

PCR을 이용한 개의 아나플라즈마병 진단과 장기간 치료

이숙진 · 이미진* · 채준석* · 나기정¹

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소
전북대학교 수의과대학*

Diagnosis of Anaplasmosis by PCR and Long Term Medication in a Dog

Sook-jin Lee, Mi-jin Lee*, Joon-seok Chae* and Ki-jeong Na¹

Dept. of Veterinary Laboratory Medicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Gaesindong, Cheongju 361-763, South Korea

*Dept. of Vet. Internal Medicine & Laboratory Medicine, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, South Korea

Abstract: A 4-year-old female Shunauzer dog was referred to the Veterinary Teaching Hospital of Chungbuk National University due to anorexia and depression. The dog had a history of regular walking on grass fields, weight loss, and hyperthermia (40.6°C). In the physical examination, lymph node enlargement was confirmed. Complete blood count result revealed leukocytosis and thrombocytopenia but there was no decreasing of red blood cells. On blood chemistry, serum ALP, GGT, CPK, and LDH were elevated. Abdominal radiograph showed splenomegaly. *Anaplasma platys* infection was suspected with inclusion body-like substances in platelets on blood smear. *Anaplasma platys* was confirmed by PCR. On the basis of laboratory examination, final diagnosis was anaplasmosis. Treatment was followed for 3 months with tetracycline and doxycycline. The patient was monitored every week during the treatment. The patient has recovered to normal condition without any clinical signs. We are going to emphasize the need of PCR technique in diagnosis and to report the possibility of long term treatment more than two months in rickettial disease.

Key words : PCR, *Anaplasma platys*, dog.

서 론

*Anaplasma(Ehrlichia) platys(A. platys)*는 brown dog tick(*Rhipicephalus sanguineus*)을 매개로 전파되는 리케치아의 한 종류이다. 이것은 특징적으로 혈소판에만 기생하여 infectious canine cyclic thrombocytopenia(ICCT)를 유발한다. 이러한 혈소판 감소증은 기생충혈증이 나타난 후 약 10~14일을 주기로 반복하여 나타난다¹³. 이 질병은 뚜렷한 임상증상을 나타내지는 않으나 심각한 경우 드물게 빈혈, 출혈 및 포도막염이 발생한다는 보고가 있으며 다른 리케치아성 질환과 병발될 경우 임상증상을 악화시키는 역할을 한다^{3,11}. 진단방법으로는 Giemsa 염색한 혈액도말 표본에서의 혈소판 내 호염기성 봉입체 확인 방법, 혈청 항체에 대한 indirect immunofluorescence assay^{4,10} 및 *A. platys* DNA를 증폭시켜 확인하는 PCR기법^{7,14,15} 등이 있다. 그러나 병원체가 혈소판내에서 주기적으로 발견되었다가 사라지는 경향이 있기 때문에 현미경상 봉입체를 확인하는 데에는 많은 노력과 시간이 소모되고 혈청검사는 리케치아로부터 회복된 후에도 오랫동안 양성으로 검사되는 경우가 있는 등 한계점을 가지고 있어 정확하고 신뢰할만한 진단방법이 요구된다. 치료에는

주로 tetracycline계통의 항생제가 사용되며 보통 경구제로써 tetracycline 22 mg/kg, TID, 14일 및 doxycycline 5 mg/kg, BID, 14일의 투여요법이 적용된다⁵. 치료효과는 질병의 경과나 환자의 면역상태 등에 따라 다르게 나타날 수 있다. 본 증례를 통해서 리케치아성 질병의 진단을 위한 PCR기법의 필요성과 치유되기까지 3개월 가량 장기간 투약된 경우를 보고하고자 한다.

