



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

개 혈액시료에서 바베시아 진단을 위한
간이 항체진단 키트와 실시간 qPCR의 평가

제주대학교 대학원

수의학과

양용성

2019년 2월

개 혈액시료에서 바베시아 진단을 위한 간이 항체진단 키트와 실시간 qPCR의 평가




지도교수 윤 영 민

양 용 성

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2018년 12월

양용성의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>이 경갑</u>	
위 원	<u>손 원근</u>	
위 원	<u>윤 영민</u>	

제주대학교 대학원

2018년 12월

Abstract

Evaluation of simple babesia antibody test kit and real-time quick PCR for detection of *babesia gibsoni* in canine blood samples

YongSung Yang

(Supervised by Prof. YoungMin Yun)

College of Veterinary Medicine, Graduate School,
Jeju National University, Jeju, South Korea

Babesia is a protozoal disease caused by ticks in cattle, sheep, pigs, horses, dogs and humans. Canine babesiosis is caused by *Babesia gibsoni*, *B. canis* supsp., *B. microti*, *B. equi*, *B. conradae* and *B. vitalii*. Canine babesiosis is morphologically divided into small and large babesia. *B. gibsoni* which is small babesia and mediated by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis bispinosa*, occurs mainly in South Korea and throughout Asia. *B. gibsoni* is generally infected by the mites bite and are also infected by transfusions from infected dogs and through placental infection. In recent years, outbreak of babesiosis is increasing in all country of South Korea as well as Jeju Island. In this study, I have surveyed the prevalence of canine babesiosis in Jeju, and estimated the sensitivity and specificity of canine one step babesia antibody kit based on the PCR results and also verified the utility of qPCR in local clinics.

From May 2018 to November 2018, 211 dogs were tested by CBC, canine babesia Ab kit(Bionote, Inc, Korea), CRP, PCR and qPCR. Canine babesia Ab kit showed 74 dogs were positive and 137 dogs were negative. In PCR test, 99 dogs of them were positive (46.9%). In the results of canine babesia Ab kit based on the PCR, the sensitivity and specificity of babesia are 62.6% and 89.3%, respectively. The results of qPCR were the same as those of general PCR.

This study have shown that PCR and CRP test be performed at the beginning of Barbecia infection and PCR and babesia antibody test kit at the time of infection showing clinical symptoms. Since the antibody is persistent in the absence of the antigen after the treatment, the antibody test kit should be carefully considered after treatment. And easy, fast and accurate qPCR can be useful method for diagnosis and prognosis of babesiosis in clinics.

Key words : *Babesia gibsoni*, Canine babesia Ab kit, PCR, qPCR, Dog

목 차

영 문 초 록

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법		3
III. 결	과	10
IV. 고	찰	15
V. 결	론	19
VI. 참 고 문 헌		20

I. 서 론

바베시아증(Babesiosis)은 진드기매개에 의한 주혈 원충성 질병으로, 숙주는 설치류, 사람, 개, 고양이, 말과 소 등 이다. 개 바베시아는 혈액도말 김자(Giemsa) 염색상에서 적혈구내 원충의 형태에 따라 대형과 소형으로 나눌 수 있는데, *Babesia gibsoni*, *B. conrada*, *B. microti*, *B. annae*, *Theileria annae*는 소형, *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. coco*는 대형에 속한다[1, 3, 4, 9, 11, 27]. 일반적으로 *B. gibsoni*의 병원성이 *B. canis*보다 심하다[5]. 우리나라를 비롯한 아시아 지역은 대부분 소형인 *B. gibsoni* 감염이 주로 발병하고[17,18], *Haemaphysalis longicornis*와 *H. bispinosa* 진드기 흡혈[5, 6], 감염견으로부터 수혈[7] 또는 모체 태반을 통해서 감염되는 것으로 보고되어 있다[8].

개 바베시아증의 주된 임상증상은 용혈성 빈혈에 따른 점막창백, 혈색소뇨, 빈맥, 빈호흡, 발열, 식욕저하, 침울, 황달, 비장종대, 림프절 종대, 혈소판감소 등이 다[12, 13, 14, 19]. 만성 혹은 저감염된 경우 무증상으로 진행되나, 스트레스나 부신피질호르몬제 투여와 같은 면역억제 상황에서 다시 증상을 발현될 수 있다[14, 15]. 개 바베시아증과 유사증상을 보이는 질병에는 면역매개성용혈성빈혈(immune mediated hemolytic anemia; IMHA), 면역매개성혈소판감소증(immune mediated thrombocytopenia; IMT), 아연중독(zinc toxicity), 리케치아성 질병(rickettsial diseases), 바토넬라증(bartonellosis), 렙토스피라증(leptospirosis), 중증의 심장사상충 감염증(caval syndrome), 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosus; SLE), 종양 및 출혈 등이 있고 이들과 감별진단 해야 한다[16].

바베시아증의 진단은 유행 지역으로 여행, 진드기가 많은 지역에 노출, 감염견의 혈액 수혈 등의 병력 청취와 혈액을 통한 실험실적인 검사법인 김자염색, 간접면역형광 항체를 이용한 혈청학적 평가(IFAT) [20], 바베시아 항체 검사[29,

30], 급성기반응단백질(C reactive protein; CRP)의 변화[28] 및 분자생물학적 진단인 PCR(polymerase chain reaction) 검사법[21, 27] 등이 있다.

B. gisoni 감염의 일반적인 치료는 diminazene aceturate (Berenil[®])가 널리 사용되고 있으며, 근육주사 부위의 괴사[1], 소뇌 출혈에 의한 신경증상, 발작 및 간독성 등의 부작용[23]과 약물에 대한 내성의 발현 및 높은 재발률 등의 문제점이 보고되고 있다[10]. 이외 항원충 효과를 가지는 clindamycin, tetracycline과 doxycycline 그리고 metronidazole 등이 치료에 사용되나, 2~3개월 이상의 긴 투약기간과 재발의 위험성 그리고 수혈과 같은 보조적인 치료가 필요하다[9, 22, 24, 25, 26].

