



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 심장사상충에 감염된  
유기견의 혈액에서 울바키아 검출

제주대학교 대학원

수의학과

박정훈

2016년 8월

제주도내 심장사상충에 감염된  
유기견의 혈액에서 올바키아 검출

지도교수 윤 영 민

박 정 훈

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2016년 6월

박정훈의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_(인)

위 원 \_\_\_\_\_(인)

위 원 \_\_\_\_\_(인)

제주대학교 대학원

2016년 6월

## Abstract

# Detection of *Wolbachia* DNA in blood from shelter dogs infected with *Dirofilalia immitis* in Jeju

Junghoon Park

(Supervised by Prof. YoungMin Yun)

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

*Dirofilalia immitis* is a mosquito-borne hemoparasite of dogs that enzootic throughout in tropical to temperate region. It harbors a symbiotic intracellular bacterium which is *Wolbachia pipientis* that conduct as an important role in its biology, and causative agent of inflammatory reaction of dirofilariasis. In this study, we try to investigate the prevalence of *Dirofilalia immitis*, detection of *Wolbachia* DNA in blood and Genetic analysis of *Wolbachia* from shelter dogs in Jeju. From 2013 to 2016, the blood samples from 5,460 shelter dogs were collected. Observed annual prevalence of *Dirofilalia immitis* was 9.53–17.9%, and it was confirmed that spring (12.6%–16.2%) shows a high infection rate during 3 years. PCR assay was performed to detect *Wolbachia* DNA from blood in 70 *Dirofilalia immitis* infected shelter dogs, 23(32.8%) dogs were infected with *Wolbachia*. By sequencing analysis, It showed 100% identity between *Wolbachia pipientis* in Jeju

and *Wolbachia pipientis* in USA. These results indicate that *Wolbachia* is also confirmed in *Dirofilalia immitis* in Jeju island and the prevalence of *Dirofilalia immitis* has increased in Jeju over the past 3 years. Small animal practitioners in this area should control the *Wolbachia* during their heartworm treatment process.

---

**Key words** : *Wolbachia*, *Dirofilaria immitis*, Shelter dog, Jeju

# 목 차

## 영 문 초 록

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법		4
III. 결	과	8
IV. 고	찰	13
V. 결	론	16
VI. 참 고 문 헌		17

## I. 서 론

심장사상충(*Dirofilaria immitis*)은 모기를 매개로 전파되며(Figure 1), 전세계적으로 열대, 아열대, 몇몇 온대지역에 분포하는 혈액 내 기생하는 선충이다(35). 심장사상충 성충은 동물의 우심실에서 머무르면서, 복수, 부종, 부정맥, 빈맥과 같은 다양한 병리적 상태를 유발하며, 사망에 이르게 하기도 한다(27). 국내 개의 심장사상충 감염에 대한 연구로는 최초로 1962년 진주지역 조사에서 21.0% 보고된 이래(1), 2003년 대구에서 23.6%(24), 2007년 광주에서 12.4%(19), 2010년 울산에서 7.2%(31) 감염이 보고되었다. 특히 우리나라 최남단의 제주지역은 심장사상충 항원검사서 38.6%로, 전국 평균인 28.3%보다 높았고, 타 지역보다도 더 높은 감염률을 보였다(22, 34). 현재 심장사상충의 치료에는 macrocyclic lactone제제의 ivermectin 등이 사용되고 있으며, 자충과 성충치료에는 효과적이지만 완전하게 성충을 제거하는 데 약 36개월가량이 소요되는 것으로 알려져 있다. 그래서 성충감염 치료를 위해서 melarsomine (Immiticide®)이 있지만 투약 후 종종 통증과 심한 심혈관계 혈색전증을 일으키는 부작용이 보고되어 있다(26).

