

博士學位論文

국내 발생 말구진에서 Equine
herpesvirus type 3의 분리와
특성연구 및 혈청학적 진단법 개발



濟州大學校 大學院

獸醫學科

梁宰赫

2005年 12月

목 차

총	론.....	1
---	--------	---

제 1 장. 말구진의 임상적 및 역학적 특징과 원인바이러스(Equine herpesvirus type 3) 검출

I. 서	론.....	4
II. 재료 및 방법.....		10
III. 결	과.....	14
IV. 고	찰.....	34
V. 결	론.....	43

제 2 장. Equine herpesvirus type 3 분리 및 특성

I. 서	론.....	46
II. 재료 및 방법.....		51
III. 결	과.....	56
IV. 고	찰.....	64
V. 결	론.....	66

제 3 장. Equine herpesvirus type 3에 대한				
항체검출용 ELISA 개발				
I. 서	론.....	68		
II. 재료 및 방법.....		71		
III. 결	과.....	73		
IV. 고	찰.....	92		
V. 결	론.....	95		
총	결	론.....	96	
참	고	문	헌.....	99
요	약.....			124



Abstract

Isolation, characterization and development
of serological diagnosis method on equine
herpesvirus type 3 from equine coital
exanthema in Korea

Advised by professor Yoon-Kyu Lim



Department of Veterinary Medicine
Graduate School
Cheju National University
Jeju 690-756, Korea

Equine coital exanthema (ECE) caused by equine herpes virus type 3 (EHV-3) is a sexually transmitted disease which is resulted in the failure of mating, declination of horse productivity and finally economic loss in horse breeding farms and horse racing industry. In this thesis, the clinical, epidemiological, immunological, and virological studies on

ECE have been performed in order to provide basic knowledge on the first outbreak of ECE in Korea and to develop a serological diagnosis method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In 2005, ECE had been occurred among the Thoroughbred stallions and broodmares in Jeju, South Korea. Five stallions and 45 broodmares were infected in the breeding season. The clinical symptoms were the formation of papules, pustules, ulcers and scabs on the progenital skin and mucosa of horses. EHV-3 was isolated and the glycoprotein G gene of the virus was detected from two stallions and 45 broodmares by polymerase chain reaction (PCR). The results suggest that the horses were infected with ECE. The shedding period of EHV-3 in stallions was around 22 days and that in broodmares were varied. There was no different hematologic state between patients and healthy horses. ECE did not affect on the libido of the stallions and complications were laceration of glans penis and gait disturbance of hind limbs in infected stallions. Since, DNA of EHV-3 was detected from nostril specimen of a teaser but was not detected from oral specimen, the teaser could be a carrier without clinical signs.

EHV-3 isolate was successfully cultured in RK-13 cells and cytopathic effect (CPE) of the virus was obvious at 48 hours after inoculation. EHV-3 has been only detected from cultured viruses, but neither EHV-1 nor EHV-4, by using PCR. The DNA sequences of glycoprotein G (gG) gene from isolated EHV-3 was analysed and compared to that of EHV-3 334/74 strain. Only 3 bases of the gene were not matched with those of EHV-3 334/74 strain among 400 bases analysed and the identity was 99.25%. Four major protein bands at 145 kD, 60 kD, 45 kD and 40 kD were detected by SDS-PAGE analysis using EHV-3 isolate named as Georo strain here.

ELISA has been developed to detect antibodies against EHV-3. Whole EHV-3 viruses were purified from cell culture and coated on ELISA plate, which successfully captured by anti-EHV-3 antibody in serum samples. The positive cut-off value of developed ELISA was

0.334 at OD₄₀₅ using 15 negative control horse sera. The positive rate of 20 sera from ECE positive horses by PCR was 65% and the positive rate of 12 sera from ECE negative horses by PCR was 25%. The positive rate of 72 sera from horses showing clinical signs was 59.7% and the positive rate of 72 sera from horses showing no clinical signs was 13.9%. The correlation of serum positivity between broodmares and their sucklings was analysed using 12 pairs of cases ($y = 0.5418x - 0.0158$, $R^2 = 0.4931$). The data suggested that specific antibody against EHV-3 from broodmares might be transferred to their sucklings by nursing.

Keywords : Equine coital exanthema, Equine herpesvirus type 3, RK-13 cell, DNA sequencing, ELISA.



총 론

제주도는 고려시대부터 말 생산기지로 유명한 지역이고 사면이 바다로 둘러싸인 섬이기 때문에 지리적으로 청정하며 연중 일조량과 강수량이 많아서 초지형성과 기후 등의 조건이 다른 지방에 비해 월등하게 우수하다. 또한 이러한 이점이 세계에서 두드러지는 말 생산 및 육성기지 구축을 위한 인프라가 되고 있다(남, 2003). 경주마 생산을 위한 Thoroughbred 생산농가에서는 혈통이 좋은 씨수말과 교배시켜 농가소득을 향상시키고 있고, 이를 위하여 우수한 망아지 생산을 위한 씨암말들을 사육·관리하고 있으며 제주도내의 말 산업은 지속적 성장을 보이고 있다(한국마사회, 2004). 한편, 경주마를 생산함에 있어서 오랜 시간동안 가장 중요한 문제로 대두되어온 것들 중의 하나가 생산성을 저해시키는 위험요소들이다. 그러나 국내 경주마생산농가 뿐만 아니라 관련 축산산업 및 마사진흥에 악영향을 주는 말 생산성을 위협하는 위험요소 연구 및 말의 악성질병의 스크리닝은 거의 없는 실정이다.

씨암말과 연관된 생산물 저하의 위험요소로는 각종 전염병, 치명적인 외과적 질환 그리고 산과적 사고 또는 질병 등으로 인한 씨암말의 폐사나 생식기 감염증 등으로 인한 교배불능 등이 있다(McKinnon과 Voss, 1993).

말 생산성을 저해하는 대표적인 감염증인 herpesvirus군에는 많은 바이러스들이 있고 매우 흔하게 질병을 유발시킨다(Ostlund, 1993; Studdert, 1996; Fukushi 등, 2000). Equine herpesvirus type 1(EHV-1)에서 EHV-5까지는 말에, EHV-6, 7 및 8은 asinine herpesviruses(AHV) 1, 2 및 3라고도 명명하며 당나귀에 감염한다(Ostlund, 1993).

국내에서도 EHV-1과 EHV-4의 감염이 문제가 되고 있으나, 본 연구에서 첫 보고할 소위 ‘말구진’의 원인체인 EHV-3는 아직 분리된 보고가 없

었다. 본 연구는 제주지역의 Thoroughbred 씨수말 및 씨암말에서 2005년 교배기간(3월~7월) 중, 국내에서 첫 발생한 말구진에 대하여 연구하였고, 감염된 대상 동물들을 통한 말구진의 임상적 및 역학적 특성을 조사하였다. 또한, 원인 바이러스의 특성 그리고 혈청학적 진단법의 개발에 대한 조사 연구를 실시하였다.

이를 위하여, 말구진의 임상증상을 나타내는 말과 주변 동물을 대상으로 임상증상 유형, 리비도, 합병증, 정상마와의 혈액학 및 호르몬 수치 비교 및 PCR 검사를 이용한 양성여부 검사와 교배 전 발병두수와 교배 후 발병두수 비교, 바이러스 배출기간 조사, 이환율, 발병전후의 임신에 미치는 영향을 파악하고 치료 후 교배를 통한 감염여부를 조사하는 등의 역학적 특징을 확인하였다.

또한, 바이러스의 분리와 특성파악을 위하여, 배양세포접종을 통한 증식 여부를 관찰, 분리바이러스의 gG protein을 coding 하는 DNA Sequencing 분석을 통한 표준주와의 상동성(homology) 조사 및 전자현미경 검경을 통한 형태적 관찰을 수행하였다.

한편, 항체가를 측정함으로써 원인바이러스에의 노출여부를 확인하기 위한 혈청학적 진단법으로서의 ELISA 검사를 실시하였다. 따라서 본 연구는 EHV-3에 의한 경주마 생산농가 및 관련 산업에 경제적 피해를 최소화시키고 말 생산성을 높이기 위하여 국내에서 첫 발생한 EHV-3의 감염증에 대한 임상적 조사를 실시하고 분리 바이러스의 특성을 조사하여 보고할 목적으로 실시하였다. 또한, 혈청학적인 검사법을 적용시켜 EHV-3의 예방을 위한 자료로 활용코자 수행하였다.

제 1 장

말구진의 임상적 및 역학적 특징과 원인바이러스(Equine herpesvirus type 3) 검출



I. 서 론

Equine herpesvirus는 전 세계적으로 말과 관련된 산업에 가장 악영향을 끼치는 대표적인 병원체이다(Ostlund, 1993). 말구진(equine coital exanthema: ECE)은 equine herpesvirus type 3(EHV-3)에 의해 발생되고 생식기 피부에 미약한 수포형성에서부터 심각한 궤양에 이르기까지 다양한 임상증상을 나타내는 급성 생식기 감염증이며 말 생산성에 직접적인 영향을 미친다(Bryans와 Allen, 1973; Colahan 등, 1991; Kobluk 등, 1995; Studdert, 1996; Colahan 등, 1999a). 본 질병은 Equine herpesvirus 3 (EHV-3) disease, coital vesicular exanthema, equine venereal vulvitis, genital horse pox, spots 또는 balanitis 등이라고도 명명된다(Jones와 Hunt, 1983; Timoney 등, 1988; Rossdale과 Wreford, 1989; Davies Morel, 1999). 감염된 씨수말 및 씨암말에서 외부 생식기에 농포 또는 가피성 미란이 형성되고, 때때로 입술과 상부 호흡기관의 점막에서도 병변이 발견되지만(Lui, 1983; Bowen, 1987; Carlton과 McGavin, 1995; Studdert, 1996) 자연상태에서 유산은 발생되지 않는다(Fraser 등, 1991). 또한 말구진은 생식기 감염증으로 분류될 뿐만 아니라 유두종증(papillomatosis)과 같이 피부에서만 임상증상이 발현되기 때문에 피부병으로도 분류되고 있고(Kobluk 등, 1995; Reed와 Bayly, 1998; Lloyd 등, 2003) 사람이나 다른 종의 동물에는 전염되지 않는다(Joklik 등, 1988).

말구진은 19세기와 20세기 초반에 유럽에서 발생하고 있었고(Studdert, 1996) 1968년 캐나다(Girard 등, 1968)와 미국(Bryans, 1968)에서 처음으로 EHV-3를 분리하였다(Bryans와 Allen, 1973; Crandell과 Davis, 1985). 그 후 호주(Pascoe 등, 1968; Pascoe 등, 1969; Feilen 등, 1979), 영국(Gibbs 등, 1970; Dwyer 등, 2004), 덴마크(Bitsch, 1972), 노르웨이(Bagust 등, 1972), 독일(Thein, 1975) 및 인도(Uppal 등, 1989) 등지에서

발생하였고 현재는 전 세계에서 발생하고 있으며(Craig와 Kehoe, 1921; Bryans, 1968; Pascoe 등, 1969; Bitsch, 1972; Gibbs 등, 1972; Uppal 등, 1989; Studdert, 1996; Reed와 Bayly, 1998) 일본에서도 발생되었으나 (Seki 등, 2004) 아직 국내의 보고는 없었다.

국내에서 equine herpesvirus와 관련된 보고를 살펴보면, 최초로 Bak(1981)에 의해 유산된 말태아의 비장 및 간을 병리학적으로 검사하여 비폐렴 발생을 확인한 바 있고, 혈청학적인 조사에 의해 내륙에서 사육되는 말에서는 유산형 EHV와 호흡기형 EHV가 3%와 4% 그리고 제주마에서는 둘 다 22%의 양성률을 보고하였다(이 등, 1986). 또한 1990년대 중반에 말 유산태아에서 EHV 분리에 성공하였고(조 등, 1995a, b, c), 그 후 면역조직학적 및 immunogold 기법에 의한 전자현미경적 진단(신 등, 1996)과 중합효소연쇄반응 기법을 이용하여 EHV-1과 EHV-4를 구별하였다(문 등, 2001).

말구진은 일반적으로 교배를 통한 생식기 접촉으로 전파되나 교배를 하지 않은 암말에서도 바이러스가 분리된 바 있다(Krogstad와 Onstad, 1971; Bryans와 Allen, 1973; Crandell과 Davis, 1985). 또한 말을 관리하는 과정중의 접촉에 의해 전염되기도 하고 파리와 같은 곤충, 직장검사용 장갑, 의료기구 등의 매개물 및 비말감염으로도 전염이 가능하고 수의사에 의해서도 전파된다(McMullan, 1982; Kobluk 등, 1995; Knottenbelt와 Pascoe, 1997; Reed와 Bayly, 1998; Colahan 등, 1999a,b; Pascoe와 Knottenbelt, 1999; Scott과 Miller, 2003).

감염회복 후의 재발(recurrence)은 논란의 여지가 매우 많고 학자들마다 의견이 다양하다. Pascoe와 Bagust(1975)는 말구진 병력이 있는 씨수말에서 이 질병이 재발된다는 보고는 없다고 하였으나 herpes simplex virus 2의 경우를 유추해 볼 때, 좌골 신경절세포에 잠복하다가 재발되고 바이러스가 배출될 수도 있다(Studdert, 1996). 이때 다양한 정도의 재발성 임상증상, 바이러스 배출 및 교배전염을 동반하는 것으로 추정된다. 바이러스는 잠복상태로 남으며 때때로 자발적으로나 면역 저하된 말에 재발

한다는 가설이 유력하다(Pascoe와 Bagust, 1975). 한편, EHV-3가 지속감염을 유발하는지는 알려지지 않았으나 질병 및 수송 스트레스 기간에 재발한다(Pascoe와 Knottenbelt, 1999). 새로운 말구진의 발병은 잠복한 바이러스가 재활성화 됨으로써 시작되고 첫 임상증상을 확인하기 1~2 주일 전에 바이러스가 배출되기 때문에 초발환마(index case)의 확인은 어려운 편이다(Studdert, 1996). 또한 질병의 후반부에는 바이러스가 배출되지 않을 수 있기 때문에 샘플채취에 주의해야한다(Scott과 Miller, 2003).

미약한 찰과상을 통해서 바이러스가 상피세포에 침입하여 감염이 이루어진다. 병변이 확산되는 형태는 매우 다양한데 초기에 감염된 바이러스의 량, 새로운 숙주의 감수성 및 찰과상의 정도 등의 요소들에 의해 좌우된다. EHV-3의 두드러진 특징은 bovine herpesvirus type 2와 herpes simplex virus처럼 각질상피에 친화성이 강하다(Martin 등, 1966; Studdert, 1996).

잠복기는 대부분의 경우에서 12~24시간 혹은 24~48시간까지 짧기도 하나 대체로 3~7일이고 길어질 경우 10~11일까지 연장된다(Krogsrud와 Onstad, 1971; McMullan, 1982).

씨수말에서는 요도구 주위와 포피 내부에서도 병변이 관찰된다(Rooney와 Robertson, 1996; Aiello 등, 1998; Rose와 Hodgson, 2000). 병이 진행되면 1~1.5 cm의 수포가 귀두에서부터 나타나서 점차 음경체로 번져가고(Hawcroft, 1994; Kobluk 등, 1995) 2~5일 후에는 포피에서도 관찰된다(Bryans, 1980; Jubb과 Kennedy, 1985). 질병 초기에 수포는 발적되면서 수포 부위에 부종이 형성된다. 그 후 작은 회색결절의 농포로 진행되고 그 다음에 농포가 파열되면 황색 혹은 갈색의 미란 또는 궤양이 형성된다. 미란은 신속히 치유되는 반면에 궤양은 치유가 더디고 백색 가피조직이 형성되고 나중에는 황적색으로 변한다(Uppal 등, 1989; Robinson, 1992; Rooney와 Robertson, 1996; Riegel과 Hakola, 1999). 씨수말의 음경과 포피는 가장 임상증상이 빈발하는 부분이다(Colahan 등, 1999b). 궤양이 형성되었던 부위에 이차감염이 없다면 3 주 내에 치유 되면서 탈색된

반점은 지속 존재하게 된다(Bryans, 1980; McMullan, 1982; Reed와 Bayly, 1998; King, 2002).

