

## 개 심장사상충의 분자유전학적 진단기법에 관한 연구

이승미<sup>†</sup> · 이우원 · 강신영 · 이강록 · 김금향  
축산물위생검사소

### Diagnosis of canine dirofilariasis using molecular genetic assay

Seung-Mee Lee<sup>†</sup>, Woo-Won Lee, Sin-Young Kang, Gang-Rok Lee and Geum-Hyang Kim  
Veterinary Service Laboratory

#### Abstract

Detection of *Dirofilaria immitis* currently involves microscopic examination for larval stage. Although this method is used commonly as a screening tool for clinical diagnosis, it lacks both sensitivity and specificity. In this assay, we aimed to develop more efficient ways for molecular genetic diagnosis of canine heartworm infections. Polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for *D. immitis* amplified the target gene of 60 microfilaremic canine blood samples including microfilaria positive 10 samples and negative 50 samples determined by the modified Knott's test. All samples suspected dirofilariasis were proven to have *D. immitis* specific gene by PCR. Moreover, one of 50 blood samples considered no dirofilariasis was also proven to have the target gene by PCR. This finding indicates that the PCR assay could be useful and more sensitive screening tool for detecting heartworm antigen than Modified Knott's test. We also investigated the prevalence of canine heartworm infections, from 200 dogs in Busan missing dog shelter from August to December in 2010. Twelve (6.0%) of 200 samples tested with modified Knott's technique showed positive reactions for microfilaria.

Key Words : Modified Knott's test, canine heartworm infection, PCR

#### 서론

심장사상충(*Dirofilaria immitis*)은 모기에 의해 매개되고 개, 고양이, 여우, 늑대를 포함한 여러 포유동물에 기생하는데 주로 개에서 문제시되어 여러 장기에 장애를 가져오는 선충류의 기생충이다<sup>1)</sup>. 모기의 체내에서 형성된 제3기 감염유충(L3)은 모기가 흡혈 시 종숙주의 피하에 침입하여 약 6개월 후에 성충으로 발육하며, 주로 종숙주의 우심실과 폐동맥에 기생한다. 이 기생충에 중감염된 개는 폐와 심장에 동맥내막염과 폐삼출물의 증가 및 울혈성 심장기능부전을 특징으로 하는 진행성 질병을 일으키고 심지어는 돌연사하는 경우도 있다. 심장사상충증으로 진단된 개의 혈액학적 소견들은 경증에서 중증도의 빈혈과 저혈소판증, 뚜렷한 백혈구 증가증, 중등도에서 뚜렷한 정도의 호중구 증가증, 호산구 증가증 그리고 단핵구 증가증이 나타난다<sup>2,3,13,14)</sup>.

일반적으로 개 심장사상충을 진단하는 방법은 임상증상, 초음파 검사 및 필라리아자충검사, 혈중 항체와 항원을 검출하는 면역반응법 등이 실시되고 있다. 가장 보편적으로 이용되는 진단법으로는 혈액 내 존재하는 필라리아자충(microfilaria) 검사법과 성충특이항원을 이용하여 개발된 상품화된 진단키트가 있다<sup>4-9)</sup>. 자충검사법은 혈액내의 자충을 현미경으로 직접 확인하는 고전적인 방법으로서 간단하고 용이하여 1차적 진단으로 이용되고 있으나 채혈시간과 계절에 따라 정기출현성이 있고 성충이 심장에 기생하면서도 혈액 내에 필라리아자충이 검출되지 않는 이른바 은폐감염(occult infection)의 경우가 있으며 형태학적으로 비슷한 *Dipetalonema reconditum*와 같은 타 사상충과의 감별이 불가능하다<sup>14)</sup>. 한편 성충특이항원을 검출하기 위해 단클론 항체와 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법의 원리를 이용한 상용화된 키트들은 필라리아자충검사법보다 높은 검출율과 유의성이 있으며 사용이 편리하여 동물병원에서 선호하는 진단법의 하나

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : bona4860@korea.kr  
Tel : +82-51-331-0095, Fax : +82-51-338-8266

이다<sup>11,15,19</sup>. 그러나 키트마다 민감도와 특이도 차이가 있으며 Rishniw 등<sup>12,25</sup>은 특이항원검사에서 *D. immitis* 음성이고 필라리아자충의 형태학적 진단을 통해 *Acanthocheilonema reconditum*으로 진단되었던 개체가 PCR법에 의해서 *D. immitis*로 확인됨으로써 형태학적 진단의 부정확성과 성충 특이항원검사의 한계성을 보고하였다<sup>10,21,25</sup>.