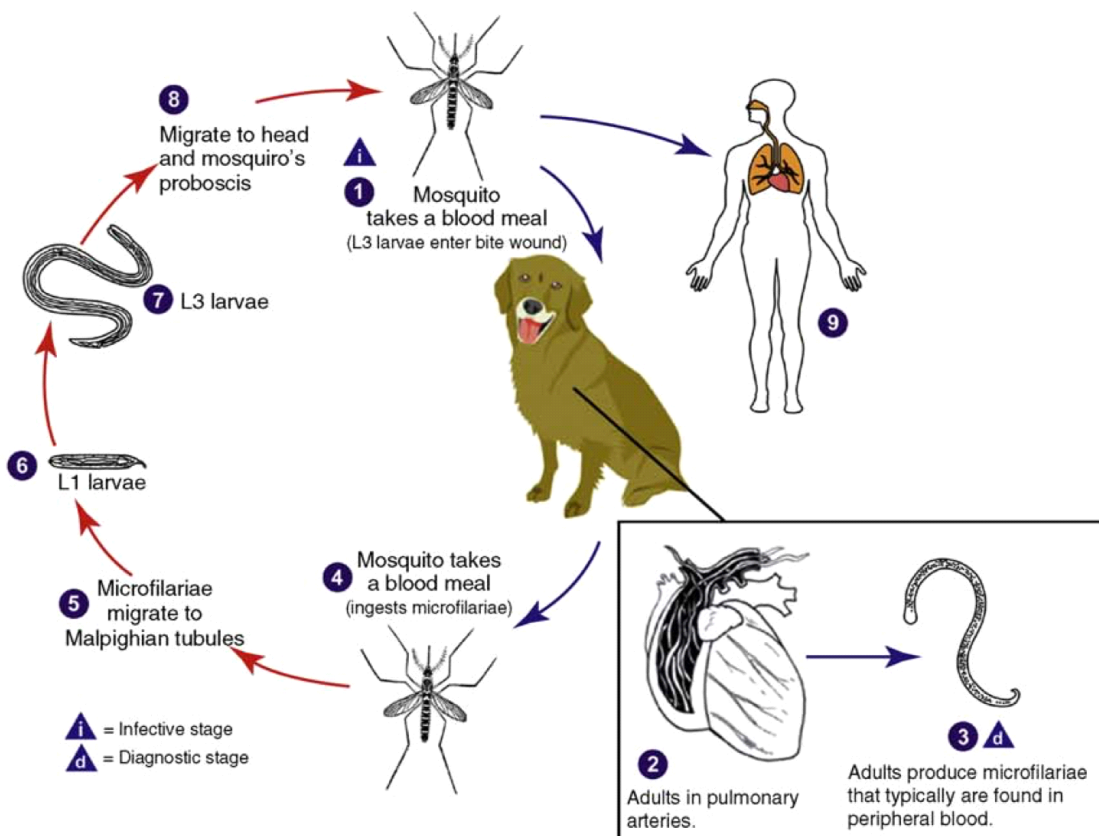
최근 연구에서 *Wolbachia pipientis*는 *Wolbachia* 속에 속하는 유일한 종으로, class Alphaprobacteria, family Anaplasmataceae에 속하는 세포내 기생성의 그람음성 세균으로 구분하고 있다(29). 현재 전세계적으로 절지동물과 선충류에서 20-80%의 감염이 보고되었다(6, 14, 20). *Wolbachia*를 면역화학법과 전자현미경으로 관찰한 결과, 심장사상충 암수 성충의 피하외측다발(Hypodermal lateral cords), 심장사상충 암컷 성충의 생식기계 그리고 자충과 난모세포에서 발견됨으로써, 절지동물과 선충류에서 수직 감염됨을 알 수 있다(38, 41). 심장사상충과 공생관계의 *Wolbachia*는 항산화효소를 생산하여 심장사상충에 항산화작용을 제공하여 생존성과 활동성을 지원하고, 심장사상충 암컷의 생식기계에서 배아발생과 수정 및 생식능에 영향을 주는 것으로 밝혀져 있다(3, 13).

심장사상충 세포내 *Wolbachia*는 여러 가지 단백질을 분비하여 포유류 숙주인 개에서 직접적인 염증 및 면역반응을 일으킬 뿐만 아니라(9), 심장사상충내에 *Wolbachia* 감염 정도에 따라 사상충의 생존력과, 사상충의 숙주내 활동성을 좌우함으로써 임상적으로 중요한 의미를 가진다(2). 심장사상충 감염견의 치료과정에서 폐사한 성충이 직접적으로 포유류 숙주의 폐에서 과도한 면역반응을 유발하는 것으로 밝혀졌으며, 이 과정에서 많은 부분이 심장사상충 분해과정에서 방출된 *Wolbachia* 항원에 의해 기인한 것으로 증명되었다(28). 그람음성세균인 *Wolbachia*로부터 방출되는 면역유발 원인물질로는 LPS(Lipopolysaccharides) 유사물질로, *Brugia malayi* 감염 쥐로부터 투구계의 순환혈액세포추출물과 endotoxin간의 반응을 보는 positive Limulus amoebocyte lysate test를 이용하여 확인되었다(39). 또한 *onchocerca* worms에서 포유류 숙주의 호중구 축적과 호중구의 주화성이 *Wolbachia* 추출물로부터 기인된다는 것이 확인되었다(7).

이러한 *Wolbachia*의 병태생리학적 기전이 보고됨에 따라 울바키아를 표적으로 한 항생제제들에 대한 연구가 보고되고 있으며, tetracycline계열의 doxycycline을 투여하여 *Wolbachia*를 관리하는 것이 포유류숙주의 사상충감염에 의해 유발되는 병적상태를 완화하는 것으로 보고되고 있다(4, 5, 8, 12, 16, 32). *Wolbachia*의 hsp60(heat shock protein 60)을 면역화학법과 전자현미경을 통하여 *Wolbachia*가 tetracycline 투여함에 따라 제거되는 것을 확인하였고, 이러한 작용은 사상충의 성장을 억제하고, 성충의 번식능력을 감소시키는 것으로 보고되었다. 반면 tetracycline 치료는 *Wolbachia*가 기생하지 않는 *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia pahangi* 등에서는 포유류 숙주 체내에서 염증반응을 감소시키는데 효과가 없는 것으로 보고되었다(25). 또한 항생제 투여를 통하여 L3 발육성장의 저해가 확인되었으며, 성충의 성장에도 저해효과가 있는 것으로 보고되었다(15, 36).

