

## 역전사중합효소연쇄반응을 이용한 개심장사상충의 검출

이영준 · 박진호 · 권오덕<sup>1</sup> · 이주목  
전북대학교 수의과대학

### Detection of *Dirofilaria immitis* by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Canine

Young-Jun Lee, Jin-Ho Park, Oh-deog Kwon<sup>1</sup> and Joo-mook Lee  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

**ABSTRACT :** This study was undertaken to clarify the more accurate detecting method of *Dirofilaria immitis*. Seven dogs, average 7.47 years old, confirmed with *Dirofilaria immitis* infection by modified Knott's method were used as the experimental animals. cDNA was constructed using oligodT(15) primer after extracting total RNA from the blood of dogs that were confirmed with *Dirofilaria immitis* infection. As a result of polymerase chain reaction with template using constructed cDNA, the predicted products of a 378 base-pair DNA fragment was amplified. From these results, RT-PCR was more sensitive and effective than modified Knott's method to detect *Dirofilaria immitis* in dogs.

**Key words :** Modified Knott's method, RT-PCR, *Dirofilaria immitis*, Canine

## 서 론

개심장사상충은 열대, 아열대 및 일부 온대 지방에 서식하는 개, 고양이, 여우, 늑대, 말 등과 같은 각종 포유동물에 기생한다. 특히 개과에 속하는 야생 동물이 중요한 보충 숙주의 역할을 한다. 개에 기생하는 이 충은 주로 우심실과 폐동맥에 기생하지만, 몸의 다른 부위에서도 발견되고 있으며 감염 증상이 전혀 없다가 돌연사하는 경우가 있기도 하다. 암컷은 난태생으로 필라리아자충을 혈액내에 산출하면 중간 숙주인 모기가 혈액을 흡혈하는 과정에서 이 필라리아자충이 체내로 이행하여 발육하며, 모기가 또 다른 숙주를 흡혈할 때에 감염이 성립된다. 중간숙주는 *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*에 속하는 모기로 알려져있다<sup>1</sup>.

우리나라에서 개심장사상충의 감염율은 지역적으로 다양한 분포를 보이며 특히 노령개일 수록 검출율이 높으며<sup>2</sup>, 감염율의 조사는 대부분 혈액 중에서 필라

리아자충을 검출하는 방법으로 수행되어졌다<sup>2,5</sup>. 최근에 들어서는 필라리아자충 검사법과 항원검사법을 이용하여 국내의 개에 대한 감염율을 조사한 연구보고가 증가되고 있는 실정이다<sup>3,6,7</sup>.

그러나, 혈액내 필라리아자충의 검사에 의한 개심장사상충 검사방법은 숙주내에 동일한 성을 가진 성충만이 존재하거나 미성숙충이 근육내를 이행하는 잠복기인 경우 또는 필라리아자충 구충제를 투여하여 필라리아자충이 사멸한 경우와 필라리아자충에 대한 체표항체 생성으로 혈중 필라리아자충의 극단적인 감소와 같은 은폐감염의 경우에는 성충이 체내에 기생함에도 혈액내에서 필라리아자충이 검출되지 않아서 정확한 진단을 내리는데에 불합리한 점이 있다<sup>8,9</sup>. 최근에는 개심장사상충 성충의 표면항원을 인식하는 항원 검사법이 개발되어 은폐감염의 가능성을 최대한 배제하게 되었으며, 이는 실제 부검을 통한 성충의 검출율과 일치하고 있어서 정확하고 특이성이 높은 것으로 알려지고 있다<sup>10-12</sup>. 그러나 이러한 항원검사법도 기생충이 미숙하거나 성숙한 기생충 수가 적어서 검출에 필요한 항원양을 생산하지 못하면 검출에 어려운 면이 있다.

한편, Culpepper *et al.*<sup>13</sup>은 개심장사상충에서 고도

이 논문은 1999년도 전북대학교부속 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어 졌음(CNU-BSRI, No, 99-05)

<sup>1</sup>Corresponding author.

