

Babesia gibsoni 자연 감염개에서의 Atovaquone/Proguanil 합제와 Azithromycin 병용투여에 따른 치료효과

이대근 · 김윤기 · 윤영민 · 이경갑¹

제주대학교 수의과대학 · 제주대학교 수의과학 연구소

Therapeutic Effects of Atovaquone/Proguanil in Combination with Azithromycin in Dogs Naturally Infected with *Babesia gibsoni*

Dae-Keun Lee, Yun-Gi Kim, Young-Min Yun and Kyoung-Kap Lee¹

College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

(Accepted: February 20, 2016)

Abstract : This study was performed to estimate the clinical use of combination therapy with atovaquone/proguanil and azithromycin as a effective treatment in dogs infected with *Babesia gibsoni*. Eight mixed-breed dogs that were infected naturally with *B. gibsoni* were used in this study. Four dogs (No. 1-4) as experimental group received atovaquone/proguanil and azithromycin therapy. As for the other four dogs as the control group (No. 5-8) were administered diminazene aceturate and tetracycline/clindamycin. All the dogs in this study showed mild to severe anemia and thrombocytopenia. After initiating the treatment *B. gibsoni* in blood smears disappeared. PCR analysis of the experimental group showed negative results during the observation period, but more than one dog from the control groups showed continuous positive results. Atovaquone/proguanil and azithromycin combination therapy can significantly lower the *B. gibsoni* parasitemia levels and the results suggested that this combination therapy should be a new protocol for an effective treatment in dogs infected with *B. gibsoni*.

Key words : *Babesia gibsoni*, atovaquone/proguanil, azithromycin, dog.

서 론

바베시아 감염증은 전세계적으로 발생하고 있으며, 진드기에 의해 매개되는 원충성 질병이다(4,6). 개에 감염되는 바베시아는 크게 형태학적으로 소형과 대형으로 나누며, 우리나라를 비롯한 아시아 전역에서 *Haemaphysalis longicornis*와 *Haemaphysalis bispinosa* 매개에 의한 *Babesia gibsoni*가 주원인체이고 주된 임상증상은 용혈성 빈혈에 의한 점막창백, 혈색소뇨, 빈맥, 발열, 식욕저하, 침울, 황달 및 비장종대이다(3,14). 바베시아에 대한 주된 치료법으로 diminazene aceturate (Berenil[®])가 사용되어 왔으나, 근육주사 부위의 괴사, 소변 출혈에 의한 신경증상, 발작 및 간 독성 등의 부작용이 있으며(7,20), 약물에 대한 내성 및 높은 재발율과 같은 문제점 등이 있다(23). 현재 diminazene aceturate는 생산되지 않고 있기 때문에 이를 대신할 대체 치료요법이 필요한 실정이다. 항원충 효과를 가진 lincosamide계 항생제인 clindamycin, tetracycline계 항생제인 tetracycline과 doxycycline 그리고 nitroimidazole계 항생제인 metronidazole 등

이 *B. gibsoni* 치료에 사용되고 있으나, 3개월 이상의 긴 투여 시간이 필요하다(15,24).

최근 *B. gibsoni* 감염증에 대해서 atovaquone 투여가 효과적이라는 보고가 있다(1,14,16,19). 그러나 atovaquone 단독 치료시 원충내 cytochrome *b* 유전자의 염기서열 363번째 변이로 인한 아미노산 methionine이 isoleucine으로 치환되는 변이(M121I)로 atovaquone 약물에 대한 저항성이 발생한다는 보고가 있다(12,18). 이러한 약물 저항성과 재발을 보완하기 위해서 azithromycin과의 병용 투여가 초기 바베시아 감염증 치료에 효과적이지만 혈중 원충을 완전히 제거하지 못하는 것으로 알려져 있다(2,11,21). 사람에게서 원충성 질병인 말라리아를 치료하고 예방하는 약물로 사용되는 atovaquone과 proguanil합제가 *B. gibsoni* 감염 치료에 효과적이라는 보고가 있다(8,9,22). 현재 atovaquone/proguanil 합제에 대한 원충내 cytochrome *b* 유전자의 변이(M121I)가 저항성과 관련된다는 연구는 없으며, 초기 *B. gibsoni* 치료에 효과적일 것으로만 알려져 있다(8,9).