이에 본 연구에서는 제주도내 유기견을 대상으로 심장사상충 감염율을 연도별 및 계절별 조사를 실시하였고, 심장사상충과 공생관계에 있는 *Wolbachia*에 대하여 혈액을 통한 검출 및 유전학적 분석을 실시하였다.





**Figure 1.** This figure is *Dirofilaria immitis* life cycle produced by the US Centers for Disease Control and Prevention .

([http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis_il.htm))

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험은 2013년부터 2016년 5월까지 제주특별자치도 동물보호센터에 입소된 유기견을 대상으로 실험하였다(Table 1, Table 2). 2013년부터 2015년까지 입소된 5,069마리의 유기견에 대한 심장사상충 항원검사 결과를 제공받았으며, 2016년 입소된 391마리의 유기견을 대상으로 심장사상충과 *Wolbachia* 감염에 대한 전수조사를 실시하였다. 실험동물에 대한 선정 및 실험방법은 제주대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인받아 진행되었다(접수번호 2016-0014).

**Table 1.** The Number of dogs used in *Dirofilaria immitis* prevalence study

Year	total	male	female
2013	1,479	796	683
2014	1,767	925	842
2015	1,823	982	841
Total	5,069	2,703	2,366

**Table 2.** The number of dogs used in *Wolbachia* and *Dirofilaria immitis* prevalence study

Year	total	male	female
2016	391	204	187

## 2. 시료채취

혈액은 요측피정맥(cephalic vein) 또는 목정맥(jugular vein)을 통해서 0.5ml 채취하였으며, 채취된 혈액은 EDTA-3K 처리 튜브에 넣어 항응고처리하였다. 채혈 즉시 심장사상충 항원 키트검사로 감염여부를 확인하였고, 나머지 혈액은 혈액검사와 *Wolbachia*를 검출을 위한 PCR 검사 전까지 냉장(4℃) 보관하였다.

## 3. 혈액검사

채취한 혈액 시료 중 응고, 용혈 및 변성이 없는 혈액 82개에 대하여 혈액검사를 실시하였다. 완전혈구계산(CBC)은 EDTA-3K 항응고 처리된 전혈로 자동화계수기(HEMAVET 950FS, Drew Scientific, UK)를 이용하여 검사하였다. 완전혈구계산으로 RBC (red blood cell), Hb (hemoglobin), HCT (hematocrit) 및 WBC (white blood cell) 그리고 백혈구 감별계산으로 NE (Neutrophil), LY (Lymphocyte), MO (Monocyte)와 EO (Eosinophil)를 측정하였다. 검사결과는 *D. immitis* 단일감염군, *D. immitis*와 *Wolbachia* 복합감염군 그리고 모두 감염되지 않은 음성 대조군으로 구분하여 분석하였다.

## 4. 심장사상충 항원 검사

심장사상충 항원검사는 Bionote社(Korea)의 심장사상충 항원진단키트를 이용하였다(Figure 2).



**Figure 2.** Assay kit result of the sample indicating *Dirofilaria immitis* antigen positive (C; Control line, T; Test line)

## 5. DNA 추출

혈액으로부터 DNA는 QIAamp DNA blood minikit (Qiagen, Milan, Italy)를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA의 농도는 50–100 ng/ $\mu$ l로 조정하여 실험전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

## 6. PCR

중합효소연쇄반응 기존 연구(33)에서 제시한 *Wolbachia ftsZ* 유전자를 표적으로 디자인된 프라이머를 사용하였으며(Table 3), 다음과 같은 PCR 조건에서 증폭을 실시하였다(Table 4). PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 100 bp DNA ladder (Enzymomics, Korea)와 함께 110V에서 25분간 전기영동하여 확인하였다.

**Table 3.** Primer set used for the detection of the *Wolbachia ftsZ* gene

Primer	Sequences (5'→3')	Size (bp)	Gene
<i>ftsZ</i> gene_F	5-ATA ACA GCA GGA ATG GGT GGT-3	550	<i>ftsZ</i> gene
<i>ftsZ</i> gene_R	5-TCA CGC ACT CTA TTT GCT GCA-3		

**Table 4.** PCR condition for detection of *Wolbachia ftsZ* gene

Primer set		℃	Time	Cycle
<i>ftsZ</i> gene_F	Initial denaturation	94	2min	40
	Denaturation	94	30sec	
<i>ftsZ</i> gene_R	Annealing	65	1min	
	Extension	72	30sec	
	Final Extension	72	10min	

## 7. 염기서열 및 계통 분석

전기영동에서 확인된 PCR 밴드(550bp) 시료에 대해서 Solgent社(Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석 및 유전적 계통분석(phlygenetic analysis)을 실시하였다.

## 8. 통계분석

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

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 연도별 심장사상충 감염율

제주지역 유기견 5,460마리에 대해서 *D. immitis* 항원 검사를 실시한 결과, 2013년은 1,479마리중 141마리(9.5%), 2014년은 1,767마리중 226마리(12.8%), 2015년은 1,823마리중 231마리(12.7%), 2016년은 조사기간인 3월부터 5월 사이 391마리중 70마리(17.9%) 감염을 나타냈으며, 총 5,460마리중 668마리 *D. immitis* 항원 양성(12.2%)을 나타내었다(Table 5).