의 면역반응항원(highly immunoreactive antigen)의 분자학적 특성을 보고하였고, Scoles *et al.*<sup>14</sup>은 중합효소연쇄반응을 이용하여 5종의 사상충과 함께 개심장사상충 자충의 검출율을 비교 검토한 바 5종의 사상충에는 반응하지 않았으나 개심장사상충에서만 특이성 있게 반응하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 국내에서 사육되는 개심장사상충 감염 개들에게 ivermectin을 투여하여 필라리아자충을 완전히 제거한 다음, Scoles *et al.*<sup>14</sup>이 사용한 primer를 기초로 역전사중합효소연쇄반응을 이용하여 성충에서 분비되는 매우 적은 양의 유전자인 표면항원 물질을 혈액내에서 검출함으로써 개심장사상충의 진단이 가능한지를 알아보려고 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

Modified Knott's method<sup>15</sup>에 의해 개심장사상충의 감염이 확인된 7마리의 German shepherd를 실험동물로 사용하였으며 감염개의 평균 연령은 7.47세였다.

### 실험재료의 채취

실험개의 요측 피정맥으로부터 채혈하여 혈액내 필라리아자충 검사와 역전사중합효소연쇄반응을 실시하였다.

### 은폐감염 상황부여

역전사중합효소연쇄반응을 이용한 은폐감염시의 진단 효과를 알아보기 위하여 필라리아자충 구충제로서 *Streptomyces avermectilis*에 의하여 생산된 발효산물인 Ivermectin을 투여하여 필라리아자충을 사멸시켜서 이들이 검출되지 않도록 하여 체내에 성충만이 존재하는 은폐감염 상태를 만들었다<sup>9</sup>. Ivermectin 투여 한달 후에 혈액내 필라리아자충 검사와 역전사중합효소연쇄반응을 실시하였다.

### 혈액내 필라리아자충 검사(Modified Knott's method)

원심관에 혈액 1 ml와 formalin 9 ml를 혼합하여 2,000 rpm으로 5분간 원침시켰다. 상층액은 모두

버리고 잔액에 0.1% methylene blue를 첨가하여 slide glass 위에 취한 다음 cover glass를 덮고 검정하였다.

### Total RNA의 추출

전혈을 PBS에 2번 세척한 후 RNAzol 1 ml를 첨가하고 원심분리하여 상층액을 버렸다. Chloroform 100 µl를 넣은 후 혼합하고 5분간 얼음에 정치했다. 15,000 rpm로 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을 취해 동량의 isopropanol을 첨가하고 -20°C에서 45분간 정치 후 15,000 rpm으로 15분간 4°C에서 원심분리했다. 상층액을 버리고 80% 알코올을 첨가하여 12,000 rpm으로 8분간 4°C에서 원심분리하고 20분 정도 건조시킨 후 적정량(30 µl)의 DEPC처리한 물로 녹였다.

### cDNA의 제작

추출한 total RNA를 95°C에서 5분간 변성시킨 후 바로 얼음에 정치시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 reverse transcription KIT(Promega)를 이용하였으며, M-MLV 5×buffer, M-MLV reverse transcriptase, 10 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, oligo-dT(15) primer, RNase inhibitor, RNA를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PCR template로 사용하였다.

### Primer 제작

Highly immunoreactive antigen을 target으로 하는 primer를 합성하여 이 primer를 100 µmol/µl 농도로 조정한 후 -20°C에 보관하고 필요에 따라 희석하여 사용하였다(Table 1).