씨암말에서 최초의 임상증상은 질에서 분비물이 나오는 것이다 (Krogsrud와 Onstad, 1971; McMullan, 1982; Hayes, 2002). 병변은 소에서 농포성 음순질염과 유사하고(Girard 등, 1968). 기면, 식욕결핍 및 발열 등의 전신증상이 발현된다(Gibbs 등, 1972; Robinson, 1992). 그러나 대부분의 경우에서 상대적으로 임상증상이 미약하게 발현되고 체온, 심박수, 호흡수 및 식욕 등은 정상이기에 임상증상은 관찰되지 않고 경과된다(Studdert, 1996). 암말에서는 음핵 주위와 음순 내측 그리고 회음부 피부 등에서 발적이 관찰되고 매우 드물게는 점상출혈이 나타난다(Rooney와 Robertson, 1996; Aiello 등, 1998). 때로는 속발적으로 *Streptococcus spp.* 등의 세균 및 곰팡이가 감염되어 궤양을 증대시키고 점액화농성 삼출물을 배출하기도 하여 치유기간을 연장시키는 물론 체온을 40 °C 이상으로 증가시키는 전신증상을 유발하고 회음부와 음순에 부종이 뚜렷하게 관찰되며 병변이 두꺼워지고 크림양의 점액화농성 삼출물을 나타낸다(McKinnon과 Voss, 1993; Aiello 등, 1998; Scott과 Miller, 2003). 드물지만 부종은 씨수말의 포피 및 음낭 그리고 씨암말의 회음부 및 복부에도 나타난다(McKinnon, Voss, 1993). 암말에서는 흔히 음순에서 처음으로 병변이 확인되는 부위이고 많은 꺼칠꺼칠한 미란들이 관찰된다. 증상이 심할 경우 항문 및 꼬리 피부에서도 병변이 발견된다(Pascoe와 Knottenbelt, 1999). 만일 가피들이 음순의 병변에서 제거되지 않았다면 충혈 되고 불규칙한 얇은 미란들이 주위 피부와 뚜렷한 경계를 나타내는 것이 관찰된다. Herpesvirus가 유발하는 병변은 반흔(scar)상태로 남아있지 않는다. 이는 사람에서 HSV와 varicella zoster virus(VZV) 감염에 의해 수포와 농포가 치유되면 반흔이 남지 않는 병변과 유사하다. 병변은 poxvirus가 유발하는 천연두와 감염초기에는 비슷하지만 poxvirus가 유발한 병변은 치유 후에 반흔이 형성(pock marks)됨으로써 herpesvirus와 구별된다. 병변이 치유되는 과정은 씨수말과 비슷하고(Blanchard 등, 1992) 음핵과 질

의 궤양은 치료 속도가 더디다(Fraser 등, 1991; Aiello 등, 1998). 궤양이 치유되고 나면 더 이상 전파 시키지 않는다(McKinnon과 Voss, 1993). 음순에 부종이 관찰되고 병변부위를 손으로 눌렀을 경우 통증이 있고 또한 임상증상이 급성기일 때 배뇨 시에도 통증을 나타낸다고 하였으나 (Colahan 등, 1999a,b) 병변은 통증보다는 소양감이 있고 스트레스는 재발을 촉진시키기도 한다(Reed와 Bayly, 1998; Pascoe와 Knottenbelt, 1999).

병변은 심지어 암말의 유두와 포유하는 망아지의 주둥이 및 입술에도 나타나기도 하고(Craig와 Kehoe, 1921; Crandell과 Davis, 1985; Rooney와 Robertson, 1996; Reed와 Bayly, 1998) 비강점막에서도 병변이 발견되며 (Savage, 1999; Ball, 2001; Lloyd 등, 2003) 결막에서도 병변을 관찰할 수 있다(Wilks와 Studdert, 1976). 때때로 심한 경우에는 암말의 후지에서도 관찰되고 배뇨 시 극도의 통증을 호소하기도 한다(Higgins와 Wright, 1995; Siegal 등, 1996).

감염된 씨수말은 리비도가 감소하여 암말과 교배를 하려하지 않거나 (Morrow, 1986; Higgins와 Wright, 1995; Aiello 등, 1998) 통증으로 인해 교배하기를 꺼려한다(Hawcroft, 1994; England, 1996; Hayes, 2002). 음경으로부터 삼출물이 나타나는데 이는 과도한 피지(smegma)와 혼동할 수 있다(Higgins와 Wright, 1995).

조직병리학적으로 친수성의 풍선변성을 동반한 증식성 천부 및 심부 혈관주위 피부염과 호산구성 핵내 봉입체를 관찰할 수 있고 특히, 흘림프절 주변에 호중구와 림프단핵세포 침윤이 보인다(Gibbs 등, 1972; Higgins와 Wright, 1995; Rooney와 Robertson, 1996; Reed와 Bayly, 1998; Colahan 등, 1999a,b; Lloyd 등, 2003). 상피세포의 표면은 용해되고 가피가 형성되며 가피는 섬유소로 채워진다(Gibbs 등, 1972; Wilks와 Studdert, 1976). 일부 병변에서는 극세포해리(acantholysis), 괴사 및 표피 내에서 수포가 발견된다(Scott과 Miller, 2003).

발병이 확인되면 이차적인 세균감염의 예방을 위해 감염부위에 항생연고를 도포해주거나 chlorhexidine으로 소독하고 병변이 완치될 때까지 교

배를 금지해야하는 것이 치료와 확산방지에 중요하다(Fraser 등, 1991; Higgins와 Wright, 1995; Kobluk 등, 1995).

따라서 본 연구는 국내에서 처음 발생한 말구진의 임상증상을 나타내는 말과 주위 접촉가능한 말을 대상으로 임상증상 유형, 리비도, 합병증, 정상마와의 혈액학 및 호르몬 수치 비교 및 PCR 검사를 이용한 양성 검사와 교배 전 발병두수와 교배 후 발병두수의 비교, 바이러스 배출기간 검사, 이환율, 발병전후의 임신에 미치는 영향을 파악하고 치료 후 교배를 통한 감염여부를 검토하는 등의 역학적 특징을 확인하여 말 임상가와 생산농가에 도움이 되고자 본 연구를 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 임상검사

1) 병변검사

씨수말 및 시정마

2005년도 교배기간(3월~7월) 중에 한국마사회 제주경주마목장 씨수말 24두, 민간 Thoroughbred 씨수말 3두 및 시정마 1두에 대하여 비강, 구강 점막, 귀두, 음경, 포피, 후지 및 복부 등을 시진하였다.

씨암말 및 망아지

2005년도에 한국마사회로 교배 방문한 제주 생산농가의 Thoroughbred 씨암말 327두와 내륙에서 제주경주마목장으로 이동한 씨암말 5두의 외부 생식기, 후지, 유방 및 복부 그리고 제주지역 생산농가 씨암말과 동거하는 포유망아지 124두에 대하여서도 결막, 비강 및 구강부위를 검사하였다.

시료채취

2가지의 상업용 면봉(swab)(Culturette™, Becton Dickinson & Company, Mexico와 Cultureswab™, Becton Dickinson & Company, France)을 이용하여 생식기 병변부위 및 비강에서 시료를 채취하였고, 세균검사는 제주대학교 수의학과 수의전염병학교실에 의뢰하였다.

2) 씨수말 리비도 검사

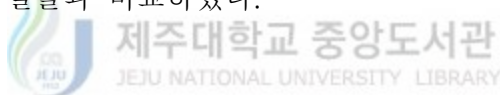
임상증상이 있는 한국마사회 제주경주마목장 씨수말 2두에 대하여 수의사 2, 씨수말관리원 2 및 진료보조원 1 등 총 5명이 검사하였고, 민간 씨수말 3두에 대하여 수의사 2 및 관리원 3 등 총 5명이 검사를 하였다.

2. 임상병리검사

임상증상을 발현하는 한국마사회 씨수말 2두와 감염이 의심되는 씨수말 2두 그리고 제주지역 생산농가의 씨암말 45두에 대하여 임상병리검사를 실시하였다.

1) 혈액학 분석

교배하기 전에 외부 생식기를 세척한 다음에 병변을 확인하고, 경정맥에서 채혈한 후 EDTA 튜브 (BD Vacutainer™, BD Vacutainer Systems, UK)를 이용하여 항응고제와 혈액이 잘 혼합되도록 조심스럽게 흔들어 준 다음 냉장 보관하여 실험실로 이동하였다. 혈액과 항응고제가 잘 섞이게 롤러에서 약 30분 동안 롤링 한 후에 자동혈구분석기(Hemavet 950™, Drew Science, USA)를 이용하여 백혈구, 적혈구 및 혈소판 등을 측정하여 건강한 말들과 비교하였다.



2) 호르몬 분석

혈중 호르몬 측정은 경정맥에서 채혈한 후 플레인 튜브(SST Gel & Clot Activator Vacutainer™, BD Vacutainer Systems, UK)에 넣은 후에 임상병리전문기관(SCL 서울의과학연구소, 한국)에 측정을 의뢰하였다.

3. 중합효소연쇄반응(PCR)

1) DNA 추출

병변에서 swab을 이용하여 가검물을 채취한 후 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)의 추출방법에 의해서 이용하여 제한 희석 방법으로 바이러스 DNA를 추출하였다.

2) Primer 제작

EHV-3를 확인하기 위하여 primer는 Hartley 등(1999)이 시도한 방법으로 제작하였고 glycoprotein G(gG)의 특이적인 nucleotide sequence를 사용하였다(표 1-1).

Table 1-1. Nucleotide sequence of primers used for PCR amplification of glycoprotein G gene of equine herpesvirus type 3

Primer (P)	Sequence(5-3)	Orientation
EHV-3 P1 (792-812)	GCGCTCTCTCGGCCTTGCCAG	Sense
EHV-3 P2 (1,309-1,290)	GCGTCTCGAAAAGCGAGAG	Antisense

3) PCR 검사

PCR용 premix (2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 μM Taq polymerase, 0.5 unit, Bioneer, Korea)에 PCR grade sterile water, 0.4 μM의 forward primer와 reverse primer를 각각 1 μl, 5 μl DNA를 첨가하여 총 용량이 50 μl가 되도록 하였다.

Cycling은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA)을 이용하여 수행하였다. Initial denaturing은 95 °C에서 10 분간 반응시키고 denaturation은 95 °C에서 1 분, annealing은 60 °C에서 1 분 그리고 extension은 72 °C에서 1분씩 40 cycles 하였으며 final extension은 72 °C에서 10 분간 실시하였다.

4) PCR 산물의 확인

PCR로 증폭된 products 10 μl를 TAE (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0) buffer를 running buffer로 하는 2 % agarose gel에 로딩 후 100 V, 30 분간 mini-gel electrophoresis unit(MUPID-2)에서 전기영

동하고 ethidium bromide(EtBr, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색하여 UV transilluminator로 EHV-3의 gG gene에 대한 증폭산물의 크기를 관찰하였다.

4. 역학조사

임상증상을 보이는 씨수말 및 씨암말에서 면봉으로 병변부위에서 계속적으로 시료를 채취하여 EHV-3 배출기간을 PCR을 이용하여 검사하였다. 그리고 임상증상은 보이지 않았으나 씨암말과 동거하는 포유망아지와 교배소의 시정마도 면봉을 이용하여 비공에서 시료를 채취한 후 PCR을 이용하여 배출여부를 검사하였다.

5. 임신진단

교배 후 17일에 초음파진단기(SSD-500[®], ALOKA, Co. Ltd, JAPAN)를 이용하여 직장벽을 통하여 좌측난소에서부터 좌자궁각, 자궁체, 우자궁각 및 우측난소까지 탐색해서 수정란의 존재여부로 1차 임신진단을 하였고 수정란과 자궁물혹(cyst)을 감별하기 위하여 25일 경에 동일한 방법으로 재진단하여 수정란의 크기가 증가하였을 때만 임신으로 확진하였다.

III. 결 과

1. 임상검사

한국마사회 제주경주마목장에서 사육 중인 씨수말 24두 중 1두(KS I)에서 귀두, 요도구, 음경체 및 포피에 수포, 농포, 궤양 및 가피 등의 임상증상을 발견하였고, 양후지에서는 발견할 수 없었다(그림 1-1; 표 1-2). 다른 1두(KS II)에서는 KS I과 임상검사에서 같은 결과를 보였으나 보다 심한 증상을 나타내었다. 그리고 또 다른 2두의 씨수말(KS III 및 KS IV)과 교배 후에 교배대상 씨암말에서는 임상증상이 발현되었으나 그 씨수말 2두에서는 아무런 증상을 관찰할 수 없었다(그림 1-2; 표 1-2). 그리고 민간 씨수말(PS I, II, III)에서는 한국마사회 씨수말과 발생부위 및 병변의 양상은 동일하였으나 보다 더 심한 증상을 나타내었다(표 1-3).

씨암말 327두 중에서는 45두가 임상증상을 나타내었고, 주로 회음부, 음순 및 점막피부접합부에서 병변을 관찰하였으며, 증상이 소멸된 후에 탈색반점을 관찰하였으나 유두, 복부 및 양후지에서는 임상증상을 관찰할 수 없었다(그림 1-4; 표 1-4).

씨암말과 동거 중인 포유망아지의 결막, 구강 및 비강에서는 아무런 병변을 관찰할 수 없었다.

임상증상을 나타내는 씨수말 5두 모두 평소 때와 같은 리비도를 나타내었다. 그리고 말구진의 합병증은 4두에서 나타났는데 임상증상이 심한 씨수말(KS II)에서 교배한 후에 귀두 복측에 열창이 발생하여 많은 출혈이 있었고(그림 1-3) 나머지 3두(PS I, II, III)는 보행장애를 나타내었다(표 1-5).

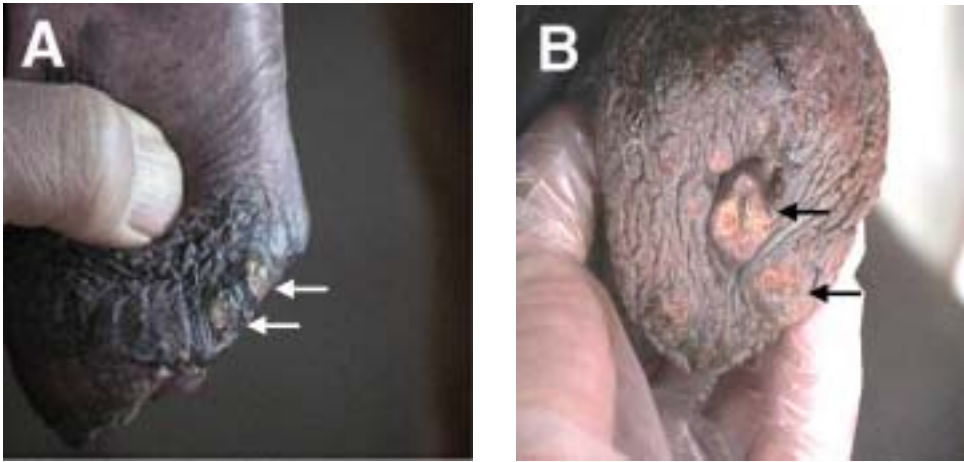


Fig. 1-1. Lesions of ECE on (KS I)'s penis, showing the pustules particularly in the area of the glans. A: Ulcers on a glans penis. B: Pustules on a urethral process and glans penis.

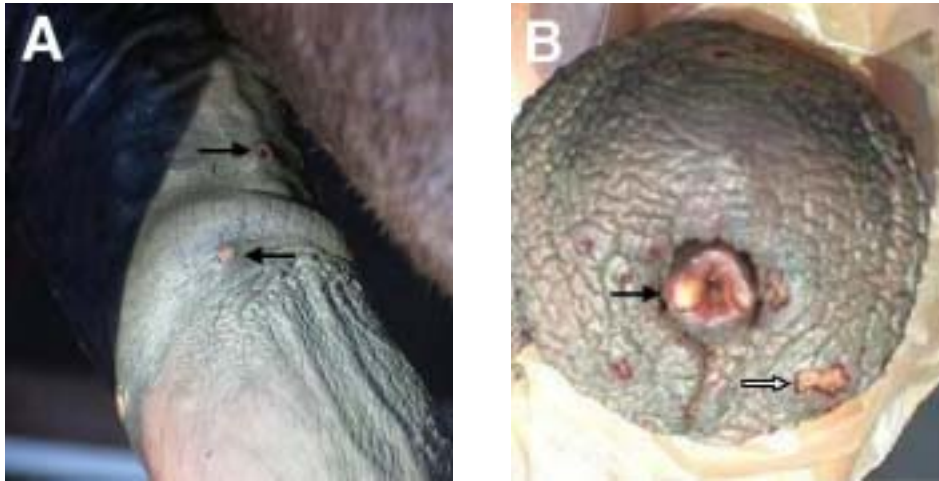


Fig. 1-2. Lesions of ECE on the penis of a Thoroughbred stallion. A: Scabs on body of penis and prepuce and ulcers around preputial ring. B: Pustules on urethral process(solid arrow), ulcer on a glans of penis(empty arrow).

