okano S,

- Hifuchi S. Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* in vivo and in vitro. *Vet Parasitol* 2004; 124:9–18.
20. Matsuu A, Ono S, Ikadai H, Uchide T, Imamura S, Onuma M, Okano S, Hifuchi S. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 569–573.
21. 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.
22. 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.
23. Miller DB, Swan GM, Lobetti RG, Jacobson LS. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. *J S Afr Vet Assoc* 2005; 76:146–150.
24. Oh ST, Woo HC. Prevalence of *Babesia spp.* in dogs of Seogwipo-si, Jeju-do, South Korea. *Korean J Vet Serv* 2009; 67:467–471.
25. Pudney M, Gutteridge W, Zeman A, Dickins M, Wolley JL. Atovaquone and proguanil hydrochloride: a review of nonclinical studies. *J Travel Med* 1999; 6 suppl 1:S8–S12.
26. 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.
27. Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol* 2011; 181:48–60.
28. Srivastava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1334–

1339.

29. Suzuki K, Wakabayashi H, Takahashi M, Fukushima K, Yabuki A, Endo, Y. A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. J Vet Med Sci 2007; 69:563–568.
30. Vaidya AB, Mather MW. Atovaquone resistance in malaria parasites. Drug Resist Updat 2000; 3:283–287.
31. Wickramasekara Rajapakshage BK, Yamasaki M, Hwang SJ, Sasaki N, Murakami M, Tamura Y, Lim SY, Nakamura K, Ohta H, Takiguchi M. Involvement of mitochondrial genes of *Babesia gibsoni* in resistance to diminazene aceturate. J Vet Med Sci 2012; 74:1139–1148.
32. Wulansari R, Wijaya A, Ano H, Horii Y, Nasu T, Yamane S, Makimura S. Clindamycin in the treatment of *Babesia gibsoni* infections in dogs. J Am Anim Hosp Assoc 2003; 39: 558–562.