본 연구는 2018년 5월과 11월 사이 제주도내 동물병원에 내원하는 환자를 대상으로 혈액검사, 혈액도말검사, 급성기반응단백질(C reactive protein; CRP), 새로 개발된 바베시아 항체진단 키트, PCR 검사 및 실시간 고속(real-time quick) PCR을 실시하였다. PCR 검사를 근거로 바베시아 항체진단 키트의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)를 평가하였고, 보다 쉽고 빠르고 정확하게 실시간 진단법인 qPCR의 효용성을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 군분류

2018년 5월부터 11월사이 제주시와 서귀포시 동물병원에 내원한 빈혈 및 빈혈증상으로 내원한 개 211마리를 대상으로 하였다. 혈액은 경정맥 또는 요측 피정맥에서 2 ml씩 채취하였으며, 채취된 혈액은 완전혈구계산(CBC)을 위해 0.5 ml 및 바베시아 유전자(PCR) 검사를 위해서 EDTA 항응고 튜브에 0.5 ml, 급성기반응단백질(CRP) 측정을 위해서 헤파린 튜브에 1 ml씩 분주하였다. 완전혈구계산(CBC)과 혈액도말은 채혈후 바로 그리고 CRP와 PCR 검사는 실험전까지 냉장 보관하였다. 실험동물 선정 및 실험방법은 제주대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인받아 진행하였다(승인번호 2018-0041). 군분류는 혈액에서 DNA를 추출 PCR하여 바베시아 양성인 군을 A 군, 새로 개발된 바베시아 항체 키트 검사와 PCR 검사 모두 양성을 B 군, PCR 음성이면서 항체 진단키트 양성을 C 군 그리고 항체키트와 PCR 검사 모두 음성을 D 군으로 하여 비교분석하였다.

2. 혈액검사

EDTA 처리한 혈액으로 ADVIA 2120i (SIEMENS)을 이용하여 완전혈구계산(complete blood cell count, CBC)을 실시하였다. CBC 검사에서 빈혈 지표인 RBC (red blood cell), Hb (hemoglobin), Hct (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) 감염 지표인 WBC (white blood cell) 그리고 혈소판(Platelet) 수를 검사하였다.

3. 혈액도말검사

적혈구내 바베시아 충체를 확인하기 위해서, 채혈 직후 슬라이드에 도말하고 메탄올로 고정하였다. 김자용액(Giemsa staining sol, Sigma-Aldrich)과 증류수(DW)를 1:9 비율로 희석하여 메탄올 고정한 슬라이드위에 희석액을 점적하여

1시간 동안 염색하였다. 염색된 혈액도말 표본은 흐르는 물에 수세하여 건조한 후 광학현미경(Olympus Optical Co. Tokyo, Japan)을 이용하여 적혈구내 바베시아 충체를 확인하였다.

4. 혈액 단백 및 항체 키트검사

급성기반응 단백질(CRP)은 Vcheck canine CRP 2.0 kit (BioNote, Inc, Korea)을 사용하여 혈중 농도를 측정하였다. 혈청 5 μ l을 검사용 희석액(4 ml)에 넣고 키트에 포함된 스포이드내 시약이 녹을 때까지 피펫팅하였다. 흡광도 측정장비(BIONOTE Vcheck analyzer)에 CRP 카트리지를 넣고 셋팅한 후에 혈청과 시약을 반응한 용액 100 μ l을 카트리지 위에 점적하고 흡광도를 5분후 읽어 농도를 측정하였다.

바베시아 혈중 항체는 One step canine babesia antibody test kit (BioNote, Inc, Korea)를 사용하여 혈중 바베시아 항체 유무로 감염을 평가하였다. 검사전 키트와 완충액을 실온에 방치하고 검사 카트리지를 평평하고 건조한 테이블 위에 놓고, 시료 홀에 전혈 10 μ l을 점적하고 흡수를 확인한 후 희석 완충액 3방울을 떨어뜨리고 1분후 대조선(C)과 검사선(T)의 밴드를 확인하였다. 결과는 최대 15분 이내에 판독하였다. 심장사상충(HW), 에를리히아(Ehrlichia), 라임병(Lyme disease; Borellia)과 아나플라즈마(Anaplasma) 감염을 배제하기 위해서 CaniV-4 kit (BioNote, Inc, Korea)를 사용하여 평가하였다(Figure 1).



Figure 1. (A) Cartridge for Canine Babesia antibody detection, (B) Cartridge for Heartworm antigen, *Ehrlichia canis* antibody, Lyme(Borellia) antibody and Anaplasma antibody detection (BioNote, Inc, Korea).

5. DNA 추출

EDTA 처리한 혈액(총 211마리)을 G-DEX™ II b Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 전혈 300 μ l를 1.5 ml 튜브에 넣고 적혈구 용혈 용액(RBC lysis solution) 900 μ l를 넣고 혼합(vortexing)한 후 실온에 5분간 방치한 다음, 10,000 g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 다시 200 μ l의 적혈구 용혈용액을 넣고 혼합한 후 다시 원심분리한 다음 상층액을 버리고 재부유시켰다. 세포막 용해용액(Cell lysis solution)을 300 μ l를 넣고 잘 혼합하고 실온에서 15분간 방치하였다. 이 후 단백침전용액(protein precipitant buffer; PPT)을 100 μ l 넣고 잘 혼합(vortexing)하여 단백질이 침전되는 것을 확인하였다. 침전이 생기면 10,000 g로 1분간 원심분리하였다. 상층액 300 μ l를 새로운 튜브(1.5 ml)에 넣고 동일량(300 μ l)의 냉장보관된 100% isopropanol (2-propanol)을 넣고 잘 흔들어 DNA가 침전되는 것을 확인하고 13,000 g로 1분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 70% 에탄올을 넣고 다시 13,000 g로 1분간 원심분리하였다. 다시 상층액은 조심해서 버리고 흰색의 침전된 DNA pellet이 반투명해질 때(10-15분)까지 말린 후 DNA 재수화 완충액(rehydration buffer)을 100 μ l 넣어 DNA가 충분히 녹도록 4°C에서 보관하였다. 추출 완료된 DNA는 분광광도계(NanoVu, GE healthcare bioscience, USA)를 이용하여 최종 농도가 100 ng/ μ l가 되도록 조정하였고, PCR에 사용하기전까지 냉동보관하였다.