증 례

병력, 임상증상 및 신체검사

체중 5 kg의 4년령 암컷 슈나우저가 내원 열흘 전부터 식욕부진을 보여 지역의 병원에서 4일간 수액과 항생제 치료를 받았으나 개선되지 않아 충북대학교 동물병원에 내원하였다. 환자는 실내에서 사육되었으며 정기적으로 풀밭이 있는 공원을 산책한 경험이 있었다. 신체검사상에서 40.6°C의 고체온증, 림프절 종대 그리고 체중감소 등이 확인되었다.

혈액검사 및 방사선 검사

CBC 검사에서 중등도의 백혈구 증가증(33,940/ μ l)과 경미한 혈소판 감소증(141×10^3 / μ l)이 있었으며 빈혈소견은 보이지 않았다. 혈액화학검사상에서 ALP, GGT, LDH 및 CPK가 증가 되었고 방사선 검사에서는 비장 종대가 확인되었다. 내

¹Corresponding author.
E-mail : sigol@cbnu.ac.kr

원 당시 혈액 도말검사에서는 이상소견이 보이지 않았으나 내원 3일 후 Wright-Giemsa 염색 혈액도말상에서 혈소판이 많이 응집되어 있으면서 내부에 봉입체와 유사한 물체가 관찰되어 *A. platys* 감염을 의심하였다(Fig 1). 적혈구와 백혈구에서는 봉입체가 관찰되지 않았다.

PCR 검사

EDTA-2K로 처리한 전혈 시료를 DNeasy blood kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 추출한 DNA를 이용하여 *A. platys*에 대한 PCR을 실시하였다. *A. platys* 대한 PCR은 16S rRNA를 표적으로 하는 Forward primer (5'-gat ttt tgt cgt agc ttg cta tg-3')와 Reverse primer(5'-tag cac tca tcg ttt aca gc-3')를 사용하였으며 PCR product의 크기는 678 bp이었다. 초기의 denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 54°C에서 30초, 그리고 extension을 72°C에서 90초로 하여 전체 34회 반복하였다. 마지막으로 extension을 72°C에서 5분간 하였다^{6,16}. PCR product는 ethidium bromide로 염색하여 2% agarose gel에서 전기영동을 한 다음에 Gel Doc 2000 (Bio Rad, USA)을 이용하여 영상을 얻었다. 전기영동한 결과는 Fig 2와 같이 나타났다.

진 단

내원시 보인 임상증상 및 검사결과로 원인미정의 감염증으로 잠정진단을 내렸으나 그 후에 혈액의 PCR 검사와 혈액도말 검사 결과를 종합하여 *A. platys* 감염에 의한 아나플라즈마병으로 진단하였다.

치료 및 경과

장기간의 식욕부진이 있었으므로 5% dextrose-lactated Ringer's solution(하트만-디액®, CJ, 한국)을 IV하면서 2일간 입원처치 하였다. 백혈구 증가증과 체온상승으로 감염이 의심되어 입원하는 동안 ampicillin/sulbactam(암피박탐®, 건일

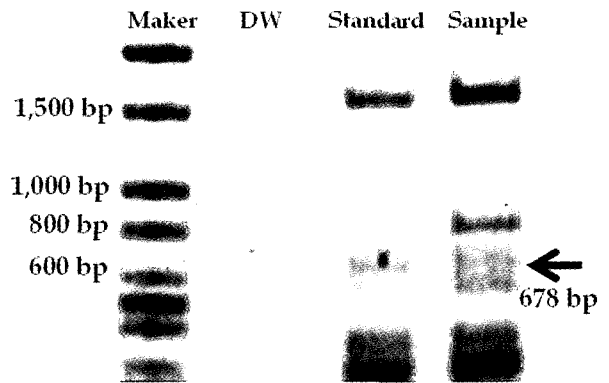


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products by single amplification with *Anaplasma platys* specific primers. The lanes were Maker (DNA 100 bp ladder), DW (distilled water), Standard (positive control), and sample (patient DNA). A 678 bp PCR product of *Anaplasma platys* (arrow) was visualized but not clear.