이에 본 연구에서는 *B. gibsoni*에 자연 감염된 개를 대상으로 atovaquone/proguanil과 azithromycin의 병용 투여하는 것이 기존 치료제인 diminazene aceturate와 tetracycline/clindamycin 병용 투여하는 것보다 효과적인지를 비교 확인하였다.

¹Corresponding author.
E-mail : leekk@jeju.ac.kr

재료 및 방법

실험동물

*B. gibsoni*에 자연 감염된 1년령 미만의 8마리 잡종 강아지를 실험에 사용하였다. 실험 전 기본 검사(나이, 성별, 임상증상, 신체검사) 및 혈액검사를 실시하였다(Table 1). 실험 전 기본적인 백신과 구충은 모두 완료된 상태였으며, 바베시아 감염에 따른 항원충 치료를 받은 병력은 없었다. 실험 개 모두 식욕부진, 빈혈, 점막창백, 침울, 혈색소노 등의 임상증상을 나타내었다. 본 연구는 제주대학교 실험동물 윤리위원회 승인(2014-0008)을 받아 진행하였다.

실험군 설정 및 투여 방법

바베시아에 감염된 8마리를 무작위로 4마리씩 두 개 군으로 나누었다. Atovaquone/proguanil과 azithromycin 병용 투여군(No. 1~4)을 실험군으로, 기존 치료제인 diminazene aceturate와 tetracycline/clindamycin 병용 투여군(No. 5~8)군을 대조군으로 하였다. 실험군은 atovaquone (15 mg/kg)/proguanil (6 mg/kg)을 1일 8시간 간격으로 10일간 경구 투여하였고, azithromycin (10 mg/kg)은 1일 1회 10일간 경구 투여하였다. 대조군은 diminazene aceturate (5 mg/kg)을 1주일에 1회 총 3회 근육 주사하였으며 동시에 tetracycline (5 mg/kg)과 clindamycin (10 mg/kg)을 1일 12시간 간격으로 14일 동안 경구 투여하였다(2,14).

혈액검사 및 혈액도말염색 검사

모든 실험 개의 혈액은 치료전, 실험 3일, 10일, 20일과

30일째에 동일하게 경정맥으로 채혈하여 기본 혈액검사를 실시하였다. 혈액도말 표본은 Giemsa 염색약(Sigma-Aldrich, USA)과 인산 완충액을 1:9 희석하여 1시간동안 염색한 후 × 1000 시야에서 적혈구내 원충을 관찰하였다. 완전혈구계산(CBC)는 MEK-6450 (NIHON KODEN, Japan) 장비로 측정하였다.

PCR 검사

혈중 DNA는 G-DEX™ II b DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 추출하였다. PCR을 위한 모든 시료의 DNA 농도는 100 ng/μl (NanoVue, GE Healthcare, UK)로 적정하였다.

실험에 사용된 primer set는 18S rRNA의 일부로, *Babesia/Hepatozoon* 모두를 증폭시키는 공통 primer set를 사용하였으며, *Babesia spp.*의 증폭크기는 1,676 bp, *Hepatozoon canis*의 증폭크기는 1,761 bp이다(Table 2) (5,10,17).

PCR 산물은 1.8% agarose (EtBr) 젤 전기영동으로 확인하였으며, 양성 시료중 *Babesia spp.*와 *Hepatozoon canis* 감염은 제한효소인 *PSTI (Providencia stuartii)*을 이용한 제한효소 절편길이 다형성(restriction fragment length polymorphism; RFLP) 검사를 통해서 감별하였다.