**Table 5.** Prevalence of *Dirofilalia immitis* infection of shelter dogs from 2013 to 2016 in Jeju

Year	Total samples	<i>Dirofilalia immitis</i> positive	Frequency
2013	1,479	141	9.5 %
2014	1,767	226	12.8 %
2015	1,823	231	12.7 %
2016 (Mar-May)	391	70	17.9 %
Total	5,460	668	12.2 %

## 2. 계절별 심장사상충 감염율

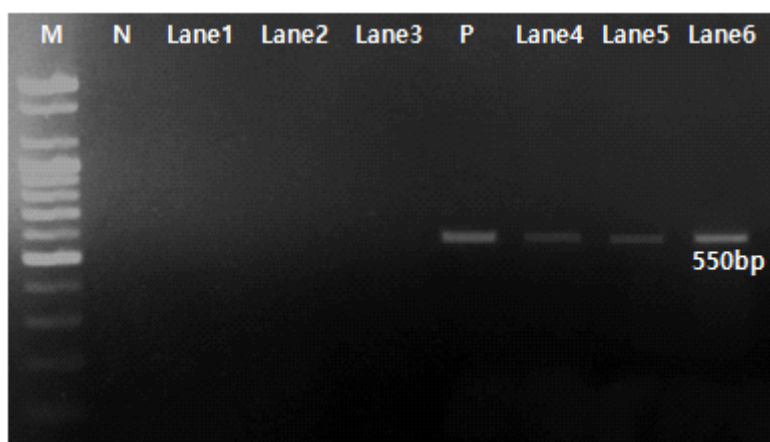
심장사상충 감염을 계절별로 비교 분석한 결과 매년 봄철(12.6%–16.2%)이 다소 높은 경향을 보였으며, 겨울철(5.6%–8.5%)에 다소 낮은 경향을 나타내었다(Table 6).

**Table 6.** Seasonal Prevalence of *Dirofilalia immitis* infection from 2013 to 2016 in Jeju

Year	Infection Rate (%)			
	Spring (3–5)	Summer (6–8)	Fall (9–11)	Winter (12–2)
2013	12.6% (46/365)	8.8% (37/422)	9.5% (34/357)	7.2% (24/335)
2014	16.2% (68/420)	14.8% (76/512)	13.3% (61/457)	5.6% (21/378)
2015	15.8% (70/444)	14.3% (76/530)	11.2% (52/463)	8.5% (33/386)
Total	15.0% (184/1,229)	12.9% (189/1,464)	11.5% (147/1,277)	7.1% (78/1,099)

## 3. 혈액에서 *Wolbachia* DNA 검출율

*D. immitis* 항원검사결과 양성인 혈액 70개에서 추출한 DNA를 PCR 증폭 후 전기영동한 결과, *Wolbachia* 양성 혈액에서 양성 대조군과 동일한 위치인 550bp에서 밴드를 확인하였고(Figure 3), 이를 토대로 23개 시료에서 32.8%의 검출율을 나타내었다. 대조실험으로 *D. immitis* 항원검사결과 음성인 20개의 혈액을 같은 조건에서 PCR 한 결과 *Wolbachia pipientis*는 모두 음성으로 확인되었다(Table 7).



**Figure 3.** The Result of *ftsZ* gene amplification of *Wolbachia pipientis* on the non-infected *Dirofilalia immitis* and coinfecting *Wolbachia* and *Dirofilalia immitis* blood samples (M : 100bp ladder marker; N : Negative Control; Lane 1-3 : blood sample non-infected *Wolbachia* and *Dirofilalia immitis* P : Positive Control; Lane 4-6 : blood sample coinfecting *Wolbachia* and *Dirofilalia immitis*)

**Table 7.** Prevalance of *Wolbachia pipientis* detection on the *Dirofilalia immitis* positive and negative blood samples

	DI (+) (n=70)		DI (-) (n=20)	
	Wol(+)	Wol(-)	Wol(+)	Wol(-)
Heads	23	47	0	20
Prevalance	32.8 %		0 %	