제약, 한국)을 20 mg/kg 용량으로 TID로 IV하고, 체온을 내려주기 위해 입원해 있는 동안 flunixin meglumine(Fluximine®, BOMAC Lab, NewZealand) 1 mg/kg을 SID로 IV하였다. 이후 혈액검사와 PCR 검사를 통해서 anaplasmosis로 진단됨에 따라 내원 1주일째부터 tetracycline(테라 사이클린®, 종근당, 한국) 20 mg/kg을 TID, PO로 투여하고, 2주째에는 지속적인 투약처방과 함께 퇴원을 하여 일주일마다 내원하여 치료경과를 관찰하였다. 내원시에는 체온을 측정하고, CBC, 혈액도말검사 등을 실시하였다(Fig 3). Tetracycline 투여 39일째까지 고체온증 및 식욕부진 증상이 호전되지 않았으나 백혈구 수치는 점점 감소하여 정상범위로 돌아왔다. 혈소판 수치는 치료 이후 정상범위 내에서 증가와 감소를 반복하였다. 그 후 항생제를 doxycycline(독시사이클린 하이클레이트®, 한영제약, 한국) 5 mg/kg을 BID, PO로 바꾸어 처방하였다. 2주 후에 내원하여 보호자는 증상의 호전과 악화가 반복됨을 호소하고 환자를 기증하게 되었다. 본 동물병원에서 추가적으로 20여일간 doxycycline을 투약한 후 임상증상이 소실되고

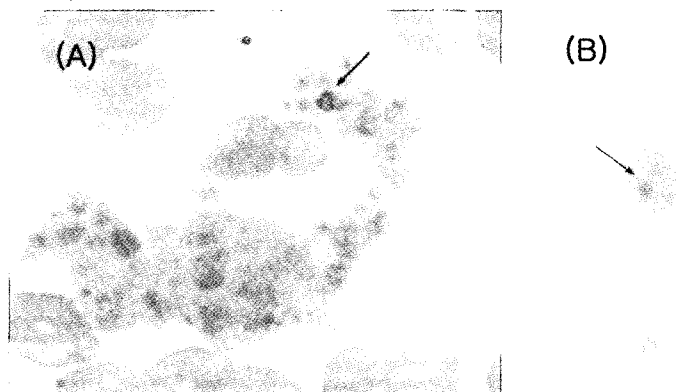


Fig 1. Peripheral blood smear from a dog with infectious canine cyclic thrombocytopenia. (A) Three round inclusion body-like substances (✓) within one of clumped platelets are seen (Wright-Giemsa stain, 1000x). (B) Activated giant platelet including one inclusion body (✓) (Giemsa stain, 1000x).

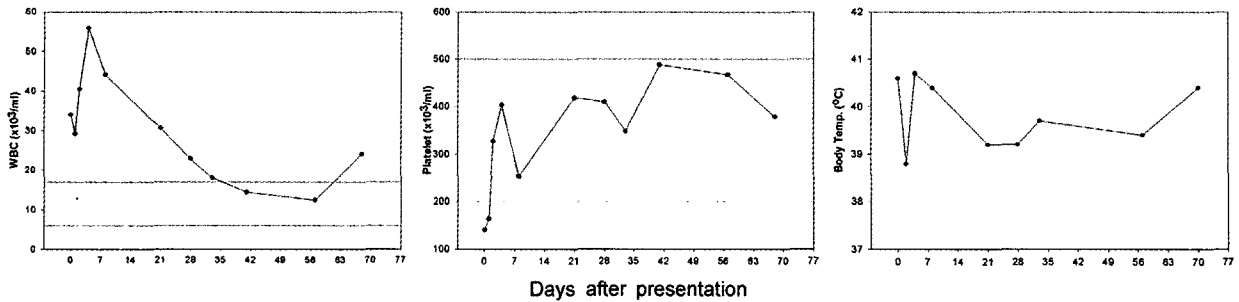


Fig 3. Changes of WBC levels, platelets levels, and body temperature of patient from the day of presentation to hospital. Dotted line indicated reference ranges.