최근에는 분자학적 특성을 이용하여 *D. immitis*와 다른 종류의 사상충을 구별하는 PCR법 등 분자유전학적인 진단법이 기존 검사법의 부정확성을 보완하는 방법으로 연구되고 있다<sup>10-15</sup>.

따라서 본 연구에서는 심장사상충의 현재 활용되고 있는 진단 기법을 비교하고 PCR 진단기법을 확립하여 심장사상충의 정확한 검사법을 제시하고 질병 진단 시 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시 재료

2010년 8월부터 12월까지 부산지역에 소재한 동물보호소에서 보호중인 유기견들 중 200마리를 무작위로 선정하여 혈액을 채취하였으며 혈액채취는 대상견의 경정맥 (jugular vein) 및 요골측 피부정맥 (cephalic vein)에서 3 mL을 채혈하여 EDTA 용기에 담고 실험 전까지 냉장 보관하였다. 혈액 1 mL은 modified Knott's test를 실시하고자 2% formalin 9 mL와 혼합하였고, 나머지 혈액은 유전자분리 전까지 냉장 보관하였다. 또한 병성감정 의뢰된 폐사견에서 부검의뢰 시 심장에서 발견된 심장사상충의 성충을 표준시료로 사용하였다.

### 자충현미경검사법

#### 혈액 직접 검정법

말초혈액 20  $\mu$  L와 생리식염수 20  $\mu$  L를 슬라이드에 잘 도말한 후 현미경으로 검사하였다.

### Modified Knott's test

말초혈액에서 필라리아자충을 확인하고자 modified Knott's test를 이용하였다<sup>20</sup>. 혈액 1 mL를 2% formalin 용액 9 mL에 넣고 잘 혼합하여 적혈구를 충분히 용혈시킨 후 원심분리 (2,000 rpm, 5 min)를 시킨 다음 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 동량의 1% methylene blue를 첨가하여 잘 혼합한 후 현미경으로 검사하였다.

### Genomic DNA 추출 및 정제

필라리아자충에 감염된 유기견에 대한 *D. immitis*의 감염을 확인하고자 genomic DNA추출은 Miller 등<sup>24</sup>의 phenol/chloroform 추출방법의 일부를 변형하여 실시하였다. Nucleic lysis solution (promega, USA) 300  $\mu$  L에 풀어 65°C 30분 반응시킨 후, phenol/chloroform (1:1) 500  $\mu$  L를 혼합하여 12,000 rpm에서 3분 정도 원심분리하여 단백질을 제거 한 후 상층액을 isopropanol 600  $\mu$  L와 혼합하여 12,000 rpm에서 5분 정도 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA는 70% ethanol로 2회 세척 후 65°C에서 5분 정도 건조하여 순수한 3차 증류수에 용해하여 50~150 ng/ $\mu$  L 농도로 희석하여 -20°C에서 보관하였다.

### Polymerase chain reaction 조건

추출된 genomic DNA부터 *D. immitis*의 유전자 일부를 증폭시키고자 Mar 등<sup>11</sup>의 방법에 따랐으며 Table 1과 같은 primer를 사용하여 PCR을 실시하였다<sup>17-19</sup>. PCR 반응은 template DNA 2  $\mu$  L, 각 20 pmol/ $\mu$  L primer 1  $\mu$  L, Taq premix (Solgent, Korea) 12.5  $\mu$  L 그리고 멸균증류수로 총 25  $\mu$  L로 조정하였다. PCR 반응조건은 PCR thermocycler를 사용하였으며 수행은 94°C에서 3분간 수행 후 94°C 30초, 55°C 40초, 72°C 50초를 40cycle을 수행한 뒤 72°C에서 50초간 반응시켜 PCR을 완료하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 산물을 확인하였다.

Table 1. Synthetic oligonucleotide used as primer for PCR

oligo name	sequence(5'→ 3')	gene target	product band size
<i>D. immitis</i> F	GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC	ROR91	440 bp
<i>D. immitis</i> R	CAA GGC GTA TTT ACC GCC GCA	ROR92	

## 결과 및 고찰

### 자충현미경검사법과 modified Knott's test

혈액 시료 200건을 검사한 결과 12건에서 심장사상충 자충을 의심할 수 있었으며 Fig. 1과 같이 소견을 보이는 혈액시료를 양성으로 간주하였다. 한편 감염 상태에 따라 현미경적 소견이 다르게 나타났다. 중감염의 경우 신선한 혈액을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 현미경을 보는 직접 검정법으로도 활발한 움직임을 보이는 자충을 쉽게 확인할 수 있었다. 그러나 경감염의 경우나 자충의 움직임이 없는 경우도 있었으며 현미경 형태만으로는 심장사상충 자충 감염 여부를 확신하기 어렵다고 판단되었다.