6. PCR

Babesia spp. 18s rRNA 유전자를 증폭하기 위해 Birkenheue[9]와 Oh[17]가 보고한 primer (Table 1)를 이용하여 PCR (Table 2)을 수행하였다. PCR은 C-Babe 18s rRNA Forward primer 10 pmole, Reverse primer 10 pmole, 2x *AccuPower* PCR Master Mix with Dye (Bioneer Inc, Korea), DNA (100 ng/ μ l)를 포함한 20 μ l 반응액으로 Bio-Rad사의 thermal cycler (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD, USA) 장비를 사용하여 실시하였다. 도입단계는 94°C 5분, 그리고 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 37회 반복

한 후 마지막 72°C에서 5분으로 증폭하였다. PCR 산물은 100 bp DNA ladder marker (Enzynomics, Korea)와 함께 1.5% agarose gel (Red safe 염색)에 전기영동하여 확인하였다. 공통 primer를 이용한 *Babesia spp.*의 증폭 크기는 1,676 bp, *Hepatozoon canis*의 증폭 크기는 1,761 bp이다.

Table 1. Oligonucleotides for the analysis of *Babesia gibsoni* and *Hepatozoon canis* (18s rRNA and Heat shock protein)

Primer	Sequences (5'→3')	Size (bp)	T _m
CBabe-18sF	5'-GTT GAT CCT GCC AGT AGT-3'	1,676	60°C
CBabe-18sR	5'-AAC CTT GTT ACG ACT TCT C-3'	1,761	
Bg_Hsp70_F	5'-AAA TCA TCC CCA ATG ACC AGG-3'	147	58°C
Bg_Hsp70_R	5'-CCT TCC AAT CAA CCT CTT GGC-3'		
HepC_F	5'-CGC AAA GTG AAA ACA GGC GA-3'	199	58°C
HepC_R	5'-ACC TCT CTC AAA CTG TTA GAA TTG GG-3'		

Table 2. PCR reaction conditions for detection of *Babesia gibsoni* 18s rRNA gene

Primer set	°C	Time	Cycle
	94	5 min	37
	94	30 sec	
CBabe-18s	60	30 sec	
	72	30 sec	
	72	7 min	

7. Quick PCR

Quick PCR은 *Babesia Heat Shock Protein* (Hsp) Forward primer 10 pmole, Reverse primer 10 pmole, 2x Rapid RT–Master Mix, DNA (10 ng/ μ l)를 포함한 10 μ l 반응액으로 quick PCR (Thermal Cycler, Genesystem, Korea) 장비를 사용하여 실시하였다(Figure 2)(Table 3). qPCR 도입단계는 98 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 98 $^{\circ}$ C 3초, 60 $^{\circ}$ C 8초, 72 $^{\circ}$ C 3초를 40회 반복하여 실시간 유전자 증폭을 실시하였다(Table 4).

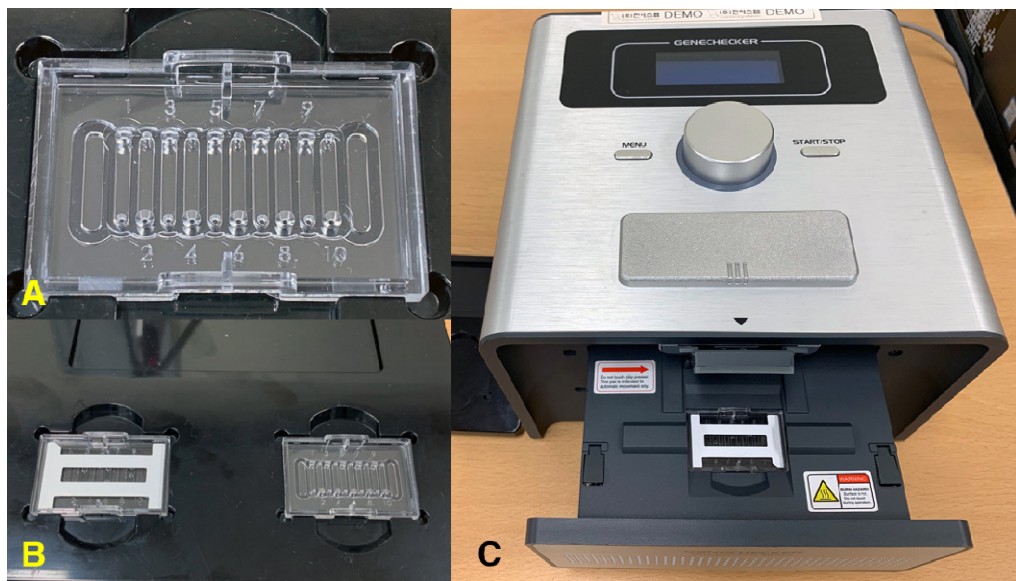


Figure 2. Real-time quick PCR chip (A), frame for filling PCR reagents in chip (B) and qPCR device (C)