결과 및 고찰

혈액도말검사

실험 개 8마리에서 치료 전, 3일, 10일, 20일 그리고 30일째 채혈하여 적혈구 1,000개당 원충 감염율을 조사한 결과,

Table 1. The signalment, blood chemistry, clinical signs of experimental dogs and administration protocol of medicine

No	Age (month)	Sex	HCT (%)	PLT (× 10 ³ /μl)	Parasitemia (%)	Clinical signs	Administration protocol
1	6	male	31.8	388	0.8	Anorexia	
2	6	male	34.3	266	1.4	Anorexia	Atovaquone 15 mg/kg, PO, q8 hrs for 10 days
3	6	male	16.0	2	4.2	Anorexia, Depression	Proguanil 6 mg/kg, PO, q8 hrs for 10 days
4	12	female	13.0	100	3.6	Anorexia, Pale mucus membrane	Azithromycin 10 mg/kg, PO, q24 hrs for 10days
5	6	male	25.4	3	4.4	Anorexia Depression	
6	6	female	34.0	377	2.2	Anorexia	Diminazene aceturate 5 mg/kg, IM, once a week total 3 times injection
7	6	male	19.8	28	4.2	Anorexia, Pale mucus membrane, Hemoglobinuria	Tetracycline 5 mg/kg, Clindamycin 10 mg/kg PO, q12 hrs for 14days
8	8	male	33.7	2	4.8	Anorexia	

Table 2. Oligonucleotide sequences of primer set used to detect *Babesia gibsoni* and *Hepatozoon canis*

Primer set	Tm	Sequence (5'-3')	Size (bp)
CBabe-18sF	59°C	GTT GAT CCT GCC AGT AGT	1676, 1761
CBabeB-18sR		AAC CTT GTT ACG ACT TCT C	

실험군의 원충 감염 정도는 치료 후 급속히 감소하여 치료 10일 후 적혈구내 충체를 현미경상에서 관찰할 수 없었으며, 대조군 역시 치료 20일 후 충체를 현미경 상에서 관찰할 수 없었다.

임상증상

실험 시작 전 임상증상은 식욕저하, 기력저하, 점막창백, 혈색소노 등이 관찰되었으며, 실험 개 모두 치료 후 10일째 부터 빈혈, 점막창백, 혈색소노 등의 임상증상이 소실되었다.