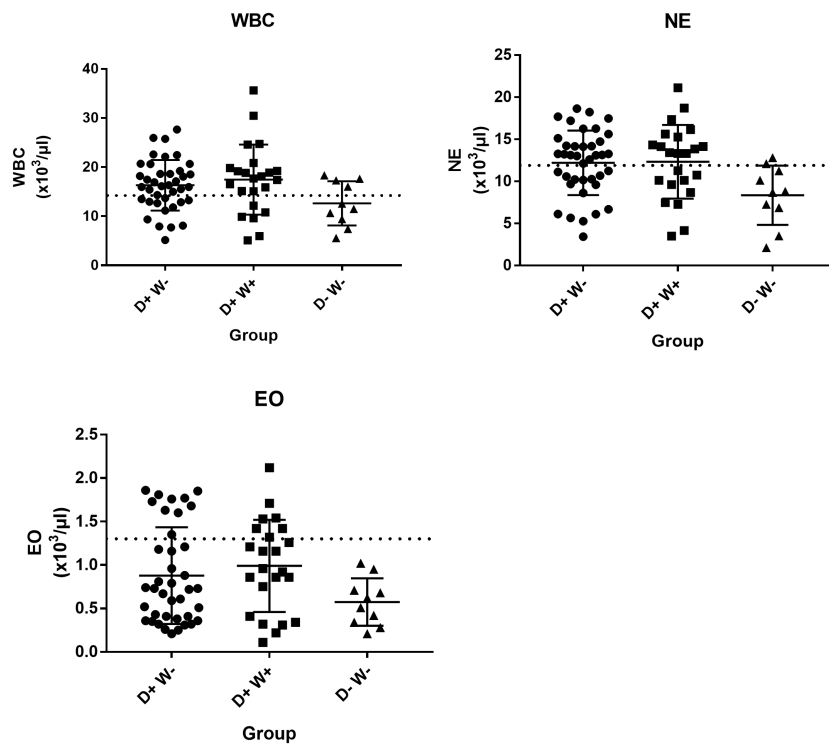
DI(+) : *D. immitis* positive    DI(-) : *D. immitis* negative

Wol(+) : *Wolbachia pipientis* positive    Wol(-) : *Wolbachia pipientis* negative



#### 4. 감염에 따른 혈액학적 변화

391마리의 개의 혈액 중 손상된 혈액 및 충분한 혈액량이 확보되지 않은 개체를 제외하여, 82개의 혈액샘플을 선택하여 완전혈구계산을 실시하였다. 검사결과 *D. immitis*가 감염군에서 백혈구, 호중구와 호산구의 증가가 관찰되었으며, *D. immitis*와 *Wolbachia* 동시감염군에서 *D. immitis* 단독감염군보다 다소 높은 경향을 보였으나, 이에 대한 유의성은 없는 것으로 나타났다(Figure 4).



**Figure 4.** Scatter plot of cell count information about individual WBC, neutrophil and eosinophil. Each symbol represents an individual cell counts. the horizontal full line indicates the mean value and the vertical line indicates the standard deviation. horizontal dotted line shows a reference range of each cell counts.

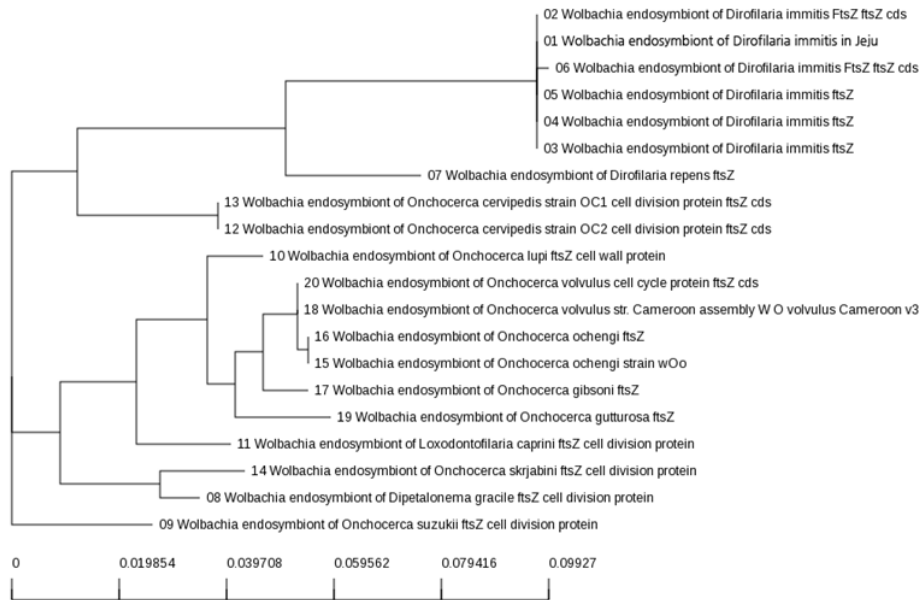
(D+: *Dirofilalia immitis* positive, D-: *Dirofilalia immitis* negative, W+: *Wolbachia* positive, W-: *Wolbachia* negative, WBC: white blood cell, NE: neutrophil, EO: eosinophil)

## 5. *Wolbachia pipientis* 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물로부터 염기서열분석을 한 결과 미국에서 보고된, *Wolbachia ftsZ* 유전자 (GenBank: AY523519.) 과 일치율=582/582 (100%) 유전적으로 동일함이 확인되어 *Wolbachia pipientis*임을 확인하였다.

## 6. 계통분석

*Wolbachia ftsZ* 유전자를 바탕으로 계통분석을 실시한 결과, 동일 숙주 내에서 유적전 차이는 거의 보이지 않았다(Figure 5).



**Figure 5.** Phylogenetic tree of *Wolbachia* endosymbiont of *D. immitis* in Jeju. There is a minimum nucleotide substitution among same nematode host *Wolbachia pipientis*.