### 역전사중합효소연쇄반응

역전사중합효소연쇄반응의 혼합물은 2.5 mM dNTP, 10×PCR buffer, Taq DNA polymerase, template를 혼합한 후 증류수를 첨가하여 최종 혼합물의 양이 50 µl가 되도록 하였다. 반응조건으로는 95°C에서 5분간 predenaturation을 실시하였고, denaturation, annealing 그리고 polymerization을 각각 95°C에서 1분간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 1분간 30 cycle을 수

Table 1. Primer constructed from highly immunoreactive antigen

| Primer     | Length (mer) | Nucleotide sequence 5' to 3' | Expected product size |
|------------|--------------|------------------------------|-----------------------|
| Forward P. | 20           | 5'-ACGTATCTGAGCTGGCTCAC-3'   | 378 bp                |
| Reverse P. | 20           | 5'-ATGATCATTCCGCTTACGCC-3'   |                       |

행하였다. 그리고 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다. 유전자증폭기로는 DNA thermal cycler 2400(Perkin-Elmer Co., USA)을 사용하였다.

**증폭 DNA의 분석**

중합효소연쇄반응으로 증폭된 유전자 산물의 size를 확인하기 위하여 증폭된 유전자 산물 10 µl를 1.3% agarose gel에서 120V로 30분간 전기영동을 실시하였다. 그리고 EtBr로 염색을 한 후 UV transilluminator(Bio-Rad)로 관찰하였다. 증폭된 DNA의 크기는 PCR marker(Promega Co.)를 molecular size marker로 사용하여 확인하였다.

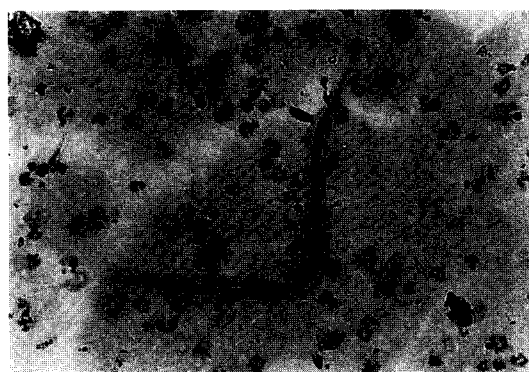
**결 과**

7마리의 German shepherd 개를 대상으로 modified Knott's method로 혈액내 필라리아자충 검사를 실시한 결과 혈액 1 ml에서 평균 24,086마리의 필라리아자충이 검출되었다(Table 2, Fig 1).

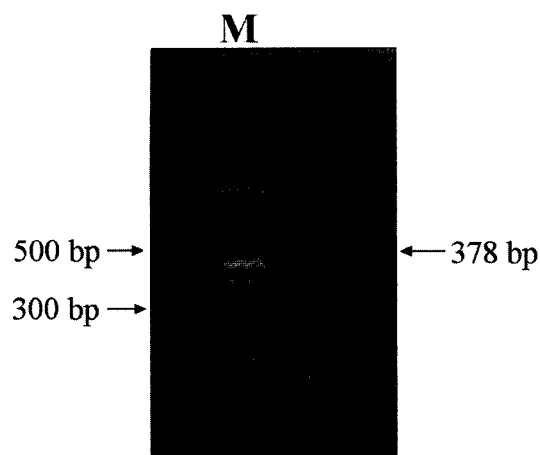
Modified Knott's method에 의하여 혈액내 필라리아자충 감염이 확인된 7마리의 실험개에 대해 역전사중합효소연쇄반응을 병행 실시하였던 바 감염개 7마리 모두에서 개심장사상충 유전자 산물이 378 bp에서 검출되었다(Fig 2). 7마리의 감염개에 대해 ivermectin을 투여하여 은폐감염 상황을 부여하고 1개월 후에 modified Knott's method로 검사한 결과 혈액내에서 필라리아자충이 전혀 검출되지 않았다. 그러나 역전사중합효소연쇄반응을 실시하여 검사한 결과에서는 7마리 모두에서 개심장사상충 유전자 산물이 378 bp에서 검출되었다(Table 3).