Table 3. Quick PCR components for detection of *Babesia gibsoni* heat shock protein and *Hepatozoon canis* 18s rRNA gene

Components	μ l
DNA (10ng)	2
2x Rapid RT–Master Mix	5
10nM forward+reverse primer	2
Adjust to DEPC DW	1
Total volume	10 μ l

Table 4. Quick PCR reaction conditions for detection of *Babesia gibsoni* heat shock protein and *Hepatozoon canis* 18s rRNA gene

Primer set		℃	Time	Cycle
Bg_Hsp70 HepC	Initial denaturation	98	30 sec	1
	Denaturation	98	3 sec	40
	Annealing	60	8 sec	
	Extension	72	3 sec	
	Melting Temp	65–95		
	Running time	20 min 45 sec		

8. 바베시아 항체진단 키트의 민감도와 특이도 평가

각 혈액에서 추출한 DNA의 PCR 검사에서 바베시아 양성인면서 항체키트 양성을 진양성(true positive; TP), PCR 양성인면서 항체키트 음성을 가음성(false negative; FN)으로 하였다. 그리고 PCR 음성인면서 항체키트 음성을 진음성(true negative; TN), PCR 음성인면서 항체키트 양성을 가양성(false positive; FP)로 하여 새로 개발된 개 바베시아 항체 진단키트의 민감도와 특이도를 계산하였다. 항체키트의 양성 예측수치(positive predictive value)는 항체키트 양성으로 확인된 시료에 대해서 PCR 양성(TP)과 음성(FP)으로 계산하였고, 항체키트 음성 예측수치(negative predictive value)는 항체키트 음성으로 확인된 시료에 대해서 PCR 양성(FN)과 음성(TN)으로 계산하였다(Figure 3).

9. 통계분석

혈액검사에서 자료는 SPSS 통계프로그램(ver 22, SPSS Inc. IBM Corp, Chicago, USA)을 이용하여 ANOVA 분석하여 각 군간 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

	PCR Positive	PCR Negative	
Ab kit Positive	TP	FP	Positive predictive value = (TPx100)/(TP+FP)
Ab kit Negative	FN	TN	Negative predictive value = (TNx100)/(FN+TN)
	Sensitivity (%) = (TPx100)/(TP+FN)	Specificity (%) = (TNx100)/(FP+TN)	

Figure 3. Sensitivity and Specificity of Canine Babesia antibody test kit based on PCR results. TP; true positive, FP; false positive, FN; false negative, TN; true negative

Ⅲ. 결 과

1. 일반 혈액검사

제주도내 동물병원에 내원한 빈혈 및 비빈혈 환자의 혈액에서 DNA를 추출하여 PCR하여 양성인 군만을 A 군, 새로 개발된 바베시아 항체키트 검사와 PCR 검사 모두 양성인 B 군, PCR 음성이면서 항체 진단키트 양성인 C 군 그리고 항체키트와 PCR 검사 모두 음성인 D 군에서 빈혈과 관련되는 적혈구 지수(RBC index)와 감염과 관련된 백혈구의 변화를 비교하였다.

PCR만 양성인 A군에서 적혈구 지수는 정상 범위내에 있었으나, B군에서 모두 (RBC, Hct, Hb) 감소하였고 MCV는 증가하였다. C군은 B군에 비해 다소 증가하는 형태를 보였으며, 바베시아 음성의 경우 모두 정상 범위에 있었다. 혈소판 수치도 B군이 A군과 C군에 비해 낮은 수준을 보였다. 백혈구 변화에서 A군은 증가 소견을 보였으며, B군과 C군은 감소 소견을 나타내었다. 비빈혈 D군은 감염을 의심하는 증가소견을 나타내었다(Table 5).

Table 5. The CBC of dogs in each group

	A(n=37)	B(n=62)	C(n=12)	D(n=100)	Reference
RBC($10^6/\mu\ell$)	6.37 ± 1.49^A	4.61 ± 2.06^a	5.77 ± 2.13^A	6.58 ± 1.39^A	5.7~8.8
Hct(%)	40.7 ± 8.11^A	29.8 ± 12.58^a	36.7 ± 10.31^A	42.3 ± 7.97^A	37.1~57.0
Hb(g/dl)	12.6 ± 2.60^A	9.1 ± 3.99^a	10.9 ± 4.47^a	13.0 ± 2.61^A	12.9~18.4
MCV(fL)	65.0 ± 6.47	68.3 ± 7.86	67.3 ± 12.11	65.3 ± 6.66	58.8~71.2
MCHC(g/dl)	30.8 ± 2.14	30.1 ± 2.61	28.9 ± 8.64	30.8 ± 2.25	31.0~36.2
PLT($/\mu\ell$)	250.4 ± 104.84^A	133.4 ± 75.23^a	237.4 ± 116.07^A	286.9 ± 121.01^A	143~400
WBC($\times 10^3/\mu\ell$)	21.0 ± 9.31	17.5 ± 7.96	16.8 ± 7.53	23.5 ± 9.51	5.2~13.9

A; Only PCR positive, B; Ab and PCR positive, C; Only Ab positive, D; Ab and PCR Negative A;a Tukey group(P<0.05)

2. 혈액도말 검사

혈액도말을 Giemsa염색하여 현미경 검사한 결과에서 적혈구 내 난원형 모양의 1.1~2 μm 의 원충인 *B. gibsoni*로 의심되는 총체가 감염정도에 따라서 차이를 보이며 관찰되었다(Figure 4).