## IV. 고 찰

기후변화에 따른 기온상승은 모기의 분포지역 및 활동기간을 증가시키고, 이러한 변화는 심장사상충증과 같은 모기매개성 질병의 전파와 유행기간에도 영향을 미치고 있다(10, 11). 모기 내에서 사상충 유충의 성장은 기온에 많은 영향을 받는다. 높은 기온에서 감염성 L3유충으로의 성숙기간이 비례적으로 짧아지는 것으로 나타났다(18). 제주도는 우리나라 최남단에 위치하고 있으며, 국내 어느 지역보다 기후변화에 따른 온도상승에 민감한 지역으로 모기매개성 질병의 변화를 감시하는 연구가 필요하다. 이번 연구에서 제주지역 유기견을 대상으로 2013년부터 2015년까지 심장사상충 감염율을 조사한 결과, 2013년 9.53%, 2014년 12.8%, 2015년 12.7%, 2016년 3월부터 5월 사이에 한 조사에서는 17.9%로 증가추이를 보이는 것으로 나타났다. 이란에서 계절에 따른 사상충감염 조사에서 봄철에 가장 높은 것으로 나타났는데(17), 제주지역에서도 3월부터 5월인 봄철에 2013년 11.8%, 2014년 15.8% 2015년 15.8%, 2016년 17.9%로 다소 높은 감염율의 경향을 보였고, 연도별로 봄철 감염율도 증가추세를 보이고 있다. 이러한 연구 결과는 제주도에서의 심장사상충의 임상적 중요성이 기후변화와 함께 증가하고 있음을 암시하는 것으로 보인다.

심장사상충 치료와 관리에 있어서, 공생생물인 *Wolbachia*를 표적으로 한 치료에 대한 연구들이 다양하게 보고되고 있다.(4, 12, 18) 개의 혈액샘플에서 추출한 DNA를 이용한 *Wolbachia*의 감염에 대한 조사로는 2010년 브라질에서 혈중 심장사상충 자충을 보이는 모든 개에서 100%(13/13) 검출율을 보고하였고(33), 2008년 국내 연구에서도 90%(36/40) 검출율을 확인하였으며(23), 거의 모든 *D. immitis* 감염개체는 *Wolbachia*에 감염되었다고 보고하고 있다. 이처럼 높은 검출율을 보이는 연구결과들과 대조적으로, 2013년 스페인에서 이뤄진 연구에서는 30.6%(15/49) 검출율을 보고하였으며(37), 2014년 포르투갈에서 진행한 연구에서도 40.6%(20/47) 검출율이 나타남으로써(21), 심장사상충 감염된 개의 혈액 중 일부에서만 *Wolbachia*가 검출된 것으로 보고하였다. 이번 제주

지역에서 *Wolbachia* 검출율은 32.8% (23/70)로 이와 유사한 양상을 보이고 있는 것으로 확인되었다. 이와 같은 검출율의 차이에 대한 의문으로부터 혈중 자충의 감염정도에 따른 *Wolbachia* 검출율에 대한 연구는 몇 차례에 걸쳐 이루어졌는데, 매우 적은수의 자충감염 혈액 시료를 1:100으로 계단 희석하여 검사한 결과에서 *Wolbachia* 감염견은 모두 양성인 나타났으며, 자충 없이 성충만 감염된 잠복 감염(occult infection)시에도 혈중에서 *Wolbachia*가 검출된 것으로 보고되었다(21, 23). 이러한 연구들을 바탕으로 혈중 *Wolbachia* 검출에 대한 상이한 결과의 원인으로 혈중 감염자충수 보다는 각 연구별 검사두수와 지역적 차이에 기인하는 것으로 보이며, 이에 혈액을 통한 검출율에 대한 연구는 다양한 지역에서 추가적으로 연구되어야 할 것으로 보인다. 또한 혈액시료에서 *Wolbachia* DNA 추출법은 아직 심장사상충의 성충을 균질화하여 *Wolbachia* DNA를 추출하는 것 보다 민감도가 낮은 것으로 보인다. 이전 연구에서 심장사상충 감염혈액에서 *Wolbachia* 검출율이 90%일 때 심장 내 성충시료에서 직접 추출한 DNA 시료에서 100% 검출율을 확인하였다(23). 혈액을 통한 *Wolbachia* 검사법은 임상에서 시료채취가 빠르고 용이하며, 검사의 접근성이 높고, 상대적으로 비침습적이라는 장점을 가지고 있지만 민감도에 있어서는 아직까지 한계점이 있는 것으로 사료되어, 그 원인규명과 개선을 위한 연구 또한 추가적으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

혈액검사 결과에서 *D. immitis* 감염된 두 군 모두에서 백혈구, 호중구 및 호산구 수치가 다소 높게 나타났으며, 림프구, 적혈구, 헤모글로빈, 헤마토크리트 수치는 모든 그룹에서 비슷한 수준으로 정상범위에 속하는 것으로 나타났다. *D. immitis*와 *Wolbachia* 동시감염군에서 *D. immitis* 단독감염군보다, 각 항목별로 조금 더 높은 수치를 보였다. 이와 같은 혈액검사 결과는 체내 염증반응이 진행되고 있음을 의미한다. 이전 *D. immitis* 감염시에 호산구 증가에 대한 연구만큼(30), 두드러진 호산구 증가가 나타나지는 않았다. 추가적으로 혈액검사결과 *D. immitis*와 *Wolbachia* 이외에도 다양한 병원체의 복합감염과 보호소 입소과정에서 발생하는 스트레스 반응들이 검사결과에 영향을 미쳤을 가능성이 있다고 보여진다.