혈액검사

실험군과 대조군 모두 치료 전 경증 및 중증의 빈혈과 혈소판 감소증을 나타내었다. 실험군은 치료 3일후 부터 적혈

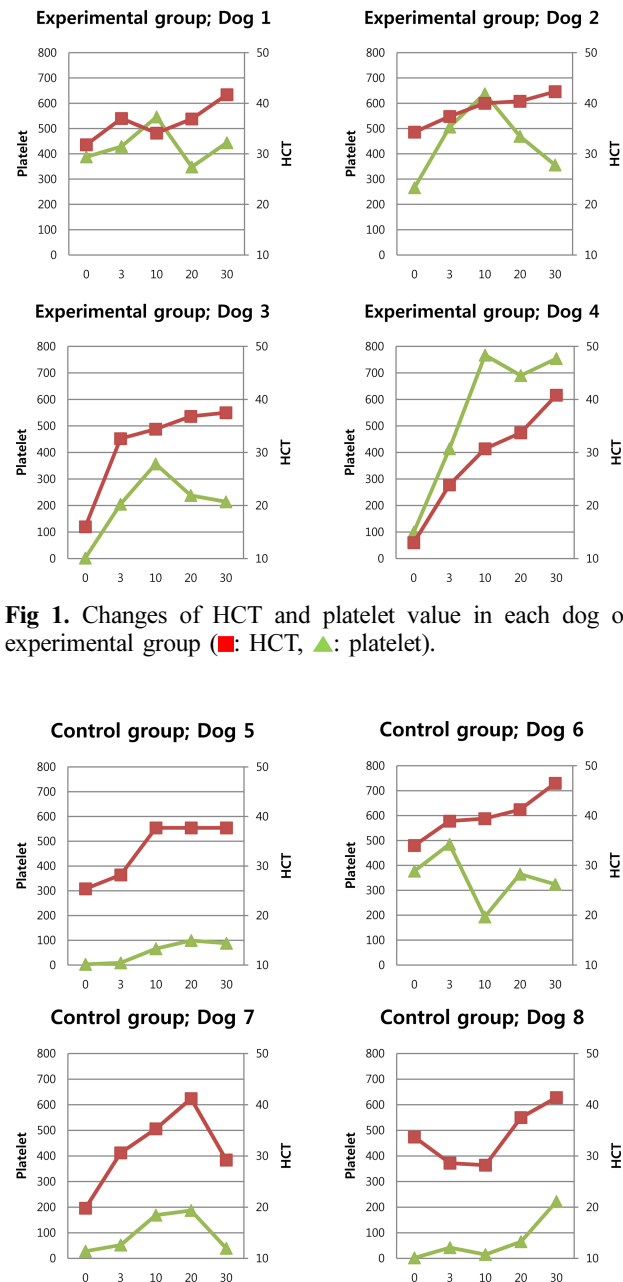


Fig 1. Changes of HCT and platelet value in each dog of experimental group (■: HCT, ▲: platelet).

Fig 2. Changes of HCT, and platelet value in each dog of control group (■: HCT, ▲: platelet).

구 용적(HCT)의 지속적인 상승을 나타내었으며, 혈소판 수 역시 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 실험군의 3번과 4번 개체에서 심한 적혈구 용적과 혈소판 수의 감소가 치료 개시 후 대조군에 비해서 크게 증가하는 경향을 나타내었다(Fig 1).

대조군 또한 중증의 빈혈을 보였던 5번과 7번 개체를 포함하여 적혈구 용적과 혈소판 수가 증가됨이 확인되었으나 20일후 7번 개체에서 다시 적혈구 용적과 혈소판 수의 감소를 나타내었다(Fig 2).

PCR 검사

PCR 및 RFLP 검사에서 모든 개체가 *B. gibsoni* 단독 감염이 확인되었다(Fig 3). 약물 치료 3일, 10일, 20일과 30일째에 PCR로 치료경과 및 감염 상태를 확인한 결과, 실험군은 치료 10일, 20일, 30일째 모두 PCR 검사상에서 혈중 *B. gibsoni*가 없는 것으로 확인된 반면, 대조군은 치료 10일째에

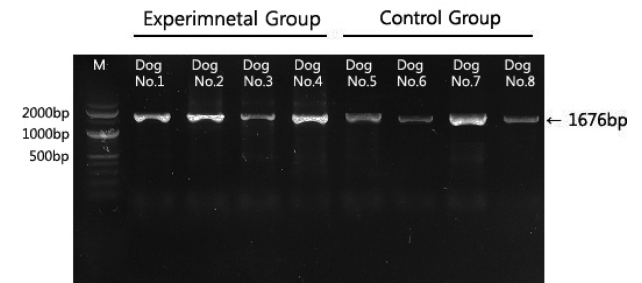


Fig 3. PCR-RFLP (Day 0); *Pst*I digest PCR-RFLP banding patterns using 1.8% agarose gel; All the dogs were infected with *B. gibsoni* only.