활력을 찾게 되어 투약을 중지하였다. 초기 내원 이후 약 11개월째에 *A. platys*에 대한 PCR검사가 음성의 결과가 나와서 완치되었음을 확인하였다.

고 찰

개에서 발병되는 Ehrlichiosis의 주요 원인체는 *Ehrlichia canis*(*E. canis*)로 급성감염시 발열, 식욕부진, lymphadenopathy 등의 임상증상을 나타내고 만성으로 진행되면서 혈액 검사상 특징적으로 전반적인 혈구세포의 심각한 감소증을 나타내며 출혈양상을 보이는 것으로 알려져 있다⁵. 본래 *Ehrlichia*종에 포함되어 *Ehrlichia platys*로 불렸던 *A. platys*는 최근 유전자 분석을 통해 *Anaplasma*종으로 재분류되었다⁹. *E. canis*와는 달리 이것은 체온상승을 유발하지 않으며 혈구 감소증이 혈소판에 국한되어 있다는 차이점이 있다¹³. 그러나 본 증례의 환자는 지속적인 고열과 식욕부진 등 *E. canis*의 급성 감염증상과 유사한 임상증상을 나타냈다. 그리고 백혈구 수치가 장기간 증가되었던 것 또한 *E. canis* 및 *A. platys* 감염과 다른 양상이었다. 이것으로 보아 *A. platys* 감염에 따른 이차적인 감염증 또는 *E. canis*와의 혼합 감염을 생각해 볼 수 있었다. 그러나 PCR 검사에 의해 *A. platys*로 확진되었음을 고려할 때 이차감염에 의한 증상들로 판단된다. 한 연구자는 *A. platys*를 인위적으로 감염시키거나 자연감염이 있는 개에서 원인체를 전자현미경으로 관찰하는 실험에서 감염된 개들이 나타낸 증상들은 감염 정도에 따라서 발열이 없을 수도 있으며, 혈소판의 감소도 다양하게 나타남을 보고하였다². 혈소판 수치의 경우 내원 2일째까지는 경미하게 감소되었으나 그 후 정상 범위내에서 증가와 감소를 반복하여 *A. platys* 감염의 특징인 심각한 혈소판 감소증 ($20\sim50 \times 10^3/\mu\text{l}$) 또한 나타나지 않았다. 이렇게 본 증례의 환자는 *A. platys* 감염의 특징적인 임상증상이나 혈액학적 소견을 보이지 않았음에도 불구하고 혈액도말상에서 혈소판내에 봉입체처럼 보이는 물체가 관찰되어 처음 이 질환을 의심하게 되었다. 그러나 혈소판내 정상적으로 존재하는 과립들이 봉입체처럼 보일 수 있으며 *A. platys*가 이렇게 봉입체로 관찰되는 기간 또한 주기적으로 나타나기 때문에¹³ 혈소판내 봉입체로 *A. platys* 감염을 확진하는 것은 정확한 방법

이 될 수 없다. 혈소판내 봉입체를 전자현미경으로 확인하는 방법도 사용되었으나¹⁵ 이것 역시 봉입체 관찰이 어려운 시점이 있다는 한계를 가지고 있다. 혈청의 항체로써 검사하는 방법의 경우, 항체가 생성 및 소멸 시점이 검사에 영향을 미칠 수 있기 때문에 정확한 검사방법이 될 수 없다. 그러므로 정확한 진단을 위해서는 혈액내 *A. platys* DNA를 증폭시켜 확인하는 방법인 PCR기법이 필요하다. 리케치아성 질병의 원인체들은 서로 다른 16S rRNA를 가지고 있으므로 이러한 교차반응 없이 민감하게 사용될 수 있다. 본 증례 보고에서도 16S rRNA에 대한 PCR을 실시하여 진단을 하였다. PCR을 통한 확진 이후의 치료는 *A. platys*를 중점 치료하였다.