염기서열 분석 결과 미국에서 보고된, *Wolbachia ftsZ* 유전자 (GenBank: AY523519)와 100% 동일성을 보였기에 *Wolbachia pipientis*로 확진하였다. *Wolbachia*의 유전적 계통분석(phylogenetic analysis)에서 동일 선충류 숙주에서 *Wolbachia* 간 유전적 다양성은 미미하거나 없는 것으로 나타났다. 그러나 다른 선충류 숙주 간에는 뚜렷한 염기서열의 차이를 보였으며, 이와 같은 결과는 오랜 시간 수직감염을 기반으로 번식하는 *Wolbachia* 특성에 의한 결과로 사료된다(38). 현재 *Wolbachia*의 감염방식에 대해서는 절지동물에 기생하는 *Wolbachia* 경우에서 paracitoid에 의한 수평감염가능성에 대한 증거들이 제기되면서 다른 가능성도 논의되고 있다(40).

심장사상충 구제제로 사용하고 있는 merialsomine은 성충 제거에 뛰어난 효능을 가지고 있지만 몇 가지 부작용을 가지고 있다. 또한 심장사상충만을 구제하는 치료과정은 혈중으로 유리되는 *Wolbachia*의 분비물질로 인한 포유류 숙주내에 다양한 염증반응이 유발되는 문제점을 가지고 있다. 이에 *Wolbachia*를 표적으로 한 항생제 치료는 성충의 사멸과 함께 순환기계내에 방출되는 *Wolbachia*를 제거 관리함으로써 관련 염증유발 물질을 감소시키고 숙주를 보호할 수 있기에 앞으로 심장사상충증 치료시에 추가적 치료제로 선택해야하며 적절한 항생제 선택과 농도와 기간에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

제주도내 유기견을 대상으로 심장사상충의 감염율과 심장사상충 감염혈액에서 *Wolbachia*의 검출 및 염기서열 분석을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제주도내 유기견에서 심장사상충은 2013년부터 2016년까지 9.53-17.9% 감염율을 보였으며, 또한 봄철이 12.6%-16.2%로 다른 계절에 비해 다소 높은 감염율을, 겨울철이 5.6%-8.5%로 다소 낮은 감염율을 보였다.
2. 심장사상충이 감염된 70마리 개체의 혈액에서 *Wolbachia ftsZ* 유전자를 바탕으로 PCR 증폭 확인한 결과 23마리(32.8%)에서 *Wolbachia pipientis*가 확인되었다.
3. 염기서열 분석에서 제주도내 *Wolbachia pipientis*는 미국에서 보고된 *Wolbachia pipientis*와 100% 동일한 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서 제주도내 유기견에서의 심장사상충의 감염율과 혈액을 통한 울바키아의 검출율 및 유전학적 특성이 확인되었다. 이를 통해 국내에서도 심장사상충증 치료시 *wolbachia* 감염에 대한 관리가 필요한 것으로 사료된다.

## VI. 참고 문헌

1. 박응복, 이희성. 진주지방 축견의 사상충 조사. 진주농대 연구보고 1962; 1: 34-58.
2. Bandi C, Dunn AM, Hurst GDD, Rigaud T. Inherited microorganisms sex-specific virulence and reproductive parasitism. Trends Parasitol 2001; 17: 88-94.
3. Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int J Parasitol 1999; 29: 357-364.
4. Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi C, Kramer L, Genchi C, Bandi C, Genchi M, Sacchi L, McCall JW. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. Int J Parasitol 2008; 38: 1401-1410.
5. Bendas A, Paiva JP, Rossi MID, Knackfuss FB, Silvano DRB, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J, Labarthe NV. The use of doxycycline in microfilaremic *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) naturally infected dogs. Int J Appl Res Vet Med 2008; 6: 55-59.
6. Bordenstein SR, Fitch DH, Werren JH. Absence of *Wolbachia* in nonfilariid nematodes. J Nematol 2003; 35: 266-270.
7. Brattig NW, Büttner DW, Hoerauf A. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. Microbes Infect 2001; 3: 439-446.
8. Debrah AY, Mand S, Marfo-Debrekyei Y, Batsa L, Parr K, Buttner M, Adjei O, Buttner D, Hoerauf A. Macrophilicidal effect of 4 weeks of treatment with doxycycline on *Wuchereria bancrofti*. Trop Med Int Health 2007; 12: 1433-1441.
9. Duke BO. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. Trop Med Parasitol 1993; 44: 61-68.
10. Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. Vet Parasitol 2009; 163: 286-292.
11. Genchi C, Mortarino M, Rinaldi L, Cringoli G, Traldi G, Genchi M. Changing climate and changing vector-borne disease distribution the example of *Dirofilaria* in Europe. Vet Parasitol 2011; 176: 295-299.