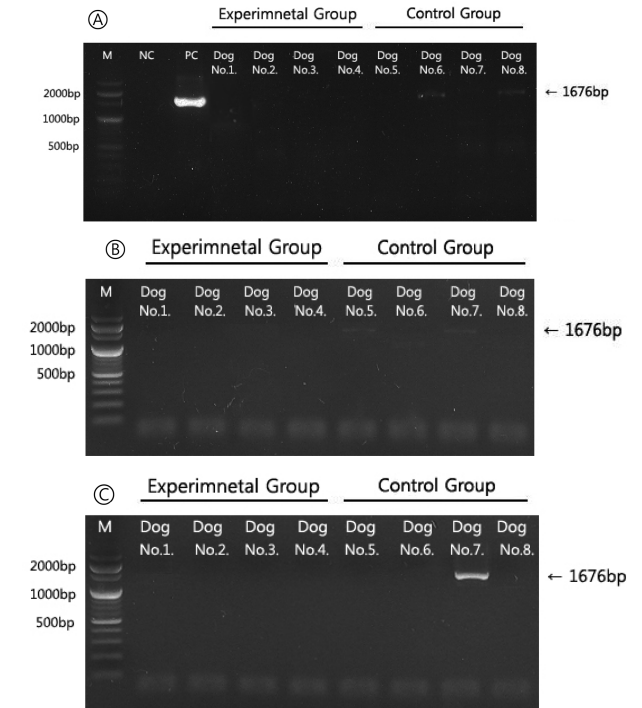


Fig 4. Electrophoresis analysis of DNAs amplified by PCR. (A) (Day 10); dog 6, dog 8 showed positive result for *B. gibsoni*. (B) (Day 20); dog 5, dog 7 showed positive result for *B. gibsoni*. (C) (Day 30); dog 7 showed positive result for *B. gibsoni*.

6번과 8번 개체에서, 20일째 5번과 7번 개체에서 그리고 30일째 7번 개체에서 *B. gibsoni*의 존재가 확인되었다(Fig 4).

결과 및 고찰

최근 지구 온난화와 더불어 진드기 수와 종의 변화를 보이고 있으며, 이에 따른 진드기 매개성 질병이 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 세계적으로 개에서 *B. gibsoni*에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 특히 atovaquone과 proguanil의 합제인 Malarone® (GlaxoSmithKline, U.K)은 뛰어난 항원충 작용과 적은 부작용을 가지고 있어서 사람의 말라리아 치료 및 예방에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 이들 합제의 바베시아 치료 효과를 알아보기 위해서 기존 diminazene aceturate와 tetracycline/clindamycin 병용 치료법과 비교하였다.

대조군의 치료 프로토콜은 기존의 *B. gibsoni*에 대한 diminazene aceturate 치료 방법에 따라 적용하였다(14). Diminazene aceturate의 치료 효과 및 부작용에 대해서는 과거 많은 연구를 통해 확인되었으며, 치료 효과의 상승과 높은 재발율을 보완하기 위해서 tetracycline과 clindamycin을 보조적으로 사용하고 있다(7,20). Clindamycin은 항원충제로써 *B. gibsoni*를 비활성화시키는 효과가 있다(24). 실험군의 치료에 사용된 atovaquone과 azithromycin, 그리고 proguanil 합제의 용법과 용량은 기존 연구를 토대로 사용하였고, atovaquone이 주된 치료 약리작용을 하며, proguanil과 azithromycin은 내성을 억제하고 치료 효과를 상승시키는 데 도움을 준다(8).

치료 시작과 함께 실험군과 대조군 모두 임상증상과 빈혈과 관련된 혈액학적 수치가 개선되었다. 실험군 모두 치료 과정에서 특이한 부작용은 관찰되지 않았으며 8마리 모두 실험이 진행되는 30일 동안 혈청학적 검사에서 간과 신장 등의 장기 이상 소견을 보이지 않았다(데이터 제시하지 않음).

PCR 결과 상에서 실험군은 치료 3일후부터 혈중 *B. gibsoni*가 존재하지 않았으면, 치료 종료 20일 후에도 음성을 나타내었다. 이는 Matsuu 등(2008)의 atovaquone 단독치료, Jefferies 등(2007)의 atovaquone과 azithromycin 병용 치료, 그리고 Iguchi 등(2013)의 atovaquone/proguanil 합제 치료 등의 결과와 비교할 때, 바베시아 치료에 보다 빠른 효과를 나타내었으며, 치료 20일 이후에도 재발 소견을 보이지 않아 기존의 치료법보다 효과적이고 안정적인 것으로 사료된다. 이는 atovaquone의 babesiacidal 효과, proguanil의 보조적인 항원충 효과, 그리고 azithromycin의 내성발현 억제 효과에 의한 것으로 판단된다.