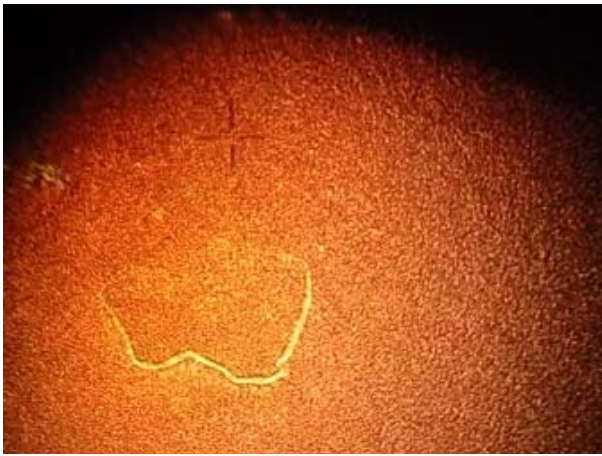


Fig. 1. Microfilaria of *D. immitis* detected by a direct method.

### PCR 분석 결과

현미경으로 자충감염이 의심된 10개의 혈액 시료와 현미경 소견 상 음성을 보이는 50개의 혈액 시료에서 분리한 유전자를 PCR법으로 확인하였고 표준시료로 병성감정 의뢰된 폐사견 부검 시 발견된 심장에서 채취한 심장사상충에서 분리한 유전자를 사용하였다. 현미경 소견 상 자충의 움직임이 거의 없고 심장사상충 키트에서도 약한 양성을 보여 의양성으로 판정했던 혈액에서 심장사상충 항원의 특이밴드를 확인 할

수 있었으며, 현미경 소견 상 음성으로 판정되었던 혈액 시료 1건에서도 PCR 양성을 확인 할 수 있었다. 혈액 시료 200건 중 60건에 대한 현미경검사법과 PCR검사법의 민감도와 특이도를 평가하면 현미경검사법에서 의양성을 포함한 양성 10두에서 특이밴드를 확인할 수 있었고, 검정법에서 음성으로 판정된 시료 1건에서 특이밴드가 확인되어 검사법 민감도가 조금 높다고 판단된다. 이 등<sup>16)</sup>의 연구에서 나타난 현미경검사법 10.2%와 항원검사법 28.3%의 확인한 민감도 차이를 보이지 않았으나 현미경검사법에서 형태학적으로 확신이 가지 않거나 반복검사 시 일관성 없는 출현율을 보임에 따라 PCR을 통한 검사법이 더 정확하고 명확함을 알 수 있었다. Rishniw 등<sup>12)</sup>은 특이항원검사에서 *D. immitis* 음성이 고 필라리아자충의 형태학적 진단을 통해 *A. reconditum*으로 진단되었던 개체가 PCR법에 의해서 *D. immitis*로 확인됨으로써 형태학적 진단의 부정확성과 성충 특이항원검사의 한계성을 보고하였다<sup>17)</sup>. 국내에서 이 등<sup>21)</sup>의 보고에 의하면 modified Knott's test에서 양성인 시료에 대해 acid-phosphatase 염색법으로 필라리아자충을 감별한 결과 *D. immitis* 뿐만 아니라 개 혈액 중에 다른 필라리아자충인 *D. repens*와 *Acanthocheilonema dracunculoides*의 감염 사실을 보고하였다