Table 1-2. Clinical signs of 4 KRA Thoroughbred stallions affected with equine herpesvirus type 3

Symbol of stallions	Sites	Vesicles	Pustules	Scabs	Ulcers	Edema	White spots
KS I	Glans	+	+	+	+	+	+
	Penis	+	+	+	+	-	+
	Prepuce	+	+	+	+	+	+
	Scrotum	-	-	-	-	+	-
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-
KS II	Glans	++	++	++	++	++	++
	Penis	++	++	++	++	-	++
	Prepuce	++	++	++	++	-	++
	Scrotum	-	-	-	-	-	-
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-
KS III	Whole body	-	-	-	-	-	-
KS IV	Whole body	-	-	-	-	-	-

KS: Korea Racing Association's Stallion

-: no lesions, +: mild, ++: moderate, +++: severe

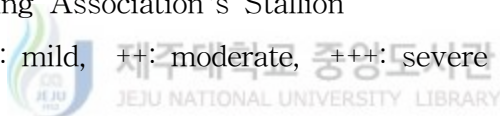


Table 1-3. Clinical signs of 3 private Thoroughbred stallions affected with equine herpesvirus type 3

Symbol of stallions	Sites	Vesicles	Pustules	Scabs	Ulcers	Edema	White spots
PS I	Glans	+	+	+	+	+++	+
	Penis	+	+	+	+	+++	+
	Prepuce	+	+	+	+	+++	+
	Scrotum	-	-	-	-	+++	+
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-
PS II	Glans	++	++	++	++	+++	+
	Penis	++	++	++	++	+++	+
	Prepuce	++	++	++	++	+++	+
	Scrotum	-	-	-	-	+++	+
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-
PS III	Glans	+	+	+	+	+++	+
	Penis	+	+	+	+	+++	+
	Prepuce	+	+	+	+	+++	+
	Scrotum	-	-	-	-	+++	+
	Hind limbs	-	-	-	-	-	-

PS: Private stallion

-: no lesions, +: mild, ++: moderate, +++: severe

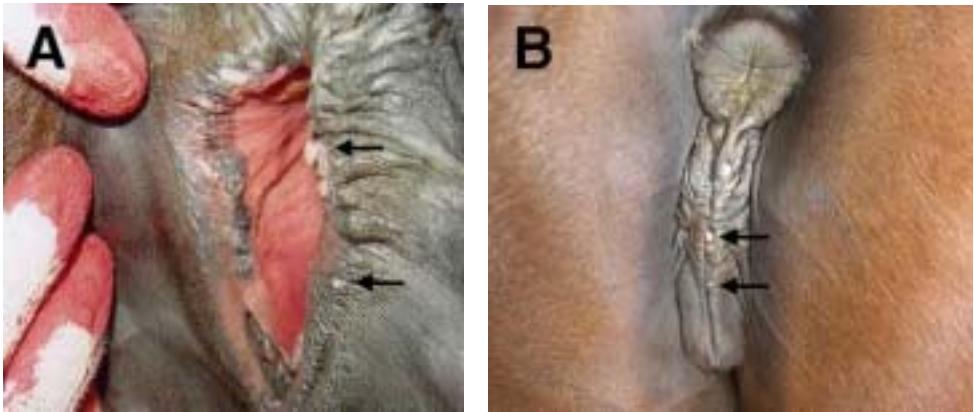


Fig. 1-4. Lesions of ECE on the vulva of a Thoroughbred broodmare.
A: Early stage of ECE, B: Late stage of ECE.

Table 1-4. Clinical signs of 45 Thoroughbred broodmares affected with equine herpesvirus type 3

Sites	Vesicles	Pustules	Scabs	Ulcers	Edema	White spots
Perineal region	+	+	+	+	-	+
Vulva	+	+	+	+	+	+
Mucocutaneous junction	++	++	++	++	++	++
Outer Vagina	+	+	+	+	+	+
Inner Vagina	-	-	-	+	+	-
Clitoral fossa	-	-	-	-	-	-
Udder	-	-	-	-	-	-
Hind Limbs	-	-	-	-	-	-
Abdomen	-	-	-	-	-	-

- : No sign detected, + : under 5 horses, ++ : 5~ 24 horses, +++ : over 25 horses



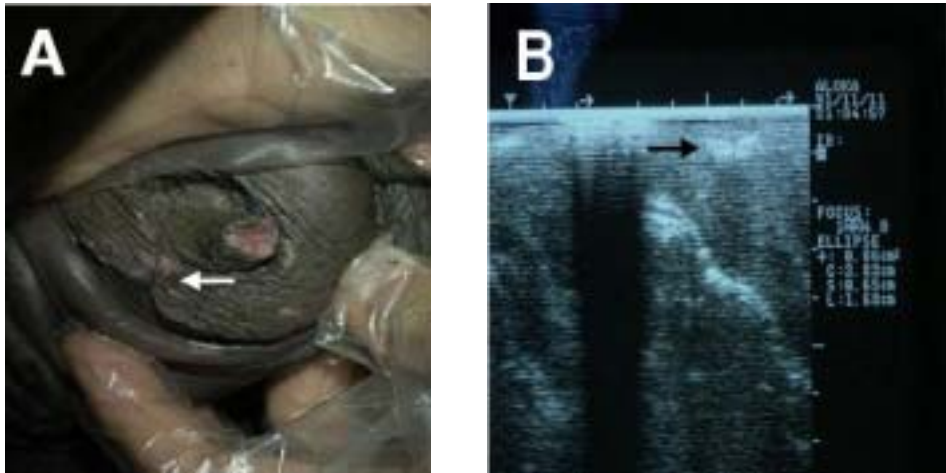


Fig. 1-3. Outbreak of laceration as a complication on the glans of a Thoroughbred stallion after covering. A: Laceration on a glans penis. B: Ultrasonograph of lacerated area on a glans penis.

Table 1-5. Libido test and complications of 7 Thoroughbred stallions affected with equine herpesvirus type 3

Affected stallions	Libido	Complications
KS I	+++	None
KS II	++++	laceration of glans
KS III	+++	None
KS IV	+++	None
PS I	+++	Gait disturbance of hind limbs
PS II	+++	Gait disturbance of hind limbs
PS III	+++	Gait disturbance of hind limbs

KS: Korea Racing Association's Stallion, PS: Private Stallion.

++: poor, +++: normal, ++++: exciting



2. 임상병리검사

1) 혈액학 검사

임상증상을 보이는 씨암말 456두에서 혈액상을 검사를 하였으나 정상인 말들의 총백혈구, 호염구, 호산구, 호중구, 임파구, 단구, 적혈구, 헤모글로빈, 적혈구용적률(hematocrit), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 적혈구분포폭(RDW), 혈소판 및 평균혈소판용적(MPV) 등은 정상치와의 차이는 없었다(표 1-6).

2) 내분비학 검사

임상증상을 보이는 씨수말 2두와 건강한 씨수말 8두에서 일부 혈중 호르몬을 검사하여 비교하였다. 임상증상이 있는 씨수말들에서 Testosterone과 LH 수치가 건강한 씨수말들에 비해 다소 높았으나 FSH, Estradiol 및 T₄는 약간 낮았다. 그러나 두 결과에 대하여 유의성은 나타나지 않았다(표 1-7).

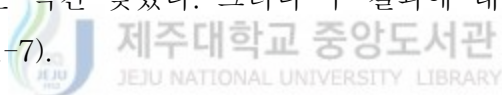


Table 1-6. Hemograms of 45 broodmares affected with equine herpesvirus type 3

Hemograms	Normal	Patients
	[Range or Mean (\pm SD)]	[Mean (\pm SD)]
Total WBC($10^3/\mu\ell$)	5.3 - 11 [*]	8.60 (\pm 1.81)
Basophils($10^3/\mu\ell$)	0 - 1 [*]	0.03 (\pm 0.03)
Eosinophils($10^3/\mu\ell$)	0 - 8 [*]	0.25 (\pm 0.15)
Neutrophils($10^3/\mu\ell$)	2.1 - 6 [*]	5.35 (\pm 1.42)
Lymphocytes($10^3/\mu\ell$)	1.7 - 5 [*]	2.80 (\pm 0.68)
Monocytes($10^3/\mu\ell$)	0 - 6 [*]	0.21 (\pm 0.18)
RBC($10^6/\mu\ell$)	9.35 (\pm 1.05) [†]	8.55 (\pm 0.96)
Hb(g/dl)	14.8 (\pm 1.3) [†]	14.33 (\pm 1.69)
HCT(%)	41.7 (\pm 3.8) [†]	37.87 (\pm 4.53)
MCV(fL)	44.7 (\pm 3.4) [†]	44.29 (\pm 2.29)
MCH(pg)	15.9 (\pm 1.4) [†]	16.77 (\pm 0.81)
MCHC(g/dl)	35.8 (\pm 1.4) [†]	37.43 (\pm 3.27)
RDW(%)	-	23.77 (\pm 0.83)
PLT($10^3/\mu\ell$)	80 - 397 [*]	178.22 (\pm 9.54)
MPV(fL)	-	8.30 (\pm 1.19)

WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width, PLT: platelet, MPV: mean platelet volume.

* Reference value on normal Thoroughbred mares(Robinson, 2003).

† Reference value on normal Thoroughbred adult horses(Morris, 1989).

Table 1-7. Comparison of mean hormone levels of 10 stallions

Hormones	Post-outbreaks	
	Normal	Patients
Testosterone(ng/ml)	0.13(\pm 0.04)	0.37(\pm 0.33)
LH(mIU/ml)	3.18(\pm 0.63)	4.01(\pm 2.65)
FSH(mIU/ml)	5.56(\pm 7.09)	3.38(\pm 2.03)
Estradiol(pg/ml)	11.10(\pm 3.24)	6.0(\pm 2.12)
T ₄ (μ g/dl)	12.30(\pm 1.28)	11.89(\pm 0.83)

Mean(\pm SD)



3. PCR 검사 및 역학조사

EHV-3의 gG gene을 확인하기 위해 1쌍의 primer를 사용하여 PCR 검사를 한 결과, 518 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다(그림 1-4).

임상증상을 나타내는 한국마사회 씨수말 2두(KS I 및 KS II)의 생식기 병변부위와 감염이 의심되는 2두의 생식기 부위를 면봉으로 채취하여 PCR로 검사한 결과 임상증상을 나타내는 2두에서만 바이러스가 검출되었고 임상증상이 없는(KS III 및 KS IV)에서는 음성이었다. 그리고 임상증상이 발현되어 교배거부를 당한 씨암말 45두에서는 29두가 PCR 검사 결과 양성반응이 나타났다(표 1-8).

씨암말에서 임상증상은 45두 중에서 10두가 교배하기 전에 나타났고 교배 후에 나타난 두수는 26두였으며 교배일자와 발병일을 확인 할 수 없는 말은 9두였다. PCR 양성의 말에서는 2두가 교배 전에 발병하였고 19두는 교배 후에 발병하였으며 나머지 9두는 알 수 없었다(표 1-9).

임상증상을 발현하는 한국마사회의 씨수말에서 PCR 검사를 통하여 최초 바이러스검출에서부터 비검출까지의 기간은 약 22~23일이었고 씨암말에서는 약 18~19일이었으며 *E. coli* 의심 세균이 혼합 감염된 씨암말에서는 약 58일간 바이러스를 배출하였다. 그리고 시정마의 비공에서는 임상증상은 관찰할 수 없었지만 PCR 검사를 한 결과 양성반응을 확인하였고 약 6일간 바이러스를 배출하였다(표 1-10).

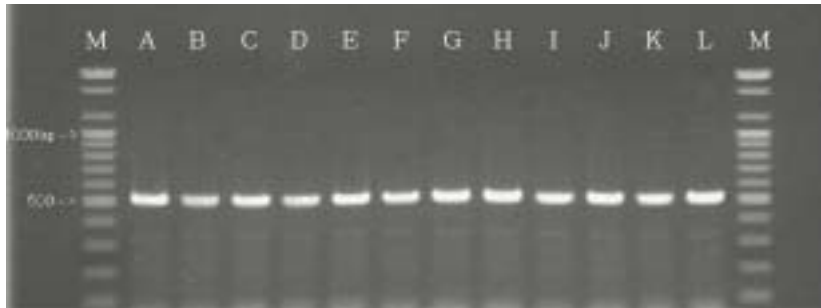


Fig. 1-4. Amplified PCR products of EHV-3 gG gene from field specimens. M : Molecular weight marker (100bp DNA Ladder), Lane A~L : Field samples.

Table 1-8. Detection of EHV-3 gene fragment using PCR from horses

Horses	No. of samples	No. of Positive	Positive rate(%)
KRA Stallions	4	2	50.0
Broodmares	45	29	64.4
Other(male)	1	1	100.0
Total	50	32	64.0

Table 1-9. Detection of EHV-3 gene fragment using PCR from pre and post covering broodmares

Covering	Pre-covering	Post-covering	Unknown
PCR	2	19	9
Clinical sign	10	26	9
Rate(%)	(22)	(58)	(20)

Table 1-10. Virus shedding period confirmed by PCR test in two stallions, three broodmares and teaser

Symbol of horses	First date detected	Last date detected	Virus shedding periods
KS I	APR. 8. 2005	APR. 30. 2005	around 22 days
KS II	APR. 23. 2005	MAY. 16. 2005	around 23 days
B	APR. 9. 2005	JUN. 6. 2005	around 58 days*
E	MAY. 18. 2005	JUN. 6. 2005	around 19 days
N	MAY. 4. 2005	MAY. 22. 2005	around 18 days
T I	MAY. 8. 2005	MAY. 14. 2005	around 6 days

* Co-infection with *E. coli*-like bacteria.

씨암말의 망아지들은 모두 포유 중인 상태였고 그들의 비공에서 면봉으로 시료를 채취하여 PCR 검사를 통하여 바이러스 검출을 시도하였으나 모두 음성이었다(표 1-11).

임상증상 결과만으로 말구진의 유무를 판단하였을 경우는 경주마 생산목장의 이환율은 10.6 %에 달하였고 PCR 검사로만 말구진의 유무를 판단하였을 경우는 9.4 %의 이환율을 나타내었다(표 1-12).



Table 1-11. Virus detection using PCR test from sucklings

Sucklings	Clinical signs	Sampling site	PCR
Sug	ND*	Nostril	N†
Sha	ND	Nostril	N
Est	ND	Nostril	N
Not	ND	Nostril	N
Cru	ND	Nostril	N

* ND: Not Detected, † N: Negative.

Table 1-12. Morbidity survey on affected breeding farms

	No. of broodmares	No. of positive	Morbidity Rate(%)
Clinical signs	416	44	10.6
PCR	305	29	9.5



4. 임신 검사

한국마사회 씨수말 4두에서 임신률을 비교하였다(그림 1-5). KS I에서는 발병 전에 66.6%, 발병 후에는 37.5%, KS II에서는 발병 전에 48.8%, 발병 후에는 0%, KS III에서는 발병 전에 75.5%, 발병 후에는 63.6% 그리고 KS IV에서는 발병 전에 67.8%, 발병 후에 70.0%의 임신률을 보였고 이들의 평균 임신률은 발병 전이 64.7%이고 발병 후에는 42.8%였다. 또한 KS I이 발병 전이 1.16회, 발병 후가 1.5회, KS II는 발병 전이 1.35회, 발병 후가 1.0회, KS III는 발병 전이 1.44회, 발병 후가 1.81회 그리고 KS IV는 발병 전이 1.64회, 발병 후가 1.75회로써 대부분 발병 후가 발병 전보다 더 많은 교배를 했음에도 불구하고 3두의 씨수말에서 발병 후가 발병 전보다 임신율이 낮았다.