대조군은 치료 3일후 부터 임상증상 및 혈액검사에서 개선 소견이 관찰되었으나, 투여 10일 후 6번과 8번 2개체, 20일 후 5번과 7번 2개체, 30일 후 7번 개체에서 PCR 검사상에서 혈중 *B. gibsoni*가 존재하는 소견을 나타내었다. 이러한 이유는 14일간의 치료가 불충분하였거나 diminazene aceturate 혈중 농도가 저하되는 시기에 비장내 잠복해 있던 원충의 증식 혹은 약물 내성에 의한 것으로 사료된다. 이는 Wickramasekara 등(2012)의 연구에서 보고된 바와 같이 유전자의 변이에 따른 diminazene aceturate에 대한 내성의 발

현과, Lin 등(2010)의 연구에서 제시된 것처럼 재발과 내성의 발현과 관련이 있을 것으로 사료되며, 이러한 내성의 후속 조치로 doxycyline과 metronidazole과 같은 항생제의 3개월 이상의 장기간 투여가 필요할 것으로 판단된다.

결론

B. gibsoni 감염된 개에 있어서 atovaquone/proguanil 합제와 azithromycin의 병용투여가 효과적이고 안정적인 치료 결과를 나타내었다. Diminazene aceturate 치료법과 비교하여 바베시아 감염의 초기 치료에 보다 빠른 효과가 있는 것을 판단되며, 정확한 치료기전과 각 약물의 치료 효과를 알아보기 위하여 추후 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1163-1173.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing Babesia gibsoni infection in dogs. J Vet Med Sci 2001; 63: 977-981.
6. Groves MG, Dennis GL. Babesia gibsoni; field and laboratory studies of canine infections. Exp Parasitol 1972; 31: 153-159.
7. 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.
8. Iguchi A, Matsuu A, Fujii Y, Ikadai H, Hikasa Y. The in vitro interactions and in vivo efficacy of atovaquone and proguanil against Babesia gibsoni infection in dogs. Vet Parasitol 2013; 197: 527-533.
9. Iguchi A, Shiranaga N, Matsuu A, Hikasa Y. Efficacy of Malarone(®) in dogs naturally infected with Babesia gibsoni. J Vet Med Sci 2014; 76: 1291-1295.
10. Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K, Onishi T, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. Vet Parasitol 2004; 121: 341-346.
11. 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.
12. Korsinczky M, Chen N, Kotecha B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in Plasmodium falciparum cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2100-2108.
 13. 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.
 14. Lin EC, Chueh LL, Lin CN, Hsieh LE, Su BL. The therapeutic efficacy of two antibabesial strategies against Babesia gibsoni. *Vet Parasitol* 2012; 186: 159-164.
 15. Lin MY, Huang HP. Use of a doxycycline-enrofloxacin-metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by Babesia gibsoni. *Acta Vet Scand* 2010; 52: 27.
 16. 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.
 17. Matsuu A, Ono S, Ikadai H, Uchide T, Imamura S, Onuma M, Okano S, Hifuchi S. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of Babesia gibsoni (Asian genotype) DNA. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 569-573.
 18. Matsuu A, Miyamoto K, Ikadai H, Okano S, Higuchi S. Cloning of the Babesia gibsoni cytochrome b gene and isolation of three single nucleotide polymorphisms from parasites present after atovaquone treatment. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 593-597.
 19. Matsuu A, Yamasaki M, Xuan X, Ikadai H, Hikasa Y. In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against Babesia gibsoni (Aomori strain). *Vet Parasitol* 2008; 157: 1-8.
 20. Miller DB, Swan GM, Lobetti RG, Jacobson LS. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. *J S Afr Vet Assoc* 2005; 76: 146-150.
 21. Sakuma M, Setoguchi A, Endo Y. Possible emergence of drug-resistant variants of Babesia gibsoni in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 493-498.
 22. Suzuki K, Wakabayashi H, Takahashi M, Fukushima K, Yabuki A, Endo, Y. A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in Babesia gibsoni infection. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 563-568.
 23. Wickramasekara Rajapakshage BK, Yamasaki M, Hwang SJ, Sasaki N, Murakami M, Tamura Y, Lim SY, Nakamura K, Ohta H, Takiguchi M. Involvement of mitochondrial genes of Babesia gibsoni in resistance to diminazene aceturate. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 1139-1148.
 24. 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.