12. Grandi G, Quintavalla C, Mavropoulou A, Genchi M, Gnudi G, Bertoni G, Kramer L. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Vet Parasitol* 2010; 169: 347-351.
13. Henkle-Duhrsen K, Eckelt VH, Wildenburg G, Blaxter M, Walter RD. Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 96: 69-81.
14. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 281: 215-220.
15. Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Dührsen K, Blaxter ML, Büttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 1999; 103: 11-18.
16. Hoerauf A, Mand S, Fischer K, Kruppa T, Marfo-Debrekyei Y, Debrah AY, Pfarr OA, Buttner DW. Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis—depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Med Microbiol Immun* 2003; 192: 211-216.
17. Javad K, Mohammad HR, Hassan B, Mohammad A, Baharak A. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with Review of disease distribution. *Iran J Parasitol* 2014; 9: 560-567.
18. Kalluri S, Gilruth P, Rogers D, Szczur M. Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog* 2007; 26: 1361-1371
19. Koh BRD, Na HM, Jang MS, Kim JY, Park SD. Investigation of canine dirofilariasis and brucellosis in free roaming dogs from public animal shelters in Gwangju area. *Korean J Vet Serv* 2007; 30: 155-164.
20. Kramer LH, Passeri B, Corona S, Simoncini L, Casiraghi M. Immunohistochemical/immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against *WSP* (*Wolbachia* surface



- protein). *Parasitol Res* 2003; 89: 381-386.
21. Landum M, Ferreira CC, Calado M, Alho AM, Mauricio IL, Meireles JS, de Carvalho LM, Cunha C, Belo S. Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Vet Parasitol* 2014; 29: 203-204.
  22. Lee JC, Lee CY, Shins SS, Lee CG. A survey of canine heart worm infections among German shepherds on South Korea. *Korean J Parasitology* 1996; 3: 225-231.
  23. Lee SA, Lee SG, Choi EJ, Hyun C. Prevalence of the endosymbiont *Wolbachia* in heartworms (*Dirofilaria immitis*). *Vet Rec* 2008; 163: 484-486.
  24. Lim HS, Cho YJ, Suh DK, Song DJ, Lee CS, Bae YC. A survey of the infection rate of *Dirofilaria immitis* of dogs in Daegu area. *Korean J Vet Serv* 2003; 26: 129-134.
  25. McCall JW, Jun JJ, Bandi C. *Wolbachia* and the anti-filarial properties of tetracycline. *Ital J Zool* 1999; 66: 7-10.
  26. McCall JW, Guerrero J, Roberts RE, Supakorndej N, Mansour AE, Dzimianski MT, McCall SD. Further evidence of clinical prophylactic, retro-active (reach-back) and adulticidal activity of monthly administrations of ivermectin (Heartgard Plus™) in dogs experimentally infected with heartworms. In: *Recent Advances in Heartworm Disease*. Batavia: Symposium '01 American Heartworm Society. 2001: 189-200.
  27. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology* 2008; 66: 193-285.
  28. McCall JW, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Dzimianski MT, Supakorndej P, Mansour AM, McCall SD, Supakorndej N, Grandi G, Carson B. Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implications. *Veterinary Parasitology* 2008; 158: 204-214.
  29. Merc H, Poinot D. Infection by *Wolbachia*: From passengers to residents. *C R Biol* 2009; 332: 284-297.
  30. Niwetpathomwat A, Kaewthamasorn M, Tiawsirisup S, Techangamsuwan S, Suvarnvibhaja S. 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 2007; 82: 364–369.
31. Park CE. Epidemiological survey on prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs of Ulsan area. Korean J Vet Serv 2010; 33: 157–165.
  32. Rossi MI, Paiva J, Bendas A, Mendes-de-Almeida F, Knackfuss F, Miranda M, Guerrero J, Fernandes O, Labarthe N., Effects of doxycycline on the endosymbiont *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)—Naturally infected dogs. Vet Parasitol, 2010; 174: 119–123.
  33. Rossi MI, Aguiar-Alves F, Santos S, Paiva J, Bendas A, Fernandes O, Labarthe N. Detection of *Wolbachia* DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. Exp Parasitol 2010; 126: 270–272.
  34. Song BS. Survey of canine heartworm(*Dirofilaria immitis*) infection on Jeju Island, Korea. Jeju National University Graduate school 2000.
  35. Soulsby EJJ. *Dirofilaria immitis* In Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7th ed. London: Bailliere Tindall. 1982: 307–312.
  36. Sucharit S, Viraboonchai S, Panavut N, Harinasuta C. Studies on the effects of tetracycline on *Brugiapahangi* infection in *Aedes togoi*. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 1978; 9: 55–59.
  37. Tabar MD, Altet L, Martınez V, Roura X. Wolbachia, filariae and Leishmania coinfection in dogs from a Mediterranean area. J Small Anim Pract 2013; 54: 174–178.
  38. Taylor MJ, Hoerauf AM. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol Today 1999; 15: 437–442.
  39. Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. J Exp Med 2000; 191: 1429–1436.
  40. Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulureau M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations. Mol Biol Evol 1999; 16: 1711–1723.
  41. Werren JH, O’Neill SL. The evolution of heritable symbionts. Oxford: Oxford University Press. 1997: 1–41.