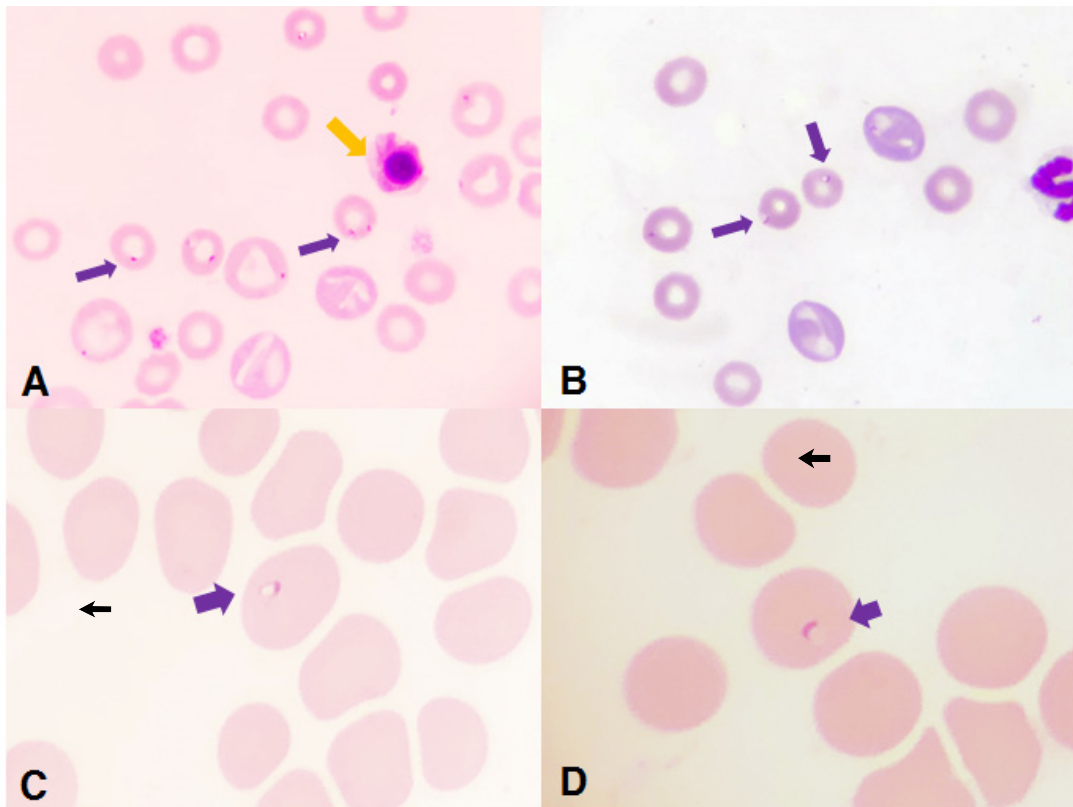


Figure 4. Photomicrograph(x1,000) of Giemsa-stained thin-smear blood films showing erythrocytes parasitized by *B. gibsoni* merozoite. Purple arrow; *Babesia gibsoni*, yellow arrow; nucleated RBC

3. Canine Babesia Antibody test kit

새로 개발된 One step canine Babesia Ab test kit (BioNote, Inc, Korea)를 사용하여 혈중 Babesia 항체 존재 여부를 확인한 결과(Figure 5), 211마리중 74마리가 양성을 보였고, 137마리는 음성을 보였다(Table 6).



Figure 5. Positive result in the cartridge for Canine Babesia antibody detection (A) and negative results in the cartridge for Heartworm antigen, *Ehrlichia canis* antibody, Borellia antibody and Anaplasma antibody detection (B)

Table 6. Result of One step canine Babesia Ab test kit in dog

	Positive	Negative
Total(=211)	74	137

4. PCR 검사

총 211 마리의 혈액에서 추출한 gDNA 시료 중 99마리(46.9%)가 1,676 bp 크기의 PCR 산물이 증폭되어 바베시아 양성으로 확인되었다(Figure 6).

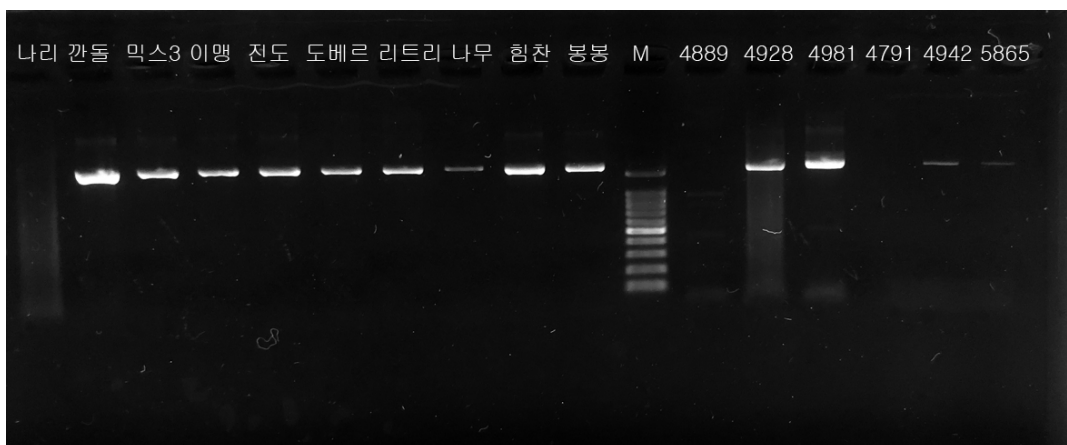


Figure 6. Analysis of PCR products of *Babesia* spp. by 1.5% agarose gel electrophoresis. The sizes of PCR product of amplified 18s rRNA of *Babesia* spp. is 1,676 bp. M : 100 bp ladder marker (upper size; 1,500 bp)

5. CRP 검사

총 211 마리 모두를 CRP 검사를 하지못하였다. CRP검사를 한 A군 20마리중 11마리가 양성(55%), B군 29마리중 22마리가 양성(75.9%), C군 6마리중 6마리가 양성(100%), D군 60마리중 41마리가 양성(68.3%)을 보였다(Table 7).