한국마사회 씨수말에서 말구진을 치료한 후 귀두, 음경체 및 포피 등의 생식기에 병변이 없는 상태를 관찰하고 PCR 검사에서 음성을 확인하여 교배를 재개하였다. 그 후 교배대상 씨암말을 약 1개월간 관찰하였으나 말구진과 같은 임상증상이 나타난 말은 전무하였다(표 1-13).

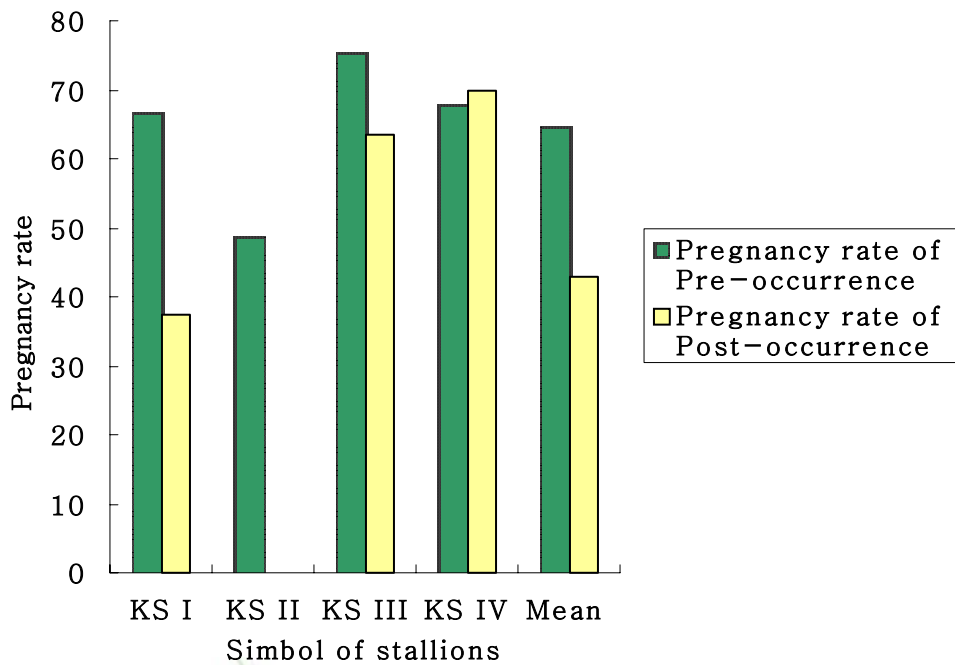


Fig. 1-5. Pregnancy rate by affected Stallions, carriers and all stallions. * Stallion covering time per broodmare(before and after ECE), KS I :1.16 and 1.5, KS II :1.35 and 1.0, KS III:1.44 and 1.81, KS IV:1.64 and 1.75.

Table 1-13. Occurrence of ECE in broodmares after treatment of infected stallions

Stallions	Breeding	Occurrence in broodmares
KS I	8	0
KS II	2	0
KS III	22	0
KS IV	40	0



IV. 고 찰

말구진은 EHV-3에 의한 급성 생식기 질병이면서 피부병이다(Bryans와 Allen, 1973; Colahan 등, 1991; Kobluk 등, 1995; Studdert, 1996; Colahan 등, 1999a). 심지어 암말의 유두와 포유하는 망아지의 주둥이, 입술(Craig와 Kehoe, 1921; Crandell과 Davis, 1985; Rooney와 Robertson, 1996; Reed와 Bayly, 1998), 비강점막(Savage, 1999; Ball, 2001; Lloyd 등, 2003) 및 결막에서도 병변을 관찰할 수 있고(Wilks와 Studdert, 1976) 때때로 심한 경우에는 암말의 후지에서도 관찰되는(Higgins와 Wright, 1995; Siegal 등, 1996) 등 임상증상이 다양하다(Studdert, 1996).

한국마사회 씨수말의 임상검사에서 소포, 농포, 궤양 및 가피 등의 병변은 귀두, 음경체 및 포피에 집중되었고 양후지에서는 관찰할 수 없었다. 그리고 carrier로 의심되는 2두의 씨수말에서는 어느 부위에서도 병변은 관찰할 수 없었다. 민간 씨수말에서는 소포, 농포, 궤양 및 가피 등의 병변이 귀두, 음경체 및 포피에 집중되어 나타났고 음낭에서 심한 부종을 관찰하였으나 양후지에서는 아무런 병변을 관찰할 수 없었다. 또한 Pascoe와 Knottenbelt(1999)는 임상증상을 심하게 나타낸 부위인 배측 포피는 교배 시 음순과 가장 오래 동안 접촉하는 부위라고 보고하였듯이 질병진과는 접촉이 중요한 인자라고 생각된다.

씨암말의 임상검사에서는 소포, 농포, 궤양 및 가피 등의 병변이 회음부, 음순 및 점막피부접합부에서 다수 발견되었고 유방, 양후지 및 복부에서는 병변을 발견할 수 없었다. 그러나, 음핵와(clitoral fossa)에서 병변은 관찰할 수 없었지만 PCR 검사에서 바이러스를 검출하였다. 이 부위는 오탁한 해부학적 구조이기에 뇨와 함께 바이러스가 저류되었다고 생각되고 교배 전에 행하여지고 있는 생식기 세척 시에 추가적으로 음핵와부분도 함께 세척한다면 감염기회가 감소될 수 있을 것이다. 그리고 본 연구에서

감염된 씨암말 중에서는 초지의 나무 또는 마사벽이나 울타리 등에 외음부 부위를 문지르는 것이 관찰되었다. 이 현상은 말구진의 병변은 통증보다는 소양감이 있다(Reed와 Bayly, 1998; Pascoe와 Knottenbelt, 1999; Scott과 Miller, 2003)는 견해와 일치하였다.

씨수말의 리비도는 성선자극호르몬에 의해 조절되는 반면에 GnRH 길항제의 사용으로 감소하고(Hinojosa 등, 2001) 또한 만성적인 GnRH의 사용으로도 감소한다(Boyle 등, 1991). Morrow(1986), Hawcroft(1994) 그리고 Higgins와 Wright(1995) 등은 씨수말이 EHV-3에 감염되면 리비도가 감소한다고 하였고 Hawcroft(1994), England(1996) 및 Hayes(2002) 등은 병변부위의 통증으로 인해 씨암말과 교배를 하지 않으려 한다고 하였으며, Evans 등(1982)은 음경의 병변은 발기불능의 원인이 된다고 하였으나 Robinson(1992)은 EHV-3의 감염은 씨수말의 리비도에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 또한 본 연구에서는 감염된 씨수말 5두 모두 리비도에는 영향이 없었고 일부 씨수말은 치유 후에 과도한 리비도를 나타내기도 하였다. 이는 수 일간 교배를 하지 못한 씨수말이 재교배를 하게 되어 리비도가 증가했을 것으로 생각되고, Bryans(1980)이 주장한 감염된 씨수말이 음경에 병변이 뚜렷한 경우에도 의욕적으로 교배를 원하기도 한다는 보고와 일치하였다.

말구진과 관련된 합병증은 씨수말 1두에서 교배 후 귀두 복측부에 열창이 있었고 이는 병변으로 인한 귀두의 피부가 손상된 상태 즉, 상처가 완전하게 치유되지 않은 상태에서 발기로 인하여 귀두부가 확장되었고 교배시 마찰에 의해 병변부위가 파열된 것으로 추정된다. 그리고 민간씨수말 3두에서는 보행장애가 관찰됐는데 이는 말구진이 발생한 생식기에 소독과 치료를 하지 않고 그대로 방치한 결과로 세균의 2차 감염에 의한 합병증으로 사료된다. 왜냐하면 임상검사 당시, 음경체 및 포피의 심한 부종과 발열을 관찰하였고 포피 내는 삼출물과 피지로 혼합되어 상당히 발적된 병변부를 확인할 수 있었다. 그 후 수돗물을 병변에 뿌려 세척하고 소독제로 치료하여 음경 및 포피의 부종이 감소하고 병변부가 회복되자 보행

장애는 소멸되었기 때문이다.

피부염 중에서 allergy가 원인일 경우에는 호염구가 말의 말초혈액에서 드물게 발견될지라도 그 수가 증가 하고 만성 화농성 및 육아종 염증일 경우에는 단핵구증가증이 나타난다(Eades와 Bounous, 1997). 염증 혹은 감염성 질환일 경우에는 호중구의 수가 증가하고 회복되면 그 수가 감소 하며, 대량의 항체를 생성하고 있을 때에는 임파구 수가 증가한다(Siegal 등, 1997). 그러나 말구진의 임상증상을 나타내는 씨수말과 씨암말에 대하여 혈액을 검사하였으나 정상적인 성마와 비교하여 혈액상에 특이적인 변화를 관찰 할 수 없었다. 이와 같은 결과를 토대로 판단하였을 경우 EHV-3는 말의 전신에 미치는 영향은 미약한 것으로 사료된다. 이는 국소감염 때문이고 바이러스 혈증은 유발되지 않기 때문이며 백신개발 및 진단키트 개발을 위해서 더 연구할 필요가 있다.

씨수말에서 갑자기 리비도가 감소하면 건강을 의심할 수 있고 발기부전을 보이면 말구진에 감염되었다는 힌트를 얻을 수 있다. 씨수말이 리비도가 감소하면 자연교배가 불가능하기에 리비도 관리는 매우 중요하다 (Blanchard, 2003). 호르몬 검사에서 환마 및 보균상태의 씨수말이 건강한 씨수말들보다 testosterone 및 LH 수치가 다소 높았다. 또한 병변의 통증으로 인해 교배에 영향을 미치게 되면 임신에 지장을 초래하기에 리비도와 통증의 관리는 중요하다(Blanchard, 2003).

전형적으로, EHV-3에 감염된 씨암말이 교배와 동시에 씨수말에게 바이러스를 전파하고 그 씨수말은 임상증상이 발현되기 전에 감수성 있는 다른 씨암말에 교배를 통하여 감염시킨다(Blanchard 등, 1992). 그러나 carrier 상태로 남는 것은 불명확하고 일부 견해들은 치유 후의 가피는 잠재적 carrier로 확인되었으나 그 이외의 상태에서는 무증상 carrier로 작용하는지는 불확실하다(Aiello 등, 1998). 그러나 Ball(1997)과 Ball(2001)은 herpesvirus가 일반적으로 잠복감염을 하지만 말구진을 유발하는 EHV-3에 대하여 보균 또는 잠복감염을 한다는 보고 자료는 없다고 하였다.

말구진의 역학적 특징은 생식기 병변과 비강에서 채취한 시료를 PCR

검사를 통하여 다양한 결과를 얻을 수 있었다. 씨암말 327두 중에서 45두가 임상증상을 나타내었다. 그리고 이 중에서 PCR을 이용한 검사에서 28(62.2 %)두가 양성을 나타내었다. 발병시기를 살펴보면 45두 중에서 10두는 교배를 하기 전에 이미 증상을 발현하였고 26두는 교배를 마친 후에 임상증상이 나타났으며 9두는 교배시기와 발병시기의 관계를 알 수 없었다. Gibbs 등(1972)은 파리, 바이러스에 오염된 교배기구 및 손 등에 의해 바이러스가 전파된다고 하였고, 정액채취를 위한 인공질에 접촉으로도 감염되며(Metcalf, 2001) Krogsrud와 Onstad(1971)는 교배를 하지 않은 상태에서도 말구진이 발생하였다고 보고하였는데 본 연구에서도 감염 씨수말과 교배를 하지 않은 암말에서 임상증상이 발현하였고 씨수말의 임상증상 발현 시기보다 4주 이상 먼저 교배한 암말에서도 임상증상이 발현한 것으로 보아 이는 간접적인 접촉으로 바이러스가 전파된 것으로 사료된다. 일부 민간 씨수말과 씨암말을 보유한 생산농가에서는 씨수말 전 두수와 거의 모든 씨암말에 임상증상이 나타났다. 이 현상은 초기 감염경로는 확인되지 않았으나 EHV-3에 감염된 씨암말이 씨수말과 교배를 통하여 바이러스를 전파하였고 감염된 씨수말이 잠복기를 거치거나 병변을 확인 못한 상태에서 다른 씨암말과 교배 혹은 수의사의 직장검사나 교배기구에 의한 간접접촉으로 씨암말에 감염되어 발병한 것으로 사료된다.

한 연구에 의하면, 실험적으로 감염시킨 EHV-3는 접종 후 9일까지 분리되었다(Studdert, 1996). 본 연구에서는 PCR 검사로 확인한 결과, 자연 발병 씨수말 중 KS I은 최초 분리에서 22일까지 배출하였고 KS II는 23일까지 배출하였다. 그리고 2두의 씨암말에서 바이러스 배출기간은 18일에서 19일이었고 씨수말보다 다소 짧았다. 이는 씨수말이 씨암말보다 더 심각하게 증상을 발현하는 경우가 있다(Gibbs 등, 1972)는 견해와 유사하다. 또한 1두에서는 세균(Gram negative bacillus)의 2차 감염으로 인해 4주 이상 임상증상이 나타났고, 58일 동안 바이러스를 배출하여서 2개월 동안 교배를 할 수 없었다.

말구진은 말에서 말로 교배접촉을 하지 않고서 접촉만으로도 직접 전파

되기도 한다(Ball, 1997; Savage, 1999; Ball, 2001). 본 연구에서는 시정마의 비공에서 PCR을 이용하여 바이러스의 DNA를 검출하였다. 그러나 임상증상은 나타나지 않았고 교배기간 내내 임상증상은 관찰할 수 없었다. 시정마는 수의사나 교배기구 등과의 간접접촉은 없기 때문에 감염된 씨암말과 시정하는 동안 직접접촉으로 전파되었다고 생각된다. 시정하는 동안 씨암말과의 접촉은 비공보다는 구강 내 기관이 많다. 그러나 구강 내에서는 검출하지 못한 원인은 타액 속의 amylase에 의한 바이러스 envelope의 당단백질이 불활화 되었거나 구강 내의 온도가 비강보다 높았기 때문이라고 생각된다. 만약 미약한 온도차에도 바이러스가 불활화 된다면 교배 전 씨암말의 외부생식기 세척 및 소독과 교배 후 행하여지는 씨수말의 생식기 소독은 고온의 세척제를 이용하는 것이 소독의 효과를 높일 수 있다고 생각된다. 그리고 시정마의 비공도 소독을 함으로써 전파기회를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

임상증상을 나타내는 씨암말의 포유망아지에서는 임상증상을 찾을 수 없었고 비공에서 면봉을 이용한 후 PCR 검사에서 바이러스는 검출할 수 없었다. 이는 씨암말에서 유두 및 후지에서 병변을 발견할 수 없었던 것 과도 일치되는 결과였다. 그래서 망아지가 carrier로 작용하기는 어렵다고 생각되나 시정마는 carrier로써 질병을 전파시킬 가능성이 충분하다고 사료된다.

Wilks와 Studdert(1976)의 연구에서는 망아지의 비공에 EHV-3를 접종하자 5일간 궤양과 농포를 관찰하였고 7일까지 풍부한 점액화농성 비루가 관찰되었다. 또한 EHV-2와 EHV-3를 먼저 비강으로 감염시키면 EHV-1의 비말감염을 예방할 수 있다고 주장하였다.

말구진의 이환률은 임상증상을 나타내는 생산목장에서는 10.6 %에 달하였고 PCR 검사에서 양성으로만 기준을 설정하였을 경우는 9.4 %의 이환율을 나타내었다.

사람에 감염되는 Herpesvirus는 널리 퍼져있으며 최초감염이거나 급성 혹은 불현성 감염일지라도 일반적으로 잠복감염을 유발하고 바이러스와

숙주의 면역기전의 균형에 의해 잠복상태가 유지된다(Dimmock과 Primrose, 1994). 바이러스는 감염된 말에 잠복 감염될 가능성이 있고 때로는 자발적으로나 면역장애가 있는 말에 재발한다(Pascoe와 Bagust, 1975). 잠복감염 중인 바이러스가 다양한 스트레스로 인해 산발적으로 재활성화 되고 그에 따라 항체 역가가 증가한다(Lemaire 등, 2000). 세균에 의한 심한 2차감염이 발생한 경우에는 전신적인 질환이 되기도 하고 삼출물과 부종이 관찰된다(Hawcroft, 1994; England, 1996; Hayes, 2002).