Tetracycline계통의 항생제가 대부분의 원충성 질환의 치료제로 사용되고 있으며, 그 중에서 doxycycline은 부작용이 덜하고 안전역이 넓어 널리 사용된다. *E. canis* 급성감염의 경우 투약 24~48시간 후에 바로 치료효과가 나타나며 준임상형의 경우 6주까지 투약에도 완치되지 않았다고 하였다¹². *A. platys* 치료에 보통 14일간 투약이 적용되고 있으나⁵ 급성 및 만성감염시의 투약기간에 대한 보고는 없었다. 실험적으로 *A. platys*를 감염시켜 tetracycline 및 doxycycline으로 치료하면서 혈소판수치, 혈액도말 및 혈액의 PCR 검사를 실시한 결과 두 가지 모두 투여 6일째 회복되었고 doxycycline으로 치료한 경우 tetracycline과 달리 재발되지 않는 결과를 보였으며 혈액도말과 PCR 검사가 치료효과 모니터링에 효과적이라고 하였다⁸. 본 증례에서는 tetracycline과 doxycycline을 각각 40일 가량씩 총 80여 일간 장기간 투약하여 임상증상이 소실되는 시점에서 투약을 중지하였고, 이의 확인을 위해 혈액의 PCR 검사를 실시하여 *A. platys* 음성을 확인하였다. 이러한 혈액의 PCR 검사기법은 리케치아성 질환의 진단뿐 아니라 투약시의 모니터링에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

결 론

특별한 임상증상을 나타내지 않으면서 심각한 주기적 혈소판감소증을 유발하는 *A. platys* 감염증과 달리 고체온, 식욕부진, 체중감소의 증상 및 백혈구 증가증을 보이는 4년령

의 슈나우저를 혈액도말 및 혈액의 PCR 검사를 통해 *A. platys* 감염증으로 진단하였다. Tetracycline과 doxycycline을 80여 일간 장기간 투약하여 임상증상이 소실되었으며 PCR 검사를 통해 완치되었음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고 문헌

- Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, Tzianabos T, Greene CR, Olson JG, Fishbein DB, Olsen-Rasmussen M, Holloway BP, George EH, Azad AF. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 29: 2228-2233.
- Arraga-Alvarado C, Palmar M, Parra M, Salas P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural study of experimental and natural infections. *Vet Pathol* 2003; 40: 149-156.
- Baker DC, Gaunt SD, Babin SS. Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1014-1016.
- Baker DC, Simpson SD, Gaunt SD, Corstvet RE. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. *Vet Pathol* 1987; 24: 449-453.
- Breitschwerdt EB. The Rickettsioses. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2000: 400-408.
- Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Aitken RJ. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. *Aust Vet J* 2001; 78(8): 554-558.
- Chang WL, Pan MJ. Specific amplication of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimen by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3142-3146.
- Chang WL, Su WL, Pan MJ. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 849-851.
- Dumler JS, Rikihisa Y, Dasch GA, Barbet AF, Palmer GH, Ray SC. Proposal for taxonomic reorganization of the order Rickettsiales, family Rickettsiaceae and tribe Ehrlichiae. Proceeding of 15th Meeting of the American Society for Rickettsiology; 30 April-03 May. Captiva Island, Florida. 2000: 52.
- Fench TW, Harvey JW. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2407-2411.
- Graze MB, Gaunt SD. Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188: 916-917.
- Harrus S, Wanter T, Alzenberg I, Bark HT. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol* 1998; 2140-2142.
- Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *J Infect Dis* 1978; 137: 182-188.
- Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 1658-1662.
- Mathew JS, Ewing SA, Murphy GL, Kocan KM, Corstvet RE, Fox JC. Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (Order Rickettsiales) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 1997; 68: 1-10.
- Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 1998; 79: 325-339.