Table 7. C reactive protein(CRP) in each group

Group	A	B	C	D
CRP				
Positive	11	22	6	41
Negative	9	7	0	19
No test	17	33	6	40
Total	37	62	12	100

6. qPCR 검사

총 211 마리의 혈액에서 추출한 시료 중 PCR 양성을 보인 99마리(46.9%)가 Tm값 82°C (±2°C)에서 한 개의 peak로 동일한 결과를 나타내었다(Figure 7).

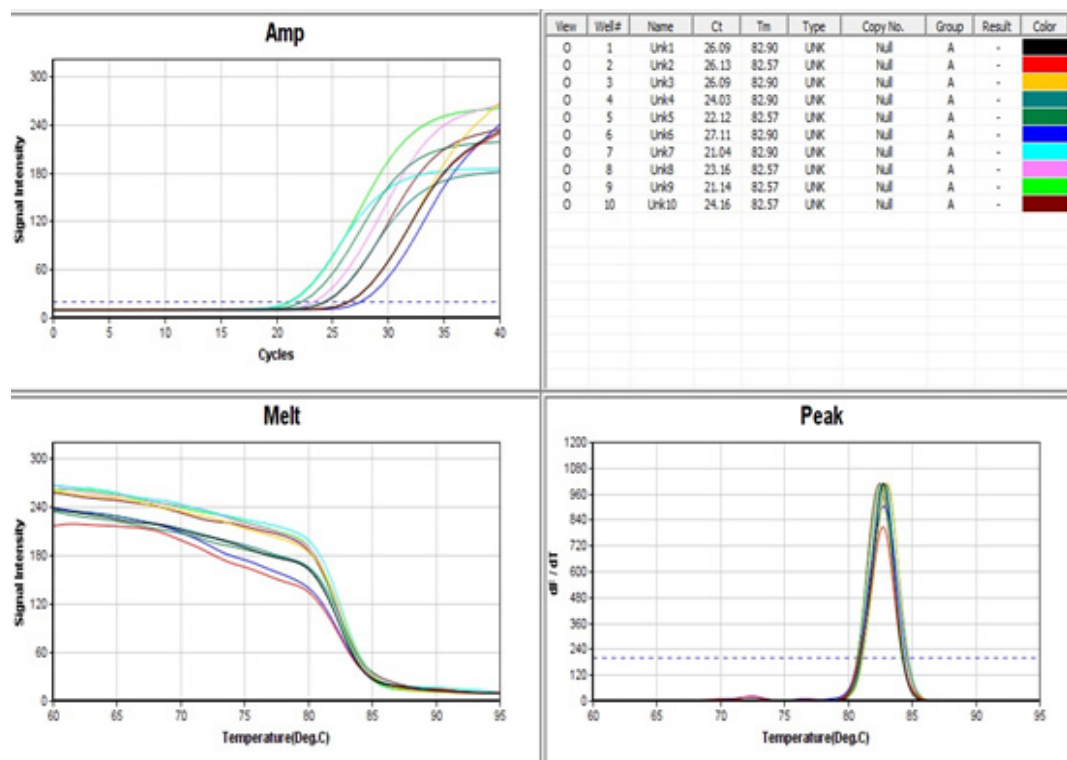


Figure 7. Results of quick PCR in the babesia positive samples

7. 민감도와 특이도 평가

One step canine Babesia Ab test kit (BioNote, Inc, Republic of Korea)의 민감도(Sensitivity)는 $(62 \times 100) / (62 + 37) = 62.6\%$, 그리고 특이도(Specificity)는 $(100 \times 100) / (100 + 12) = 89.3\%$ 로 나타났다(Figure 8).

	PCR Positive	PCR Negative	
Ab kit Positive	TP=62	FP=12	Positive predictive value 83.8% $= (62 \times 100) / (62 + 12)$
Ab kit Negative	FN=37	TN=100	Negative predictive value 73.0% $= (100 \times 100) / (37 + 100)$
	Sensitivity =62.6% $= (62 \times 100) / (62 + 37)$	Specificity =89.3% $= (100 \times 100) / (100 + 12)$	

Figure 8. Sensitivity and Specificity of Canine Babesia antibody test kit based on PCR results. TP; true positive, FP; false positive, FN; false negative, TN; true negative

IV. 고 찰

최근 지구 온난화와 더불어 진드기 발생 지역의 확산과 이에 따른 진드기 매개 질병인 바베시아의 감염이 증가하고 있는 추세이다[18]. 우리나라에서는 제주도에서의 발병이 두드러지지만, 최근에는 한강 이북 지역까지 바베시아가 보고되는 등 발생 지역이 광범위해지고 있다[17, 18]. 우리나라를 비롯한 아시아 전역에서는 작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis*)와 가시들피참진드기(*Haemaphysalis bispinosa*)가 매개하는 *B. gibsoni*가 발생하고 있다[18]. 진드기가 활동하는 시기인 봄철(3~5월)부터 가을철(11~12월) 사이에 바베시아 감염증이 다발하고 있다. 이 시기에 제주도내 내원하는 빈혈과 빈혈 의심되는 개의 혈액에서 DNA를 추출하여 PCR한 결과 총 211마리중 99(46.9%)마리에서 양성을 확인하였다.

바베시아에 대한 치료법으로 diminazene aceturate(Berenil[®])가 사용되어 왔으나, 근육주사 부위의 괴사[1], 소뇌 출혈에 의한 신경증상, 발작 및 간독성 등의 부작용이 발생[23]과 약물에 대한 내성의 발현 및 높은 재발률과 같은 문제점이 보고되고 있다[10]. 치료에서 여러 가지 문제점들이 있기에 무엇보다도 빈혈 환자에 대해서 정확한 바베시아 진단을 필요한 상황이다. 본 연구에서는 기존 진단법(CBC, Giemsa stain, Ab kit, PCR)과 새로 개발된 One step canine Babesia Ab test kit 민감도와 특이도를 PCR로 평가하였으며, 역시 새로 개발 중인 qPCR의 지역병원 효용성을 확인하였다.