바이러스의 양이 많을 경우에는 임상형으로 발전하고 적을 경우에는 준임상적 감염이 일어난다(Bryans와 Allen, 1973). KS II와 교배를 마친 씨암말 2두가 임신이 되지 않아 재교배가 필요하였으나 KS II의 발병으로 인해 다른 씨수말인 KS III 및 KS IV와 교배를 하였다. 그러나 그 둘 씨수말에서는 임상증상이 나타나지 않았고 PCR 검사에서도 음성이었다. EHV-3 감염은 모든 경우에서 임상형으로 나타나지는 않는다. 그러나, KS III와 교배한 씨암말에서는 말구진이 발증하였고 PCR로 확인한 결과는 양성이었다. 이는 교배로 감염되었는지 아니면 기계적 접촉에 의해 감염되었는지는 정확히 알 수 없지만 발병농가의 상태와 담당 수의사의 상태를 분석해본 결과 교배에 의해 발병되었음이 추정되었다. 그 이유는 발병농가에서는 오로지 그 씨암말에만 발증하였고 담당수의사가 맡고 있는 농가 중에서는 오로지 그 경주마 생산농가에서만 발생하였기 때문이다. 뿐만 아니라, 교배를 하고나서 1차 임신검사기간(약 17일)까지는 수의사의 접촉이 없었다.

Brown과 Bertone(2002)는 늙은 암말에서는 임신말기 또는 분만직후에 말구진이 재발하기도 하다고 주장하였다. 한 씨암말은 분만 후에 임상증상을 나타내었는데 분만스트레스로 인하여 잠복 감염되었던 바이러스가 재활성화 되었는지 새로운 감염인지는 불명확하지만 그 생산농가에서는 유일한 발생 예이기에 재활성화된 것으로 추측된다. Higgins와 Wright(1995)의 연구에서는 EHV-3가 재활성화 되면 말구진이 재발한다고 하였으나 Ball(1997)과 King(2002)에 의하면 다른 herpesvirus처럼 보

균 혹은 잠복감염을 일으키지 않는다고 하였다.

EHV-1은 신경절에서 잠복감염하고 재활성화 된다고 알려져 있다 (Slater 등, 1994). Aiello 등(1998)은 EHV-3에 대한 면역은 짧지만 한 번 식시즌 내에서 씨수말은 재발되지 않는 것 같다고 보고하였다. 본 연구에서도 임상증상을 발현한 모든 씨수말에 대해서 말구진의 재발은 나타나지 않았다.

바이러스 감염은 임신에 영향을 끼치지 않고 감염에서 회복된 씨암말에서 지속적인 불임은 관찰되지 않는다(Higgins와 Wright, 1995; Knottenbelt와 Pascoe, 1997). Pascoe(1981)는 EHV-3에 감염되어 증상을 나타내는 씨수말과 교배한 씨암말에서의 임신률은 정상이라고 보고하였고 Gleeson 등(1976)은 실험적으로 임신한 암말의 자궁 내로 EHV-3를 주입하여 감염시킨 결과 말구진이 암말에 발생하지도 않았고 바이러스가 분리되지도 않았다고 하였다. 본 연구에서 EHV-3에 감염된 씨수말의 임신률을 조사해본 결과 KS I에서는 감염 후의 임신률(37.5 %)이 감염 전(66.7 %)보다 낮았으나 임신여부에는 지장을 주지 않았고, KS II의 경우는 감염 전의 임신율이 48.8 %이었으나 회복되어 씨암말 2두와 교배를 하였는데 임신이 되지 않았다. 이는 임신에 영향을 주는 요인들이 매우 많기 때문에 오로지 말구진의 영향이라고 단정 짓기는 어렵다.

자연감염에서는 유산에 영향을 주었다는 보고는 없고 모마가 EHV-3에 감염되었으나 포유하기 전의 신생망아지에서 EHV-3에 대한 항체를 발견할 수 없었다(Bagust 등, 1972)는 견해와 관계가 있다. 결국 자연상태에서 말구진은 viremia를 유발하지 않기 때문에 태반감염은 이루어지지 않는 것으로 사료된다. 그러나 추후에도 계속 생산률을 추적 조사하여 유산 및 사산 유발여부도 관찰하는 것이 필요하고 생각된다.

말구진의 전파를 방지하기 위한 방법으로는 교배를 금지하는 방법 (Kobluk 등, 1995)이 가장 좋은 예방책이긴 하지만 제한된 교배 또는 계절번식동물인 말에서 짧은 발정기간에 교배가 불가능해지면 망아지생산에 악영향을 미치게 된다. 신속하고 정확한 진단으로 말구진이 전파되는 것

을 예방하고 교배에 차질을 주는 요인들을 제거하는 것이 최우선으로 해결 되어야하는 문제이다.

이상의 결과를 종합해보면, 말구진의 임상증상은 한국마사회 씨수말에서는 귀두, 음경체 및 포피 등에서 수포, 농포, 가피, 궤양, 부종 및 백점 등이 관찰되었고 음낭 및 후지에서는 병변을 거의 찾을 수가 없었다. 민간 씨수말에서는 한국마사회 씨수말과 비슷한 병변분포를 보였으나 부종이 뚜렷한 게 특징이었다. 씨암말에서는 회음부, 음순, 질점막 피부접합부 및 외측질에서 수포, 농포, 가피, 궤양, 부종 및 백점이 관찰되었고 내측질, 음핵와, 유두, 후지 및 복부에서는 어느 병변도 관찰할 수 없었다. 또한 포유망아지와 시정마에서는 아무런 임상증상을 관찰할 수 없었다. 씨수말의 리비도는 발병전후 비슷한 양상을 나타냈고 한국마사회 씨수말 1두에서는 귀두열창 그리고 민간씨수말 3두에서는 보행곤란의 합병증이 관찰되었다. 병력을 청취한 결과 병변소독을 전혀 하지 않아서 세균의 2차 감염으로 인해 염증에 의한 통증과 부종이 나타났다. 임상증상을 보인 말이 증상을 나타내지 않은 말보다 Testosterone과 LH가 높았고 FSH, Estradiol 및 T₄는 낮았다. PCR 기법을 이용하여 바이러스의 DNA를 검출한 결과 한국마사회 4두 중 2두에서 양성반응이 나타났고 씨암말 44두 중에서 28두가 양성반응을 나타냈다. 그리고 포유망아지의 비공에서 추출한 면봉에서는 음성반응이었으나 시정마의 비공에서는 양성반응이 나타났기에 무증상 carrier로 작용할 가능성이 있다고 판단된다. 발병 시기를 살펴보면, 교배하기 전에 발병한 암말이 임상증상만으로 진단하였을 경우는 10두(22%), PCR 검사에서 양성으로 기준하였을 경우는 2두에서 발생하였기에 교배접촉이 아닌 방법을 통해서 전파됐다고 생각된다. 씨수말의 바이러스 배출기간을 확인한 결과 최초분리에서 분리가 안 될 때까지의 기간은 22일과 23일이 소요됐고 씨암말에서는 18일과 19일이 소요됐다. 그리고 심한 임상증상으로 병변이 지속됐던 1두에서는 58일 동안 분리되었고 세균의 2차 감염에 의한 합병증으로 판단된다. 임상증상이 있는 씨암말을 양성으로 하였을 경우 416두 중에서 44두가 양성이기에 10.6 %의

이환율을 나타냈고 PCR 검사의 양성을 기준으로 하였을 경우 305두 중에서 28두가 양성이었기에 9.5 %의 이환율을 나타냈다. 임신검사에서는 PCR 양성을 나타낸 씨수말 2두에서는 발병전의 임신율이 발병후보다 높았다. 그리고 carrier로 의심되는 씨수말 2두 중 1두는 발병전이 높았으나 1두는 발병후가 높았다. 그리고 이들 4두는 전체 임신율보다 다소 낮았다. 그리고 씨수말에서 말구진 치료 후 교배한 결과 교배대상 씨암말에서는 아무런 임상증상이 나타나지 않았다.



V. 결 론

국내의 Thoroughbred 씨수말 및 씨암말에서 발병한 말구진의 임상적 및 역학적 특징을 규명하기 위하여 임상증상 유형, 리비도, 합병증, 정상마와의 혈액학 및 호르몬 수치 비교 및 PCR 검사를 이용한 양성여부 판별과 교배 전 발병두수와 교배 후 발병두수 비교, 바이러스 배출기간 조사, 이환율, 발병전후의 임신에 미치는 영향을 파악하고 치료 후 교배를 통한 감염여부를 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국마사회 씨수말 24두 중에서 2두와 민간 씨수말 3두 중에서 3두가 임상증상을 나타내었다. 씨암말 327두 중에서 45두가 임상증상을 나타내었고 포유망아지 및 시정마에서는 임상증상을 관찰할 수 없었다.

2. 씨수말 2두의 병변은 귀두, 음경체 및 포피에 집중되어 수포, 농포, 가피 및 궤양 등이 나타났고 치료 후에는 탈색된 반점이 남았다. 씨암말 45두의 병변은 회음부, 음순 및 점막피부접합부에 국한되었고 수포, 농포, 가피 및 궤양 등을 관찰하였으며 치료 후에는 탈색된 반점이 남았다.

3. 말구진은 씨수말의 리비도에는 영향을 미치지 않았으나 1두에서 귀두열창 및 3두에서 보행장애 등의 합병증이 관찰되었다.

4. 임상증상을 보이는 씨수말 2두와 감염이 의심되는 2두 중에서 PCR 검사를 통하여 임상증상이 있는 말 2두(50%)에서만 바이러스를 검출하였고, 임상증상이 있는 씨암말 45두에서는 PCR 검사에서 29두(64.4%)가 양성이었다.

5. 씨수말과 교배하기 전에 임상증상을 보인 씨암말은 10두(22%)였고 교배 후에 증상이 나타난 씨암말은 26두(58%)였으며 교배시기와 발병시기가 불명한 씨암말은 9두(20%)였다.

6. 씨수말에서 EHV-3의 배출은 최초검출에서 미검출 될 때까지의 기간이 22~23일이었고 씨암말에서는 18~19일이었으며 세균(*E. coli*) 감염이 의심되는 씨암말 1두에서는 임상증상의 지속과 함께 약 58일까지 바이러스가 검출되었다.

7. 포유망아지의 비공에서는 임상증상을 관찰할 수 없었고, PCR 검사에서 바이러스도 검출할 수 없었다.

8. 시정마 1두에서는 아무 병변이 없었으나 비공에서 PCR 검사에서 EHV-3가 검출되어 무증상 carrier로 작용 할 가능성이 있었다.

9. 생산농가에서 관리되는 씨암말 416두 중에서 임상증상이 나타난 말이 45두로 이환율은 10.5%였고, PCR 양성인 말이 관리되는 305두 중 29두가 PCR 검사를 통한 양성이어서 9.5%의 이환율을 보였다.

10. 감염된 씨수말은 임신능력에는 영향이 없었고, 병변치유 후에 교배를 하여도 교배 상대마에서 말구진과 같은 임상증상은 관찰할 수 없었다.



제 2 장

Equine herpesvirus type 3 분리 및 특성



I. 서 론

Herpesvirus 무리에는 사람을 포함하여 동물에 중요한 질병을 일으키는 바이러스들이 다수 있고 말과동물[馬科動物]에서는 현재까지 총 9 종류가 확인되었다(Ostlund, 1993; Studdert, 1996; Fukushi 등, 2000).

EHV-1에서 EHV-5까지는 말에 질병을 유발하고, EHV-6, 7 및 8은 asinine herpesviruses(AHV) 1, 2 및 3라고도 명명하며 당나귀의 생식기 질환이나 비염 등의 문제를 일으킨다(Ostlund, 1993). EHV-1은 Alphaherpesvirinae에 속하고 임신말의 유행성 유산, 출생전후 망아지의 폐사, 호흡기 감염, 각막염 및 안면마비 등의 신경질환을 유발하는 등 말에 다양한 병리학적 상태를 야기하는 바이러스이며(Allen과 Bryans, 1986; O'Callaghan 등, 1993) 숙주의 면역계에 침입하여 면역저하를 유발하고 잠복감염하기에 일생동안 발병이 반복된다(Robinson, 2003). 최근 미국과 캐나다에서 새로운 신경형 EHV-1 감염증이 발생하여 경제적인 피해를 주고 있다(Church, 2005; Herbert, 2005).

EHV-4는 Alphaherpesvirinae에 속하고, 1~2세의 망아지에 비폐렴과 같은 급성 상부호흡기 질환을 가장 흔하게 유발하며, 증상이 미약한 결막염의 원인이 될 뿐만 아니라 산발적으로 유산을 일으키고(Ostlund, 1993) 어린 말에서 100 %의 감염률을 나타내었다(Robinson, 2003). EHV-1과 EHV-4는 전 세계적으로 말과 관련된 산업에 경제적으로 나쁜 영향을 끼치는 중요한 원인 바이러스이고, 1929년 미국 켄터키 지방에서 유행성 유산을 유발하면서 최초로 분리되었다(Allen과 Bryans, 1986; Coggins, 1991; Matsumura 등, 1992; Ostlund, 1993; Crabb과 Studdert, 1995).

EHV-2는 Gammaherpesvirinae로 분류하고 있고 임상적으로 건강한 말의 혈액에서 분리될 만큼 마군에 넓게 퍼져있으며 일반적으로 비병원성이라고 알려져 있다. 그러나 최근 연구에 의하면 EHV-2와 망아지의 호흡

기 질환에서 연관성이 있다는 것이 보고되었고(Kemney와 Pearson, 1970; Browning과 Studdert, 1987; Welch 등, 1992; Mair, 1999; Barr, 2003; Robinson, 2003) 결막염과 궤양성 및 비궤양성 각막염, 면역저하 및 poor performance syndrome과 연관이 있다고 알려졌다.

EHV-5 역시 Gammaherpesvirinae로 분류하고 있고 호흡기 질환을 유발한다고 추정하고 있으나 자세하게 연구된 보고는 없다(Robinson, 2003).

한편, 당나귀의 바이러스인 AHV-1는 EHV-3와 연관성이 있으나 당나귀의 구진 병변에서 분리한 바이러스의 DNA와 EHV-3의 DNA는 명확히 다르다는 것이 증명되었다(Jacon 등, 1988). AHV-2는 EHV-2와 관련이 되며, AHV-3는 EHV-1과 연관성이 있다고 알려졌다(Studdert, 1996). 그리고 근래에는 산양 및 영양에 비화농성 뇌염을 유발하는 Gazelle herpesvirus 1이 분리되었고, EHV-1 및 EHV-8과 95%의 상동성을 보여 EHV-9이라 명명하였으며(Fukushi 등, 1997) 실험적으로 말 뿐만 아니라 개, 고양이, 햄스터 및 돼지에서도 뇌염 및 신경교증(gliosis) 등의 신경병변을 유발한다(Fukushi 등, 2000; Narita 등, 2000; Taniguchi 등, 2000a,b; Narita 등, 2001; Yanai 등, 2003a,b). 그러나 최근에 얼룩말(Burchell's zebra)에서 바이러스 특이중화항체 검사법을 이용하여 EHV-9에 대한 항체를 발견하였기에 말도 자연 숙주임을 확인하였다(Borchers 등, 2005).