부산지역 유기동물보호소 심장사상충 감염 실태 조사

2010년 8월에서 12월까지 부산광역시 보호소에서 보호하고 있는 유기견 200마리를 대상으로 필라리아 자충검사법을 이용하여 개 심장사상충의 감염여부를 검사한 결과 12마리(6%)에서 필라리아 자충과 유사한 소견을 보였다. 양성시료에 대한 성별, 연령, 채취계절은 Table 2, 3, 4에서와 같이 조사되었다. *D. immitis*의 필라리아자충 검사와 항원검사법을 이용한 개 심장사상충의 감염률은 이 등<sup>21)</sup>이 전국을 대상으로 독일 셰퍼드종에 대해 조사한 결과 13.2%, 이 등<sup>6)</sup>은 충남지역 사육견에서 19.0%의 감염률을 보고하였고, 장 등<sup>22)</sup>의 대전지역 사육견에서 12.1%의 감염률을 보고하였으며, 고 등<sup>25)</sup>이 12.4%의 감염율을 보고한 것과 비교하여 볼 때 다소 낮은 감염율을 나타내었다. 이러한 차이를 보이는 것에는 여러 가지 요인이 있는데 첫째로는 과거에 비해 최근 축주들의 심장사상충에 대한 적극적인 예방과 구제로 심장사상충 감염률이 낮아진 것으로 판단되며, 두 번째 요인으로 품종적인 요

인이 있는데 연구대상 유기견의 대부분은 소형견 위주로 실내에서 키워지다 유기된 것으로 추정되어 시료 선정에 있어서 셰퍼드나 사육견 등 대형견의 감염률과는 다소 차이가 있었다. 세 번째 요인으로 축종견의 연령을 들 수 있는데 본 조사에서 무작위 선발된 유기견의 연령대가 다소 낮았으며 이것은 심장사상충의 매개체인 모기에 대한 노출빈도 차이로 낮은 감염율을 볼 수 있으며 4세 이상 개에서 감염률이 높고 중감염이 발견되었다. 이것은 이 등<sup>16)</sup>의 국내 독일 셰퍼드에서 심장사상충 감염실태에서 연령이 증가할수록 감염률 또한 유의성 있게 증가한다는 결과와 일치하며 본 연구에서와 같이 성별 간 유의성 있는 감염률 차이는 인정되지 않았다. 마지막으로 계절적인 요인을 들 수 있는데 본 연구를 위한 시료채취가 늦여름과 가을에 치우쳐 있어 다소 감염률이 높다는 봄철에 이루어지지 않아 감염률이 낮았으며 추가적인 시료채취로 계절발생에 대한 연구와 고찰이 필요하다고 판단된다.

Table 2. Detection rate of heartworm by modified Knott's test in free roaming dogs in Busan

Sex	No. of dogs examined	No. of positive dogs	%
Male	123	6	4.9
Female	77	6	7.8
Total	200	12	6.0

Table 3. Age distribution of infected dogs

Sex	No. of positive dogs / No. of dogs examined (%)			
	under 2 years	2~4 years	4~6 years	over 6 years
Male	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	0
Female	1/12 (8.3%)	1/12 (8.3%)	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)
Total	3/12 (25.0%)	3/12 (25.0%)	4/12 (33.3%)	2/12 (16.7%)

Table 4. Seasonal distribution of infected dogs

Sex	No. of positive dogs / No. of dogs examined (%)		
	Summer (8 Mon)	Autumn (9-11 Mon)	Winter (12 Mon)
Male	1/12 (8.3%)	5/12 (41.6%)	0
Female	1/12 (8.3%)	4/12 (33.3%)	1/12 (8.3%)
Total	2/12 (16.7%)	9/12 (75.0%)	1/12 (8.3%)

## 결 론

2010년 8월부터 12월까지 부산지역 동물보호소에 보호 중인 유기견을 대상으로 무작위로 혈액 샘플을 채취하여 개 심장사상충 감염을 조사하고 적절한 진단 방법을 제시하고자 하였다.

1. 현미경검사법을 이용하여 심장사상충 자충을 12점 확인할 수 있었으나 감염상태에 따라 현미경적 소견이 다양하여 판단이 모호한 경우가 있었다.
2. 현미경검사법에서 양성으로 판정된 혈액 10점과 음성으로 판정된 혈액 50점에서 심장사상충 특이 프라이머를 이용한 PCR법으로 진단한 결과 양성의심 혈액 10점과 음성혈액 1점에서 특이적 항원을 검출하여 PCR법을 이용한 진단이 민감도가 높고 신뢰성 있는 결과를 보여 주었다.
3. 한편 부산지역 동물보호소 내 유기견의 심장사상충 감염율은 6%(200마리 중 12마리)로 나타났다. 이것은 타 지역의 실태조사에 비해 낮은 것으로 나타났는데 그 요인으로는 최근 예방약의 보급 확대와 축주들의 적극적인 예방, 대상견의 품종, 연령, 채취 계절 등과 관련이 있다고 판단된다.