일반 혈액 검사상 A군(PCR+, Ab kit-)은 바베시아에 의한 임상증상이 발현되기 전 혹은 임상증상 초기 상태로 보이며, 이 시기에는 적혈구지수(RBC index), 혈소판수 그리고 재생상을 의미하는 MCV는 정상으로 관찰되었다. B군(PCR+, Ab kit+)은 바베시아 감염중기이면서 임상증상이 발현된 시기로 보이며 적혈구 지수와 혈소판수는 감소를 보이며 재생성의 MCV 증가는 일반적 바베시아에서 관찰되는 재생성 빈혈에 의한 것으로 판단된다. 적혈구 지수 및 혈소판

수 감소가 뚜렷하지 않은 이유는 숙주의 건강 및 면역상태의 차이로 빈혈의 심한 정도가 다르기 때문으로 생각된다. C 군(PCR-, Ab kit+)은 대부분은 바베시아 치료를 한 군으로, 치료에 의한 바베시아 소멸로 PCR은 음성이나 이미 생성된 항체가 지속되는 상태로 보이며 B 군보다 RBC 지수 및 혈소판수가 다소 증가하는 수치를 보였다. D 군은 바베시아 감염되지 않은 개체들이지만 비빈혈로 내원한 환자들로 적혈구와 혈소판 수는 정상을 보였다. WBC 수는 바베시아 감염초기에는 다소 증가(A 군)하였다가 감소하는 경향(B군과 C군)을 나타내었다. 그리고 비빈혈 D군은 바베시아 감염은 아니지만 다른 원인에 의한 감염소견이 있는 것으로 생각된다. 제주도 사육되는 야외견에서 실제 바베시아가 감염되어있지만 증상을 나타내지않는 경우(불현성)가 종종 관찰된다. 이는 제주도내 개에서 바베시아 감염증이 풍토병화되어 있는 것으로 사료되며, 이 부분에 대한 연구는 향후 필요할 것으로 여겨진다. 일반 혈액검사에서 용혈성 빈혈, 혈소판감소증을 확인된다면 바베시아 감염증 이외의 면역매개성용혈성빈혈, 면역매개성혈소판감소증, 아연중독, 리케치아성 질병, 바토넬라증, 렙토스피라증, 중증의 심장사상충 감염증, 전신성홍반성낭창, 종양 및 출혈 등의 질병과[16] 감별진단이 필요하며, 이를 위해서 바베시아 항체 및 항원검사가 절대적으로 필요한 것으로 판단된다.

혈액도말상 적혈구내 바베시아 충체를 확인하기 위한 김자염색은 많은 시간이 소요되며 염색 방법(시약, 희석정도, 시간, 숙련도)에 따라 혈구내 충체와 이물(artifacts)을 구분할 수 없을 수 있다. 검사자 및 실험실에 따라 민감도와 특이도의 차이를 보이기에 보다 확실한 검사법이 필요하다.

새로 개발된 One step canine Babesia Ab test kit (BioNote, Inc, Korea)는 FN(37 개체), TP(62 개체), TN(100 개체), FP(12 개체)을 나타내었다. 바베시아 PCR 검사에서만 양성인 FN(37 개체)은 항체가 생성되기 전인 잠복기, 항체와 PCR 모두에서 양성을 보인 TP(62 개체)은 임상증상을 보이는 감염시기, PCR은 음성이면서 항체 양성인 FP(12 개체)은 바베시아 치료후 바베시아 원충은 소멸되었거나 항체가 지속된 시기라고 판단된다[29]. 이를 근거로 새로 개발된 바베시아 항체진단 키트의 민감도는 62.6%이며 특이도는 89.3%로

나타났다. 이러한 민감도는 바베시아 감염증 초기 PCR 검사는 양성이나 초기 항체가 나타나지 않은 결과로 보이며 특이도는 질병의 완치후 PCR은 음성이나 항체가 여전히 남아 나타나는 결과로 보여진다.

PCR검사는 총 211 마리의 혈액에서 추출한 gDNA 시료 중 99마리(46.9%)가 1,676bp 크기의 PCR 산물이 증폭되어 바베시아 양성으로 확진 되었다. 실험 개체의 절반에 가까운 환자에서 양성 결과는 연구시기(2018년 5월과 11월 사이)가 도내 진드기 활동이 가장 왕성한때 진행된 결과로 보여지며 위에서 언급한 감염은 되었거나 무증상을 보이는 보균개체의 증가 즉, 풍토병화가 진행되고 있는 것으로 사료된다.

급성기 반응단백 CRP[28]는 감염후 초기에 증가하고 소실되는 양성을 보이나 본 연구에서 다양한 형태의 결과 수치를 나타내었다. 모든 개체를 검사하지 못하여 분석의 어려움이 있지만, 급성기 감염에 증가하였다가 임상증상을 발현하는 감염증이나 말기(2~4주 이후)에는 감소하는 것으로 판단된다. 바베시아 감염이 된 이후 새로운 감염이나 자극에 의해서 증가하는 것도 고려해야할 것으로 사료된다.

qPCR은 일반 PCR보다 간편하고 빠르게 검사할 수 있다. Initial denaturation 30초, Denaturation 3 초, Annealing 8 초, Extension 3 초로 총 40회 반복하는데 총 20분 45초가 소요되었다. 일반 PCR과 일치되는 결과를 나타내었다. 따라서 본 장비를 일반병원에 설치하고 운영한다면, 바베시아를 보다 쉽고, 빠르고, 정확하게 진단할 수 있을 것으로 생각된다.