EHV-3는 생물학 및 물리화학적 특성에 근거하여 EHV-1, EHV-4, herpes simplex virus, bovine herpesvirus 1, 2 및 5, caprine herpesvirus 그리고 canine herpesvirus처럼 Alphaherpesvirinae의 varicellovirus 속(屬)에 속한다. 150nm의 크기와 162개의 capsomers로 구성되고, 대칭형 정20면체의 envelope 바이러스이다. 전사효소는 없으며 지질용해제나 56℃에 30분간 노출되면 신속히 불활화되고 동물의 신체 이외의 장소에서는 생존하기가 어렵다(Sullivan 등, 1984; Studdert, 1996). Genome은 96.2 ± 0.48 MDa를 함유하는 linear double stranded DNA이고 크기는 148 kb이며 type D의 구조를 가지고 있다. 염기구성은 G+C 함량이 66 mol%로서 각각 57 mol%인 EHV-1, 2, 4 및 5에 비해서 가장 높다(Lugwig 등,

1971; Sullivan 등, 1984; Roizman 등, 1992; Studdert, 1996). 또한 EHV-3 DNA의 부유밀도는 1.725 g/cm^3 로써 1.716 g/cm^3 인 EHV-1과 EHV-2와는 다르다(Soehner 등, 1965; Lugwig 등, 1971; Wharton 등, 1981). EHV-3 DNA는 2개의 isomeric form이고 EHV-1(Henry 등, 1981; O'Callaghan 등, 1983; O'Callaghan 등, 1981; Ruyechan 등, 1982), pseudorabies virus(Stevly, 1977; Ben-Porat 등, 1979), varicella-zoster virus(Dumas 등, 1981; Straus 등, 1981; Straus 등, 1982) 그리고 bovine herpesvirus type 1(Mayfield 등, 1983) 등의 genome들과 분자구조가 유사하다. EHV-3는 EHV-1과 형태적으로 구별이 불가능하고 많은 생화학 및 구조적 소견들을 공유하지만 생물학, 물리화학 및 면역학적 특성 등은 확연히 다르다(Darlington 등, 1963; Studdert, 1974). EHV-3는 유산, 호흡기 질환 및 신경질환을 유발시키는 EHV-1과 EHV-4 및 EHV-2와는 항원적으로도 성질이 다르다(Girard 등, 1968; Gibbs 등, 1970; Gibbs 등, 1972; Pascoe와 Bagust, 1975)고 하였으나 일부의 연구에서는 직·간접면역형광법, 면역확산법, 보체결합법 및 혈청중화반응법을 이용한 실험에서 EHV-1과 EHV-3는 공통항원을 공유하고 있다(Gutekunst 등, 1978)고 하였다.

EHV-3가 질의 점막표면에 심한 병변을 발생시키지만 생식기도(reproductive track)의 상피표면에는 병변이 없는데 이는 바이러스의 온도민감도와 연관된 것으로 알려져 있다(Jacob, 1986; Jacob 등, 1986; Jacob과 Steiner, 1988). 세포배양에서, 39°C 이상의 온도는 EHV-3의 복제를 허용하지 않지만 34°C 에서는 바이러스를 최대로 획득할 수 있다. 이는 EHV-3가 viremia를 유발하지 않고 또한 자연감염에서의 유산과 연관이 없는 이유를 설명해준다(Jacob 등, 1986).

다른 Alphaherpesvirus와 배양세포를 비교해보면, EHV-1의 초대배양 세포는 equine kidney cell(McCollum 등, 1962; Bryans와 Allen, 1973; Studdert, 1974), ovine kidney cell(McCollum 등, 1962), porcine kidney(McCollum 등, 1962), dog embryo cell(Plummer 등, 1969), cat

kidney cell(Plummer 등, 1969), rabbit kidney cell(Plummer 등, 1969; Allen과 Bryans, 1974; O'Callaghan 등, 1978), hamster embryo fibroblast cell(O'Callaghan 등, 1978) 및 mouse embryo cell(Plummer 등, 1969)에서 배양이 가능하지만 EHV-3는 오로지 equine kidney cell에서만 증식이 가능하였고(Bryans와 Allen, 1973; Studdert, 1974) AGMK cell(African green monkey kidney)(Bryans와 Allen, 1973), BEK cell(bovine embryo kidney)(Bryans와 Allen, 1973), ovine kidney cell(Bryans와 Allen, 1973), porcine kidney cell(Bryans와 Allen, 1973), rabbit kidney(Plummer 등, 1969; Allen과 Bryans, 1974; O'Callaghan 등, 1978), HK(hamster kidney cell(Bryans와 Allen, 1973) Mouse(BALB/C) cell(O'Callaghan 등, 1978) 및 Chick embryo fibroblast cell(Bryans와 Allen, 1973)에서는 증식하지 않았다.

또한 cell strains 및 cell lines를 살펴보면 EHV-1은 말 유래세포인 Kentucky equine dermis[KyED] cell(Bryans와 Allen, 1973; O'Callaghan 등, 1978), 말 종양세포인 Equine transitional cell carcinoma[ETCC] (Bryans와 Allen, 1973; Allen과 Bryans, 1974; Allen과 Bryans, 1976; O'Callaghan 등, 1978), 사람 유래세포인 HeLa cell(Randall과 Lawson, 1962; Darlington과 James, 1966; Bryans와 Allen, 1973) 및 KB cell(Bryans와 Allen, 1973), 원숭이 유래세포인 MK2 cell(Plummer 등, 1969; Bryans와 Allen, 1973), Vero cell 및 BSC cell(Bryans와 Allen, 1973), 소 유래세포인 MDBK cell 및 토끼유래세포인 RK-13 cell(Bryans와 Allen, 1973; O'Callaghan 등, 1978), 햄스터 유래세포인 BHK21 cell(Darlington과 James, 1966; Bryans와 Allen, 1973; Jamieson 등, 1974), 마우스 유래세포인 LM cell(Randall과 Lawson, 1962; O'Callaghan 등, 1968; O'Callaghan 등, 1978) 및 3T3 cell(Plummer 등, 1969) 등이 있다. 그러나 EHV-3는 말 유래세포인 KYED cell(Bryans와 Allen, 1973; O'Callaghan 등, 1978)과 말 종양세포인 ETCC(Bryans와 Allen, 1973; Allen과 Bryans, 1974; O'Callaghan 등, 1978)에서만 증식하였을 뿐 HeLa

cell(Randall과 Lawson, 1962; Darlington과 James, 1966; Bryans와 Allen, 1973), HEp2 cell 및 WI-38 cell(Bryans와 Allen, 1973), MK2(Plummer 등, 1969; Bryans와 Allen, 1973), MDBK cell(Bryans와 Allen, 1973; O'Callaghan 등, 1978), RK-13 cell(Bryans와 Allen, 1973; O'Callaghan 등, 1978), BHK21 cell(Darlington과 James, 1966; Bryans와 Allen, 1973; Jamieson 등, 1974) 및 LM cell에서는 증식하지 않았다(Randall과 Lawson, 1962; O'Callaghan 등, 1968; O'Callaghan 등, 1978). 그리고 Pascoe 등(1969)과 Kamada 및 Studdert(1983)도 EHV-3는 말 유래세포에서만 증식한다고 보고하였다.

Equine fetal kidney cell에 접종하여 6일 후에 직경 1cm의 큰 plaque를 관찰할 수 있기 때문에 EHV-1 및 EHV-4와 쉽게 구별된다(Studdert, 1974). 몇몇 gB와 gD 등의 당단백질은 바이러스 복제에 필수적이지만 반면 gE와 gI와 같은 당단백질은 복제와 무관하다(Neidhardt 등, 1987; Balan 등, 1994; Dingwell 등, 1994; Rebordosa 등, 1996; Matsumura 등, 1998).

따라서 말구진의 원인바이러스인 EHV-3의 분리와 특성파악을 위하여, 배양세포접종을 통한 증식여부를 관찰과 분리바이러스의 gG protein을 coding 하는 DNA Sequencing 분석을 통한 표준주와의 상동성(homology)의 조사, 전자현미경 검경을 통한 형태적 관찰 및 전기영동을 통한 단백질의 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스 배양

1) 세포배양

세포배양은 소 신장유래 MDBK cell(KCLB 10022)과 토끼 신장유래 RK-13 cell(ATCC 174)을 사용하였다. MDBK cell의 배양액은 α -Modified Eagle's medium(α -MEM)에 fetal bovine serum(FBS)를 10% 되게 가하고, penicillin(200IU/ml), streptomycine sulfate(200 μ g/ml), kanamycin(200 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였고, RK-13 cell의 배양은 10% FBS, penicillin(100IU/ml), streptomycine sulfate(100 μ g/ml), amphoterin B(2.5 μ g/ml), 0.1mM sodium pyruvate, 0.1mM nonessential amino acids, 1.5g/l sodium bicarbonate가 첨가된 α -MEM을 사용하였다. 모든 세포는 플라스틱 배양병(Corning, Mexico)을 이용하였고, 5% CO₂ 분압, 37°C 환경 하에서 배양하였다.

2) 바이러스 배양 및 분리정제

위의 세포를 배양하여 계대 24시간 후에 약 80% sheet를 확인하고 변병에서 채취한 면봉을 α -MEM에 담근 후 배지 1 ml을 집종하여 세포가 변성, 탈락되는 것을 확인 하였다. 바이러스의 회수는 배양병을 동결과 해동을 3회 반복하고, 8000×g, 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 20,000rpm에서 2시간동안 고속원심분리를 실시하였다. 고속원심분리를 통해 얻은 침전물은 phosphate buffered saline(PBS)에 하룻밤동안 다시 부유시키고 sucrose gradient ultra centrifuge(SGUC, 14,8000×g)를 2시간동안 실시하여 바이러스를 정제 하였다. 회수된 분획은 당도계를 이용하여 당도를 확인하고 PCR을 통해 type을 확인한 후 각 실험에 사용하였다.

2. DNA 염기서열분석

RK-13 cell에서 분리한 EHV-3 gG의 DNA 염기서열 분석은 ABI 3730XK (Big Dye Chemistry, USA)를 이용하였으며 미국립보건원 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에 등록되어있는 EHV-3 334/74 strain과 비교하였다.

3. 전자현미경 관찰

분리된 바이러스를 정제한 후 2 % potassium phosphotungstate 용액 (pH 6.8)과 동량으로 혼합하여 formvar-carbon coated grid에 mounting 하여 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 관찰하였다.

4. 단백질 분석(SDS-PAGE)

SDA-polyacrylamide gel을 제조하기 위한 시약은 SDS-PAGE를 위해 Laemmli(1970)의 방법을 이용하여 표 2-1과 같이 준비하였다.

Separating gel은 Table 2-2와 같이 제조하여 10 % APS와 TEMED를 혼합하여 gel plate에 분주하였다. Palte와 glass plate 사이에 기포발생 없이 분주하고 well의 끝에서 1 cm정도의 stacking gel을 위한 공간을 남겨 두고 DDW를 채워서 gel이 수평이 되게 하였다. Separating gel이 굳은 후 DDW를 제거하고 stacking gel을 Table 3와 같은 조성으로 하되 분주 전 10 % APS와 TEMED를 혼합한 후 plate 상단까지 분주하고 well을 기포발생이 없도록 주의하여 comb을 삽입하였다. Gel이 굳어지도록 30-35분 정도 실온에서 정치한 후 comb을 뽑아서 well 내를 DDW로 3회 세척하고 gel caster를 떼어내었다. Gel 밖에 묻어있는 acrylamide를 완전히 제거하고 gel running tank에 장착한 후 upper tank와 lower tank에 running buffer를 채웠다.

1) 전기영동 SAMPLE

단백량이 lane마다 20 μg 이 되게 희석한 후 항원과 4 X sample buffer 1:3 정도의 비율로 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 끓인 후 전기영동하였다. 이를 원심 분리하여 뚜껑에 증발된 수증기를 모으고 sample을 준비하였다.

준비된 gel의 1번 well에는 Standard Marker(Biorad, USA)를 5 μl , 나머지 well에는 각 sample을 6 μl 씩 loading하였다.

2) 전기영동

전기영동의 조건은 100 mA/gel로 영동장치에 전원을 50 V로 조정하고 bromphenol blue dye가 stacking gel을 벗어날 때 까지 영동하였다. 이후, 100 V로 승압하여 약 1시간 동안 bromphenol blue dye가 바닥에 도달할 때 까지 전기영동을 실시하였다.

3) 염색

전기영동이 끝난 gel은 DDW로 세척하고 Coomassie gel staining solution으로 약 2시간 동안 염색하였다. 탈색은 Coomassie gel destaining solution으로 세척하고 staining solution으로 약 4시간 동안 하였다.

Table 2-1. Compositions of reagents used for SDS-PAGE

Medium	Contents	Quantity
40 % Acrylamide stock	Acrylamide	38.67 g
	bis-acrylamide	1.33 g
		In 100 ml DDW
Lower gel buffer (4 X LGB)	1.5 M Tris	90.855 g
	0.4 % SDS	10 ml of 20 % SDS
	pH 8.8 adjust with HCl	Total 500 ml
Upper gel buffer (4 X UGB)	0.5 M Tris	30.77 g
	0.4 % SDS	10 ml of 20 % SDS
	pH 6.8 adjust with HCl	Total 500 ml
10% APS	Ammonium persulfate	100 mg/ml
4 X loading dye	100 % glycerol	5 ml
	4 X UGB	4.4 ml
	0.5 % bromophenol blue	0.4 ml
Loading buffer	4 X loading dye	350 μ l
	20 % SDS	126 μ l
	2 % MESH	14 μ l
		Total 490 μ l
Coomassie gel staining solution	Coomassie blue	1 g
	Methanol	450 ml
	Acetic acid	100 ml
Coomassie gel destaining solution	DDW	450 ml
	Methanol	100 ml
	Acetic acid	100 ml
	DDW	800 ml

Table 2-2. Compositions of reagents used for SDS-PAGE gel

Medium	12.5 % Separating	15 % Separating	4 % Stacking
40 % Acrylamide	9.35 ml	9.38ml	500 μ l
4 X LGB	6.25ml	6.25ml	
4 X UGB			1.25ml
DDW	9.07ml	9.04ml	3.18ml
10 % APS	300 μ l	300 μ l	60 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	3 μ l



Ⅲ. 결 과

1. 바이러스 분리

RK-13 cell의 EHV-3 접종 전(A), 접종 48시간 후(B) 그리고 접종 72시간 후(C)의 결과는 그림 2-1에 나타내었다. 접종 48시간부터 세포변성 효과가 나타남을 확인하였고 접종 72시간부터는 세포박리가 일어남을 알 수 있었으며 분리된 바이러스는 EHV-3 거로주(Georo strain)라 명명하였다.

2. PCR 검사 및 민감도 검사

세포를 수확하여 바이러스 DNA를 추출한 후 PCR 검사를 수행하였다. 그 결과 EHV-3에만 양성이었다고 EHV-1 및 EHV-4에는 음성이었다(그림 2-2).

Swab에서 바이러스 DNA를 추출하여 10배씩 serial dilution을 한 후 PCR 검사를 실시한 결과 10^4 까지 밴드를 확인할 수 있었다(그림 2-3).

3. 전자현미경 관찰

Equine herpesvirus 입자는 2개의 바이러스 입자가 모여 있는 상태가 관찰되었고 입자의 크기는 직경 약 150~170 nm이었다(그림 2-4).

4. 염기서열

국내분리 EHV-3 거로주(Georo strain)의 gG 특정부위에 대한 염기서열은 그림 2-5에 나타내었다. 400개의 염기에서 거로주는 EHV-3 334/74 strain과 397개가 일치하여 99.25%의 상동성을 나타내었다.

5. 단백질 분석(SDS-PAGE)

전기영동 결과에서는 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 확인할 수 있었다(그림 2-6). 국내 분리주 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD, 40 kD에서 단백 밴드를 관찰하였다.