본 연구를 종합하여 볼 때 유기동물의 질병진단과 건강관리를 통해 유기견의 재입양을 돕고 유기동물 뿐 아니라 시민 보건 및 복지에도 기여할 수 있으므로 동물보호소 내 유기견에 대한 질병감염실태를 지속적으로 조사하고 확대하여 체계적인 관리체계가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Soulsby EJJ, *Dirofilaria immitis*. In Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7 eds, Bailliere Tindall, London : pp.307~312(1982).
2. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. *Parasitology and vector biology*. Academic Press, New York : pp.464~469(2000).
3. Niwetpathomwat A, Kaewthamasorn M, Tiawsirisup S, et al. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Res Vet Sci* (Epub ahead of print).
4. American Heartworm Society. Recommended procedures for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Proc Heart-worm Symp* 95. Vavaria, IL: Am Heart-worm Soc : pp.303~308(1995).
5. 김명철, 김종만, 김덕환 등. 개에서 심장사상충증의 발생 2례. *한국임상수의학회지* 16 : pp.235~238(1999).
6. 서영우, 신성식, 김종택. 수도권 일대 집단 번식농장 사육견에서의 개 심장사상충 감염실태. *대한수의사회지* 41 : pp.79~83(2001).
7. 이종훈, 심상원, 김희 등. 충남지역 집단 번식농장 사육견의 심장사상충 감염률 조사. *한가위지* 26(1) : pp.19~26(2003).
8. 이정원, 엄성심, 박인규 등. 전주시역 애완견에서 심장사상충, 개선충 및 모낭충 감염실태조사. *한가위지* 28(1) : pp.39~47(2005).
9. Song KH, Lee SE, Hayasaki M, et al. Seroprevalence of canine dirofilariasis in South Korea. *Vet Parasitol* 114(3) : pp.231~236(2003).
10. Son-ill Pak and Doo Kim. Evaluation of diagnostic performance of polymerase chain reaction for detection of canine *dirofilaria immitis*. *J. Vet Clin* 24(2) : pp.77~81(2007).
11. Mar PH, Yang IC, Chang GN, et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Vet Parasitol* 106(3) : pp.243~252(2002).
12. Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 135(304) : pp. 303~314(2006).
13. 박응복, 이희성. 진주지방 축견의 견사상충 조사. *진주농대 연구보고* 1 : pp.34~58(1962).
14. Grieve RB, Glickman LT, Bater AK, Marcia Mika Grieve, Thomas CB, Patronek GJ. Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area examined by parasitologic finding at necropsy and by two serodiagnostic methods. *Am J Vet Res* 47:pp.329~332(1982).
15. American Heartworm Society. Recommended procedures for the diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. In soll MD, Proceedings of the Heartworm Symposium, 92 : 99. pp.289~294(1992).
16. 이정치, 이채용, 신성식, 이정길. 국내 독일세퍼드 (German shepherd)종의 개심장사상충 감염실태. *기생충학잡지* 34(4) : pp.225~231(1996).
17. Patton S, Faulkner CT. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 200:pp.1533~1534(1992).

18. Hyun-wook oh, Hyung-Kyou Jun, Myung-Jo You, Mineo Hayasaki and Kun-Ho Song. Ectopic Migration of an Adult Heartworm in a Dog with Dirofilaria immitis. *Korean J parasitol*, 46(3) : pp.171~173(2002).
19. Watts KJ, Courteny CH, Reddy GR. 1999. Development of a PCR and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. *Mol Cell Probes*, 13: pp.425~430(1999).
20. Ewing SA. *Examination for parasites*. In Coles EH, ed *Veterinary clinical pathology*. 4 eds. WB Saunders Pub, Philadelphia : pp.385~386(1986).
21. 이상은, 송근호, 김덕환. 2003. 국내 개 사상충증 발생율에 관한 조사 연구. *대한수의학회지* 43(3) : pp.517~520(2003).
22. 장승익, 송운재, 하숙희 등. 대전지역 사육견의 심장사상충 감염실태 조사. *한가위지* 27(2) : pp.133~137.
23. 이영준, 박진호, 권오덕 등. 역전사증합효소연쇄반응을 이용한 개심장사상충의 검출. *한국임상수의학회지* 16 : pp.177~181(2002).
24. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16, p.1215.(1998).
25. 고바라다, 나호명, 장미선, 김지연, 박성도. 광주지역 동물보호소내 유기견의 개심장사상충증과 개 브루셀라병 감염실태조사. *대한수의학회지* 30(1) : pp.155~164(2007).