빈혈로 내원한 환자에 대해 바베시아를 진단하기 위해서 일반 혈액검사상 RBC 지수의 감소, 재생상 및 혈소판감소증 확인만으로 확진은 어렵다. 혈액을 도말하고 김자염색한 결과에서도 적혈구내 이물과의 구분이 어려워서 정확한 감별진단에 어려움이 있다. 빈혈로 내원한 환자를 정확하게 진단 평가하기 위해서는 임상증상, 일반 혈액검사, 혈액도말 김자염색, CRP 그리고 바베시아 항체진단 및 PCR 검사를 병행하여야 할 것으로 판단된다. 민감도 특이도가 높은 PCR

의 경우 DNA 추출에서부터 유전자 증폭 및 확인하는데 많은 장비와 시간이 필요로 하지만 qPCR은 쉽고, 빠르고, 정확한 바베시아 진단 결과를 제시함으로써 향후 일반 병원에서 새로운 진단법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

2018년 5월부터 2018년 11월사이 제주도내 지역병원에 내원한 211마리 개를 대상으로 바베시아 감염을 조사하고, 새로 개발된 개 바베시아 항체진단 키트를 PCR 와 비교하여 민감도와 특이도를 평가하였다. 그리고 보다 신속하고 정확한 qPCR 의 효용성을 조사할 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 검사한 211마리 개 혈액의 PCR 검사에서 *Babesia gibsoni* 감염은 99마리로 46.9%로 확인되었다.
2. One step canine Babesia Ab test kit 검사는 총 211마리중 74마리가 양성으로 확인되었으며, PCR 검사 결과를 근거로 항체진단키트의 민감도는 62.6%였으며, 특이도는 89.3%로 나타났다.
3. 바베시아 PCR 검사에서만 양성인 A 군은 항체가 생성되기전인 감염초기(잠복기), 항체와 PCR 모두에서 양성을 보인 B 군은 감염 진행시기(심한 임상증상 발현시기), PCR 은 음성인면서 항체 양성인 C 군은 바베시아 치료후 바베시아 원충은 소멸되면서 항체가 지속된 시기라고 판단된다.
4. 일반 PCR 에서 양성을 나타낸 시료에 대한 qPCR 의 결과에서 동일한 결과($T_m=82\pm 2^{\circ}\text{C}$)를 나타내었다.

이상의 결과에서 새로 개발된 바베시아 항체 진단키트는 바베시아 감염을 평가하는데 도움은 되지만, 감염초기 혹은 치료 이후 환자의 상태를 정확히 진단하고 평가하기 위해서 임상증상, 혈액검사 및 PCR 검사와 병행할 필요가 있다. 향후 실시간 신속 PCR 은 지역병원에서 쉽고, 빠르고, 정확한 바베시아 진단법이 될 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Boozer L, Macintire D. Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:885-904.
2. Boozer L, Macintire D. *Babesia gibsoni*: an emerging pathogen in dogs. *Compend Contin Educ Vet* 2005; 27: 33-42.
3. Yonamine, H., Ichiki, H., Hamakawa, M., Shimabukuro, T., Sugiyama, M., Isoda, M., 1984. Studies on canine babesiosis in Okinawa Island. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46: 511-518.
4. Garcia AT. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol* 2006; 138: 97-102.
5. Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K, Okuda M, Onishi T, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet Parasitol* 2004; 121: 341-346.
6. Shimada, Y., Beppu, T., Inokuma, H., Okuda, M. and Onishi, T. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 38-45.
7. 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.
8. Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Fetal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol* 2005; 35:1031-1035.

9. 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.
10. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1163–1173.
11. Uilenberg G, Franssen FFJ, Perrie NM. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q* 1989; 11: 33-40.
12. Taboada J, Merchant SR. Babesiosis of companion animals and man. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21: 103–123.
13. 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.
14. Jacobson LS, Clark IA. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *J S Afr Vet Assoc* 1994; 65: 134–145.
15. Masuda T, Baba E, Arakawa A. Relapse of canine babesiosis after prednisolone treatment. *Mod Vet Pract* 1983; 64: 931–932.
16. Ayoob AL, Hackner SG, Prittie J. Clinical management of canine babesiosis. *J Vet Emerg Crit Care* 2010; 20:77–89. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00489.x.
17. 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.
18. 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; 9:681–686.
 19. Irwin PJ, Hutchinson GW. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Aust Vet J* 1991; 68: 204–209.
 20. Chisholm ES, Ruebush II TK, Sulzer AJ, Healy GR. *Babesia microti* infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:14–19.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Lin MY, Huang HP. Use of a doxycycline–enrofloxacin–metronidazole combination with/without diminazene diacetate to

- treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. Acta Vet Scand 2010; 52: 27–30. doi: 10.1186/1751-0147-52-27.
26. 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.
27. Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer AJ, Cummings J, Boudreaux MK, Stockham SL, Irizarry–Rovira A, Conrad PA. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. Int J Parasitol 2000; 30: 1501–1505.
28. Matijatko V, Mrljak V, Kis I, Kucer N, Forseck J, Zivicnjak T, Romić Z, Simec Z, Ceron JJ. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. Vet Parasitol 2007; 144:242–250.
29. Eichenberger RM, Štefanić S, Naucke TJ, Šarkūnas M, Zamokas G, Grimm F, Deplazes P. An ELISA for the early diagnosis of acute canine babesiosis detecting circulating antigen of large *Babesia* spp. Vet Parasitol 2017; 243: 162–168. doi:10.1016/j.vetpar.2017.06.030.
30. Zhou J, Zhang G, Nishikawa Y, Fujisaki K, Xuan X. A 38–kDa protein from *Babesia gibsoni* and its antibody response in an experimentally infected dog. Vet Parasitol 2006; 141: 345–348.