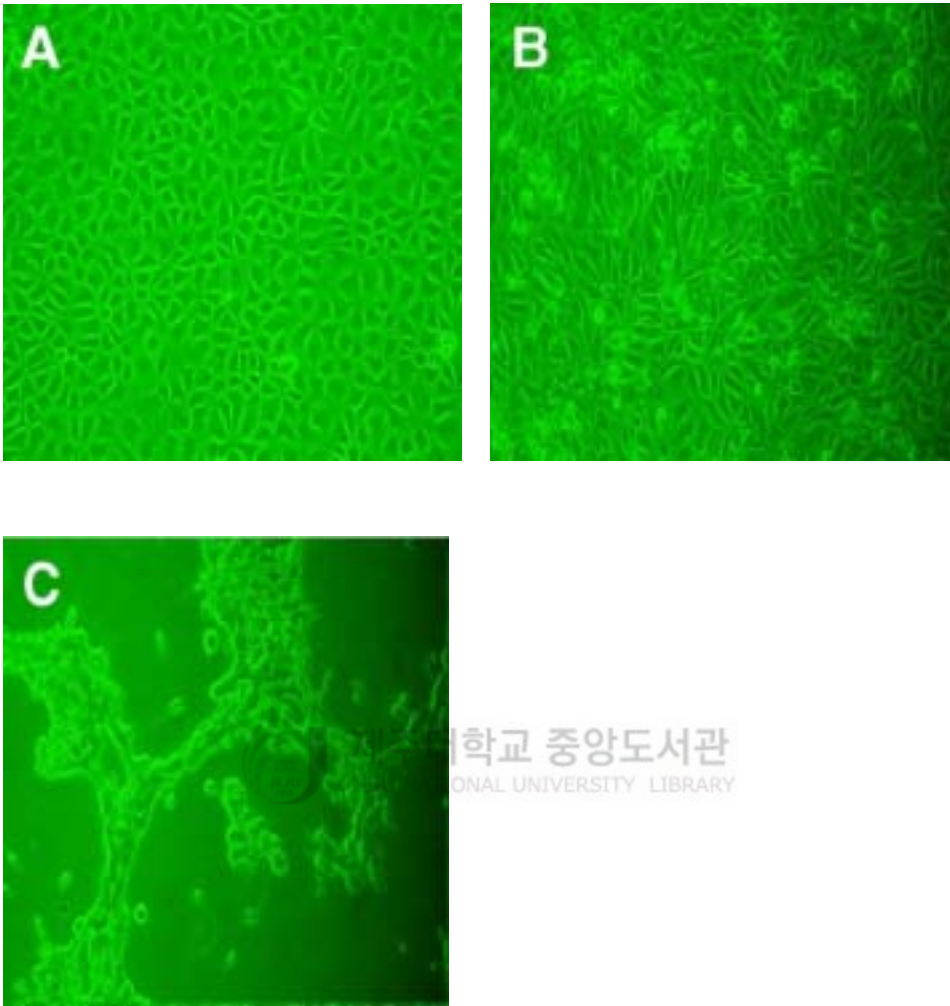


Fig. 2-1. Cytopathic effects by equine herpesvirus type 3.

A : Normal RK-13 cell. B : Day 2 after inoculation, C : Day 3 after inoculation.



Fig. 2-2. PCR products of EHV-3 gG gene from RK-13 cell inoculated with specimen. lane M: DNA ladder, Lane 1: EHV-3, Lane 2: EHV-1, Lane 3: EHV-4.

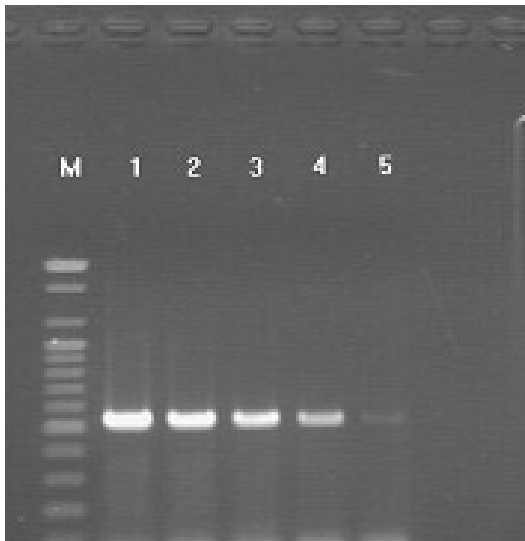
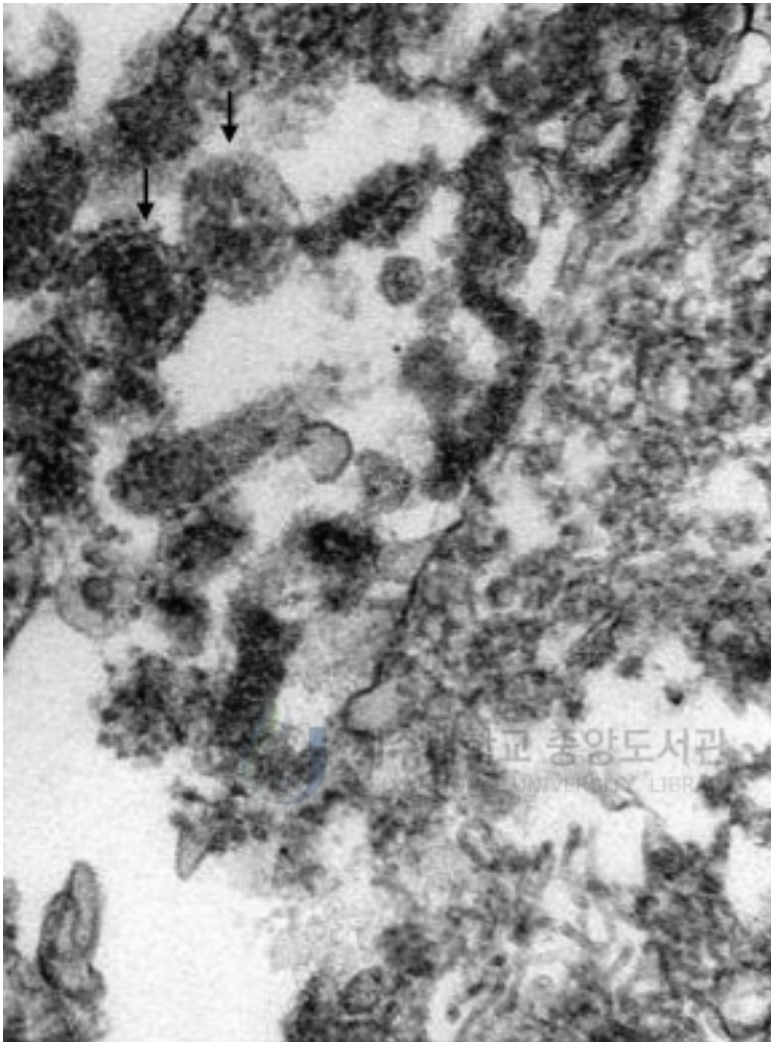


Fig. 2-3. PCR products of EHV-3 gG gene after serial dilution of template DNA purified from field specimen. lane 1 to 5; dilution rate of 10^1 to 10^5



100 nm
HV=75kV
Direct Mag = 60000x

Fig. 2-4. Transmission electron micrograph of EHV-3(Arrows). The virus were stained with 2% potassium phosphotungstate solution. Scale represents 100 nm. 60000X.

Georo 334/74	1 1234	CAATGAGGCCGATGAGGAGACACACTCCCA	30 1205
Georo 334/74	31 1204	AGATGAGAAAGCCGATACCCGCGTAGTTGG	60 1175
Georo 334/74	61 1174	TCCCCTTCTGCTGTCCGCACTCAGGACCGG	90 1145
Georo 334/74	91 1144	ACACGAGAATGCCGCCGGTGTACCACGGAG	120 1115
Georo 334/74	121 1144	ATCCGTCTCCGGCGGCAGGTGCGTCTTGCT T	150 1115
Georo 334/74	151 1084	CGTCGCATCCCGGGGCCGGTGGCGCTGGGG	180 1085
Georo 334/74	181 1054	TTGGCTCGTTATCCCCGTTTTCTCTTCTT	210 1055
Georo 334/74	211 1024	CTTTCTCCTCGTCATCGGTGGGAGAAGCGG	240 1025
Georo 334/74	241 994	GGGTTTTTTCCGAAGGCTTTTTCTTCGGGTT 제주대학교 중앙도서관	270 965
Georo 334/74	271 964	CTGTTACGTCGGCCGCGGATTCCCTGTCTG	300 935
Georo 334/74	301 934	CGCCGCGGGCAGACCCTCTGGAATTTTGCC	330 905
Georo 334/74	331 904	TCAGCTGGTCGTACGTCTCGCCCGGCAGCA G. T	360 875
Georo 334/74	361 874	TGTACCAGCGCTGGCTCAGGATGCGAAGTC	390 845
Georo 334/74	391 844	CCAGGGCGCC	400 835

Fig. 2-5. Comparison of the nucleotide sequences of gG gene from EHV-3 Georo strain with those of EHV-3 334/74 strain.
(Accession number AF081188).

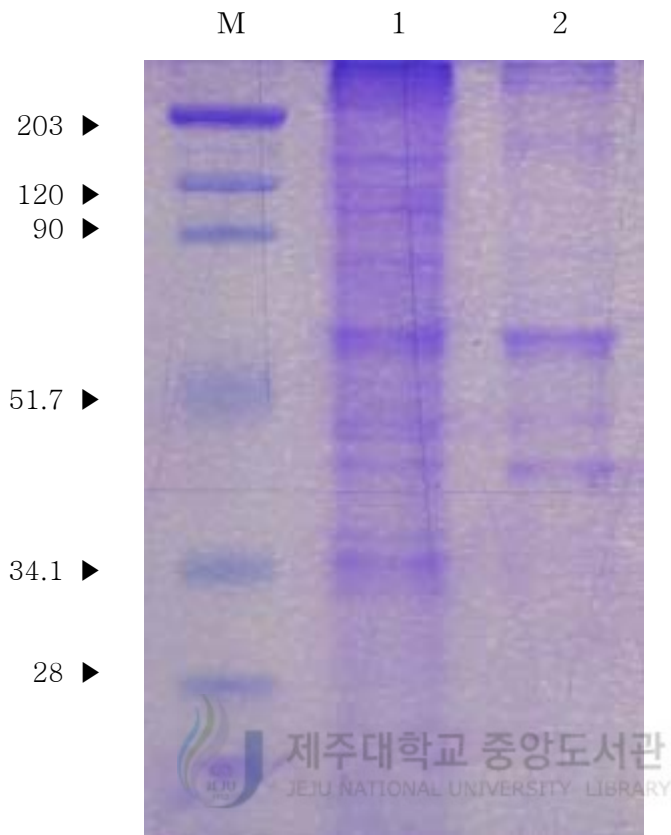


Fig. 2-6. SDS-PAGE of EHV-3 purified from RK-13 cell.
 M: Molecular marker, Lane 1: EHV-1, Lane 2: EHV-3.

IV. 고찰

EHV-1은 말 이외에 고양이, 마우스 및 토끼에서도 분리되고 EHV-9은 개, 고양이, 햄스터, 돼지 및 염소에서 분리되지만 EHV-3는 말, 당나귀 및 얼룩말 등의 말과동물[馬科動物]에서만 질병을 일으킨다(Henning, 1946; Matumoto 등, 1965; Bryans, 1969).

EHV-3는 높은 숙주 특이성을 가지고 있는데(Stiddert, 1996), Pascoe 등(1969)은 primary fetal equine kidney(EK) cell, equine embryo fibroblasts, fetal bovine kidney, calf testis, chicken embryo 및 rabbit kidney cell과 pig kidney cell 및 Hep 2 cell line에 병변에서 분리한 바이러스를 접종한 결과, 세포변성효과는 오직 말 유래의 세포에서만 나타남을 보고하였고 Kamada와 Studdert(1983)도 말 유래세포에서만 세포변성효과가 나타났다고 하였다.

그러나 본 실험에서는 EHV-3 배양에서 RK-13 cell에서도 증식을 확인하였고 접종 48시간 후에 세포변성효과를 확인하였기에 상기에 언급한 주장과 달랐다. 그 이유는 배지조성과 배양온도 등의 차이로 이런 결과도래된 것으로 추정된다. 말 유래세포는 구하기가 매우 어렵고 고가이기 때문에 이와 같은 사실로 EHV-3 연구는 보다 더 경제적이고 손쉽게 이루어질 것으로 생각된다.

RK-13 cell에서 분리한 바이러스를 PCR 검사에서 확인한 결과 EHV-3만 검출되었고 EHV-1 및 EHV-4는 검출되지 않아서 말구진은 EHV-1 및 EHV-4와 무관함을 확인하였다.

RK-13 cell에서 분리한 시료로 전자현미경 검경을 한 결과 직경 약 150~170 nm의 herpesvirus 입자 두 개가 모여 있는 것이 관찰되었다. 그러나 EHV-1으로 추정되는 조(1995b)의 실험에서 herpesvirus 입자가 여러 개 모여 있는 것과 대조를 이루었다.

염기서열분석에서는 본 실험에서 분리한 EHV-3 거로주와 EHV-3 334/74 strain의 상동성을 확인하기 위해 DNA sequencing 한 결과 99.25%의 상동성을 나타내어 점돌연변이가 있었음을 알 수 있었다.

그리고 단백질 분석을 위한 전기영동에서 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 나타내었고 국내 분리주 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 밴드를 관찰하였다.

Herpesvirus의 envelope에 있는 당단백질은 감염과정과 병원성 및 strain 변이의 중요한 결정기이고 체액 및 세포매개면역 반응을 이끌어낸다(Spear, 1993). 당단백질은 흡착, 침입, 방출 및 세포융합과 같은 바이러스-숙주세포 상호작용에 깊은 관여를 하고 있다. 게다가 감염세포의 표면에 위치하기 때문에 숙주면역반응의 주요한 목표이다(Fields 등, 1995). 그러므로 말 생산성 향상 및 말구진의 예방을 위하여서는 추후에 이에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.



V. 결 론

국내의 Thoroughbred 마군에서 발병한 말구진의 원인 바이러스인 EHV-3의 특성을 규명하기 위하여 바이러스 배양세포, 전자현미경 검사, 바이러스 DNA 염기서열 및 바이러스 단백질을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. EHV-3는 RK-13 cell에서도 증식하였고 접종 48시간 후에 세포변성 효과를 확인하였으며 72시간 후에는 박리되는 것이 관찰되었다.

2. 바이러스를 수확한 후 PCR 검사를 한 결과 EHV-3에만 양성하였고 EHV-1 및 EHV-4에는 음성이었다.

3. 분리된 EHV-3 gG gene의 DNA 염기서열은 EHV-3 334/74 strain 과 상동성을 비교한 결과 99.25%가 일치하였다.

4. 투과전자현미경 검사에서 EHV-3 입자가 2개 모여 있는 것이 관찰되었다.

5. 국내 분리주인 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 밴드를 관찰하였다.

제 3 장

Equine herpesvirus type 3에 대한 항체 검출용 ELISA 개발



I. 서 론

EHV-3의 존재는 1968년에야 비로소 확인되었는데 (Girard 등, 1968; Bryans, 1968), 이에 의한 바이러스성 성매개 감염증은 국내의 말 수입 검역규정 항목(농림부, 2004)에 포함되어 있지 않기 때문에 국내로 유입을 차단할 제도가 정비되어있지 않은 상황이다. 그러므로 말에서 나타나는 임상적인 특징 및 역학적인 특징을 파악하고 검진을 위한 편리한 진단법의 제시가 요구된다.

EHV-3는 이미 만연되어있는 EHV-1에 대한 단클론항체를 이용한 간접 ELISA법, 면역형광항체법 및 면역과산화효소검사(immunoperoxidase test) 등으로 진단한 결과 아무런 교차반응이 일어나지 않는다고 하였다 (van de Moer 등, 1993). 또한, EHV-3는 EHV-1에 특이적인 중화항체와 교차반응을 보이지 않고 equine herpesvirus 중에서 가장 빠르게 증식하며 항원적으로나 유전자적으로나 다른 Alphaherpesvirus와 구별된다 (Bryans, 1969; Allen과 Bryans, 1977; Studdert, 1996).

EHV-3 genome은 EHV-1 genome과 유전적 상동성이 2~5%인 것으로 평가되고 있다(Allen 등, 1977). 제한효소 DNA fingerprint 검사에 의해 EHV-3는 EHV-4, 1, 2 및 5와 확연하게 차이가 나타나는 것으로 보고되었다(Studdert, 1981).

EHV의 국내 발생에 대해서는, Bak(1981)이 유산된 말태아의 비장 및 간을 병리학적으로 진단하여 확인한 바 있다. EHV의 첫 분리는 1990년대 중반에 말 유산태아에서 실시되었으며(조 등, 1995a, b, c), 그 후 말 유산태아에서 분리된 바이러스를 PCR 기법을 이용하여 EHV-1과 EHV-4를 구별하였다(문 등, 2001). 한편, EHV-3 분리와 말구진 발생에 대해서는 본 연구의 이전에는 보고가 없었다.