**Table 2.** Numbers of microfilaria detected by modified Knott's method after ivermectin therapy

| Case No. | Microfilaria (numbers/ml) |                        |         |
|----------|---------------------------|------------------------|---------|
|          | Ivermectin therapy        |                        |         |
|          | Before                    | 1 day                  | 30 days |
| 1        | 8,820                     | 200                    | 0       |
| 2        | 41,220                    | 2,970                  | 0       |
| 3        | 37,450                    | 680                    | 0       |
| 4        | 60,250                    | 9,480                  | 0       |
| 5        | 9,035                     | 490                    | 0       |
| 6        | 7,243                     | 45,920                 | 0       |
| 7        | 4,590                     | 90                     | 0       |
| Mean±SD  | 24,086.86<br>±21,997.61   | 8,547.14<br>±16,816.23 | 0       |



**Fig 1.** Microfilaria of *Dirofilaria immitis* detected by modified Knott's method (×800).



**Fig 2.** Amplification of *D. immitis* highly immunoreactive antigen gene by RT-PCR. M : DNA size marker.

**Table 3.** Comparison of detecting rate between modified Knott's method and RT-PCR

| Method         | Before ivermectin therapy | After ivermectin therapy |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| RT-PCR         | 7                         | 7                        |
| Knott's method | 7                         | 0                        |

**고 찰**

개심장사상충에 감염된 개는 흔히 깊고 연한 기침, 토혈, 활력감퇴 및 흉곽이 확대된 채 공기를 흡입하는 특징적인 호흡을 나타내는 임상증상과 더불어 혈액내에서 필라리아자충을 확인함으로써 쉽게 진단할 수 있다. 특히, 혈액내에서 필라리아자충이 검출되면 양성개로 확진할 수 있기 때문에 그 만큼 신뢰성이

높다. 그러나 암, 수 성충이 심장이나 폐동맥에 기생하면서도 혈액내에 필라리아자충이 검출되지 않는 은폐감염의 경우가 많아서(5~10%) 말초혈액내 필라리아자충의 유무에 따른 검사법으로는 진단에 한계가 있다<sup>9</sup>. 즉, 필라리아자충 구충제를 투여하거나 필라리아자충에 대한 체표항체가 생성되면 혈중 필라리아자충의 수는 극단적으로 감소하게 되어 은폐감염 상태에 빠지게 된다. 특히 필라리아자충 구충제이자 예방약인 ivermectin은 내, 외부기생충 구충제로도 많이 사용하고 있어 은폐감염의 가능성은 더 높을 것으로 추정된다.

혈액내 필라리아자충 검사법을 이용한 개심장사상충의 국내 감염율은 전주지방 23%<sup>4</sup>, 이리지역 17%<sup>5</sup>, 진도 12.3%<sup>2</sup>, 대구지역 9.6%<sup>3</sup>로 각각 조사 보고되었다.

최근에는 필라리아자충 검사법보다 민감성과 특이성이 높은 항원검사법이 개심장사상충증 진단에 이용되고 있다<sup>10-12</sup>. 국내에서는 Lee *et al.*<sup>7</sup>이 항원검사법인 DiroCHEK<sup>®</sup>로 검출을 시도하여 28.3%의 감염율을 보고하였다. 항원 검사법은 기존의 필라리아자충 검사법에 비해서는 은폐감염의 진단에 효과적이다. 그러나 이러한 항원검사법은 기생충이 완전히 발육하지 않았거나 성숙한 기생충의 수가 적어서 검출이 가능한 항원양을 생산하지 못한 경우에는 진단에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 매우 적은 양의 유전자를 가지고도 검출이 가능하고, 특히 부위 유전자만을 증폭하여 개심장사상충에 민감성과 특이성이 높은 primer를 Scoles *et al.*<sup>14</sup>의 방법에 준하여 제작, 사용하여 역전사중합효소연쇄반응이 필라리아자충 검사법에 비해 은폐감염 검출에 특이성이 있는지를 알아보기 위해 실험을 실시하였다. Modified Knott's method에 의해 필라리아 자충의 검출이 확인된 7마리의 개를 대상으로 ivermectin을 투여하여 은폐감염 상황을 부여하고 1개월 후에 modified Knott's method로 검사한 결과 심장사상충이 검출되지 않았다. 반면 역전사중합효소연쇄반응을 실시하여 검사한 결과에서는 개심장사상충 유전자 산물이 378 bp에서 검출되었다. 이상의 결과로 보아 역전사중합효소연쇄반응이 필라리아자충 검사법에 비해 다소 과정이 복잡하고 시간이 걸리기는 하지만 개심장사상충 검출에 민감성과 특이성 면에서 보다 유용한 방법이라 생각된다.

## 결 론

개심장사상충의 진단에는 혈액중에 존재하는 필라

리아자충 검사법이 널리 이용되고 있으나 실제 성충이 감염되어 있으면서도 혈액내에 필라리아자충이 발견되지 않는 은폐감염의 경우에는 혈중 필라리아자충 검사법을 통한 개심장사상충의 진단에 한계가 있다. 따라서 개심장사상충의 보다 정확한 검출방법을 규명하고자 역전사중합효소연쇄반응을 실시하였던 바 실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

개심장사상충에 감염된 7마리의 개에 ivermectin을 투여하여 은폐감염을 부여한 다음 한달이 지난 후에 modified Knott's method와 역전사중합효소연쇄반응을 병행 실시해 본 결과, modified Knott's method에서는 전혀 검출되지 않은 반면에 역전사중합효소연쇄반응에서는 모두에서 체표항원 물질이 378 bp에서 확인되었다. 이러한 결과를 볼 때 역전사중합효소연쇄반응이 개심장사상충을 검출하는데 매우 유용한 방법이라 생각된다.

## 참고문헌

1. Rhee JK. Advanced veterinary parasitology. 1987 1st ed. p. 234-239 Daehan printing and publishing Co., Seoul.
2. 김자숙, 김선홍, 이태욱 등. 진도견의 심장사상충 감염율 조사. J Korean Vet Med Assoc 1985; 21(8): 497-499.
3. 이상목, 최석화, 이현하 등. 국내 사육견의 심장사상충 실태조사. J Korean Vet Med Assoc 1992 Jun; 28(6): 344-347.
4. 이재구. 아세톤 집충법에 의한 전주지방축견의 견사상충 감염율 조사. Korean J Vet Res 1966; 6(1): 42-44.
5. Rhee JK and Rim BM. Observation on the infection rate of helminths in Korean autochthonal dogs with special referense to the viewpoint of public health. 1970 Chonbuk Nat. Univ. 12: 27-38.
6. Rhee JK, Yang SS, Kim HC. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae in dogs of Korea. 1998 Korean J Parasitology 36(4): 235-239.
7. Lee JC, Lee CY, Shin SS *et al.* A survey of canine heartworm infections German shepherds in south Korea. Korean J Parasitology 1996 Dec; 34(4): 225-31. Korean.
8. Rawlings CA, Dawe DL, McCall JW *et al.* Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. 1982 JAVMA Jun; 180(1): 1323-1326.
9. Grieve RB, Glickman LT, Bater AK *et al.* Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: Examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. 1986 Am

- J Vet Res Feb; 47(2): 329-332.
10. Thilsted JP, Whorton J, Hibbs CM *et al.* Comparison of four serotests for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. 1987 Am J Vet Res May; 48(5): 837-841.
  11. Brunner CJ, Hendrix CM, Blagburn BL *et al.* Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. 1988 JAVMA May; 192(10): 1423-1427.
  12. McCall JW, McTier TL, William GR *et al.* Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs. Am J Vet Res 1996 Aug; 57(8): 1189-92.
  13. Culpepper J, Grive RB, Friedman L *et al.* Molecular characterization of a *Dirofilaria immitis* cDNA encoding a highly immunoreactive antigen. Mol Biochem Parasitol 1992 Aug; 54(1): 51-62.
  14. Scoles GA and Kambhampati S. Polymerase chain reaction-based method for the detection of canine heartworm(Filarioidea : Onchocercidae) in mosquitoes (Diptera : Culicidae) and vertebrate hosts. J Med Entomol 1995 Nov; 32(6): 864-9.
  15. Knott J. A method for making microfilaria surveys on day blood. 1939 Tran. Ray. Soc Trop Med Hyg 33: 191-196.