말구진의 진단은 외부 생식기에 특징적인 수포발생을 확인하는 임상검

사로 행하여진다(Blanchard, 2003). 그 이외에 병력청취에 따른 보체결합 반응, 면역확산법, 직·간접면역형광법 및 혈청중화반응 등의 항체검출을 위한 혈청검사방법이 있으며, 피부 생검을 통한 원인 바이러스 분리를 통하여 진단할 수도 있다(Gutekunst 등, 1978; Kobluk 등, 1995; Knottenbelt와 Pascoe, 1997; Aiello 등, 1998; Reed와 Bayly, 1998; Colahan 등, 1999b). 또한 수포액 또는 병변에 존재하는 바이러스를 전자현미경으로 검경할 수 있는데, 이 방법은 바이러스성 피부질환에 가장 신속하고 유용한 직접검사법이라 하였다(Studdert, 1996; Colahan 등, 1999a,b). 원인 바이러스는 궤양이 생긴 병변에서 멸균면봉을 이용하여 분리할 수 있는데, 일반적으로 질병초기에 분리가 용이하고(Gibbs 등, 1972) 바이러스 DNA의 제한효소 fingerprinting(restriction endonuclease fingerprinting of the viral DNA)에 의해 진단이 가능하며(Studdert, 1996) 근래에는 PCR(Polymerase chain reaction)법을 진단에 이용하고 있다(Ehlers 등, 1999; Dynon 등, 2001; Kleiboeker와 Chapman, 2004; Seki 등, 2004).



PCR 검사법은 짧은 시간 내에 특이도면에서 우수한 진단방법이나 대량이 시료를 동시에 진단하기에 무리가 따르며, 검출의 대상은 바이러스의 유전자 즉, 항원을 진단하기 위한 방법이다. 이는 잠복기에 들어간 바이러스를 검출하기는 어려운 단점도 있다. 한편, 대량의 혈청시료를 항체검사법으로서 진단하는 ELISA방법은 술식의 편리성이 있으며 특이도 및 민감도의 측면에서 많은 장점이 있는데, 기왕의 감염력도 짐작할 수 있기 때문에 감염증의 추적에 유용하다.

감염된 말에서는 대부분 현저한 항체역가의 상승이 관찰된다(Pascoe, 1994; Higgins와 Wright, 1995). 그러므로 ELISA법에 의한 특이항체의 검출을 통하여 EHV-1 (Dutta 등, 1983; Yeargan 등, 1985; van de Moer 등, 1993), EHV-2 (Dutta 등, 1986; Fu 등, 1986), EHV-4 (Crabb 등, 1991; Stokes 등, 1991) 및 EHV-5(Agius 등, 1994; Dunowska 등, 2002)에 대한 진단에 대한 연구결과가 보고되어있다. 한편, EHV3에 대한 혈청

학적 연구에 대한 보고는 상대적으로 미진한 실정이며 혈청학적인 진단을 통한 말구진의 방역에 응용할 자료가 제시되어있지 않다.

그러므로, 본 연구의 목적은 말구진의 원인 바이러스인 EHV-3에 동물이 노출되었는지 여부를 EHV-3에 대한 특이항체를 검출하는 ELISA을 통하여 신속히 판단하고자 수행하였으며, ELISA방법을 이용하여 EHV-3 전파를 최소화시키며, 마필농가의 생산성 향상을 추구하고자 한다.



II. 재료 및 방법

1. ELISA용 Virus 항원 준비

Rabbit kidney cell line인 RK-13 세포가 배양된 배양병에서 배지를 제거한 후 적당량의 바이러스를 접종하고 2시간 동안 37°C에서 흡착시켰다. 그 후 배지를 첨가하여 배양한 다음 CPE가 80~90 %정도 나타나면 감염 세포를 -70 °C에 얼려서 냉동과 해동을 반복하고 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 pellet은 제거하였다. 그리고 상층액만을 회수하여 다시 48,300×g에서 2시간 동안 원심분리를 하여 얻어진 바이러스를 ELISA 항원으로 사용하였다.

2. ELISA Plate



ELISA Plate (8 well strip flat-bottom microplates, Costar 2580, U.S.A.)의 각 well에 흡착용 완충액 (50mM Carbonate pH 9.6, containing 0.02% sodium azide)으로 희석한 바이러스 항원을 100 μ l씩 분주하고 냉장온도에서 약 16시간동안 정치하여 흡착시켰다. PBS로 세척한 각 well 당 0.5% BSA가 함유된 PBS 200 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 정치하였다. 이후 PBS로 세척하고 및 건조시켜 ELISA에 사용하였다.

3. ELISA

검사 혈청을 PBS-T로 희석하여 100 μ l씩 각 well에 가하고 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 4회 세척 후 Horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 goat anti-horse Ig G를 임(1991)의 방법대로 제조 및 사용하여 100 μ l

씩 가하고 1시간동안 실온에서 반응 시켰다. 이후 4회 세척하고 발색제 ABTS를 100 μ l씩 가하였다. 30분간의 발색반응이 지나면 100 μ l의 0.005% sodium azide 수용액을 넣어 반응을 정지시키고 즉시 reader를 이용하여 파장 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 492 nm에서의 흡광치를 대조 파장으로 대입하였다.

4. Cut-off value

음성대조군인 2세 이상의 암수 각각 10두씩 선별하였다. 선별기준은 첫째, 번식경험이 없고 번식마가 아닌 말. 둘째, 생식기에 임상증상 및 백점(white spot)이 없는 말. 셋째, 모체이행항체가 모두 소멸 된 시점의 마필을 대상으로 고려하였다. 이들의 항체가를 중복(duplicate) 측정하여 평균값을 구하고 평균값에 표준편차의 3배를 다한 값을 cut-off value로 결정하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 항원 바이러스 흡착조건

EHV-3 항원흡착 및 혈청의 적정농도를 결정하기 위하여 EHV-3 항원을 40, 20, 10, 5, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 하여 흡착시키고 검사혈청은 50, 100, 200, 400 배로 희석하여 비교하였다.

EHV-3에 대한 항체 양성인 혈청에서의 발색반응을 충분히 나타내고 동시에 음성혈청에서는 비특이 반응이 나타나지 않는 수준의 흡착농도를 조사해보았다. 양성혈청 2개와 음성혈청 2개를 PBS-T로 100배 희석하여 ELISA를 실시한 결과를 나타내었다(그림 3-1). EHV-3 흡착농도와 양성혈청의 발색반응의 관계는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이후부터 용량에 비례하는 감소를 보였고 음성혈청에서의 비특이 발색반응은 관찰되지 않았으므로 적절한 항원 흡착농도는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 결정하였다.

흡착된 EHV-3 항원의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내줄 수 있는 혈청의 희석배수는 200배 이상으로 판단하였다(그림 3-2). 그러므로 이후의 ELISA는 EHV-3 항원희석 200배, 혈청희석 200배의 조건을 선택하여 실시하였다.

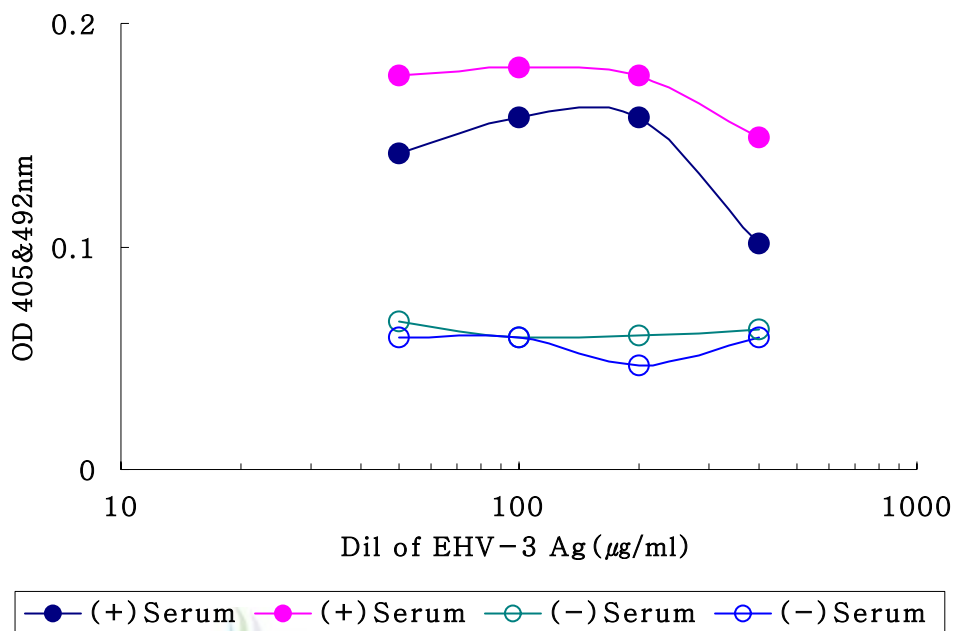


Fig. 3-1. Confirmation of optimum amount of antigen coated on ELISA plate.

2. 혈청 희석 조건

PBS-T로 희석한 양성 및 음성혈청을 대상으로 ELSIA를 실시한 결과는 그림 3-2에 나타난 바와 같다. EHV-3에 대한 항체 양성혈청 희석 200배까지는 최대흡광도를 유지하였으므로 분석을 위한 혈청의 희석은 200배로 결정하였다. 음성혈청의 경우는 100배 희석 이후 감소하는 경향을 보이며 200배 이후는 일정한 흡광도 값을 보여 200배 희석 시 비특이 발색반응이 나타나지 않는 것으로 생각된다.



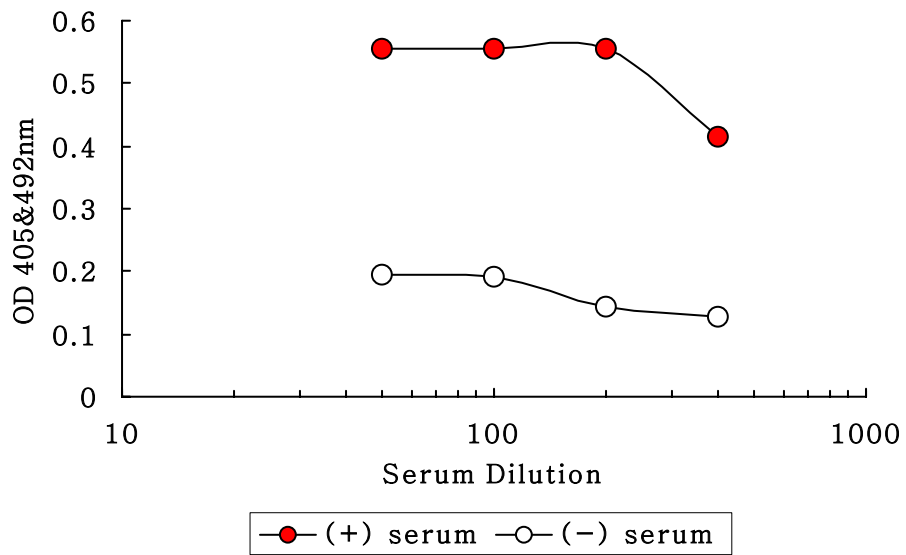


Fig. 3-2. Confirmation of optimum serum dilution for ELISA.



3. 효소 접합체의 희석 조건

효소 접합체(Enz-Conjugate)의 최적 희석농도를 찾기 위하여, 계단희석한 다음에 ELISA를 실시한 결과는 그림 3-3에 나타내었다. 희석용량과 반응의 상관관계는 1000배 희석배수까지 나타나고 있으며, 적절한 signal을 도출하기 위해 500배 희석배수를 선택하였다.



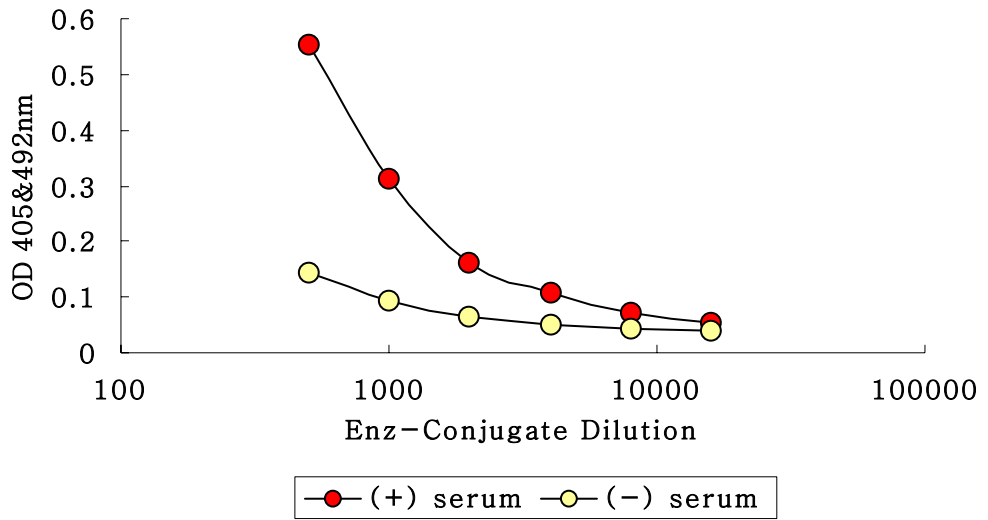


Fig. 3-3. Confirmation of optimum enzyme-conjugate dilution for ELISA.



4. 항체수준 조사

EHV-3에 의한 임상증상과 항체가의 관계를 알아보기 위하여 144두를 대상으로 ELISA를 이용하여 항체양성률을 조사하였다(표 3-1). 임상증상이 양성인 마필에서의 항체양성인 개체는 43두로 59.7 %(43/72)로 나타내었으며, 항체 음성인 개체는 29두로 40.2 %(29/72)를 나타내었다. 임상증상이 음성이면서 양성인 말은 13.9 %(10/72)였고 임상증상과 OD값이 모두 음성인 말은 62두였다.



Table 3-1. Comparison of clinical sign and ELISA OD value

		Clinical sign		Subtotal(%)
		Positive	Negative	
ELISA	Positive	43	10	53(36.8)
	Negative	29	62	91(63.2)
	Subtotal	72	72	144(100)
	(%)	(50)	(50)	

5. 항체전이 조사

EHV-3에 노출된 씨암말과 포유망아지에서의 항체전이를 알아보기 위하여 임상증상을 나타내는 12두의 씨암말과 그 포유망아지에서의 항체가를 조사하였다(그림 3-5). 모든 경우에서 씨암말의 항체가가 포유망아지의 그것보다 높았고, 씨암말의 항체가가 높은 경우 포유망아지도 그에 비례하여 높아지는 경향을 보였다. 임상증상을 보였던 씨암말과 그녀의 포유망아지에서의 혈중 항체가와는 상관관계($y=0.5418x-0.0158$ $R^2=0.4931$)를 보여 씨암말의 감염에 따른 특이항체전이가 있었음을 짐작할 수 있었다.



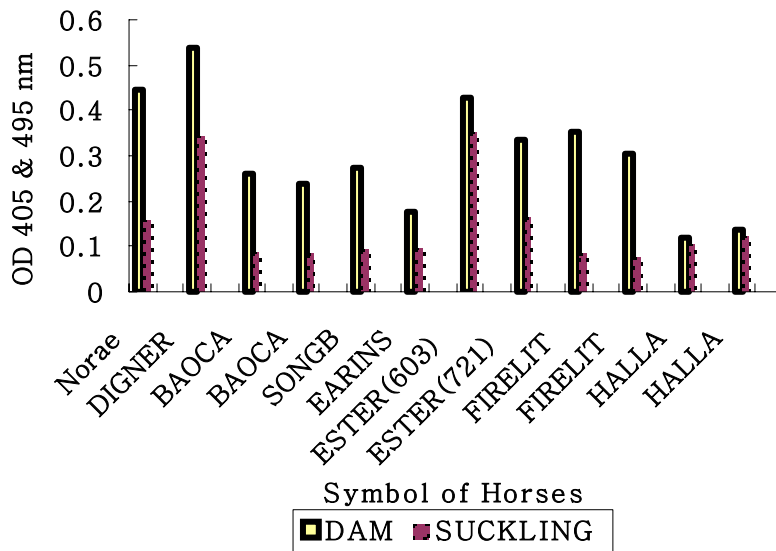


Fig. 3-5. Antibody titer against EHV-3 in dam and her suckling.

6. 항체지속기간 조사

EHV-3의 감염과 항체지속기간을 알아보기 위하여 19두의 씨수말, 씨암말 및 포유망아지를 대상으로 발병시기였던 4월과 5월에 1차 채혈을 하였고 11월에 2차 채혈을 하여 항체를 측정하였다(그림 3-6).

발병 6개월이 지났으나 대부분 혈중에 항체가 지속적으로 존재하는 것을 확인하였다.



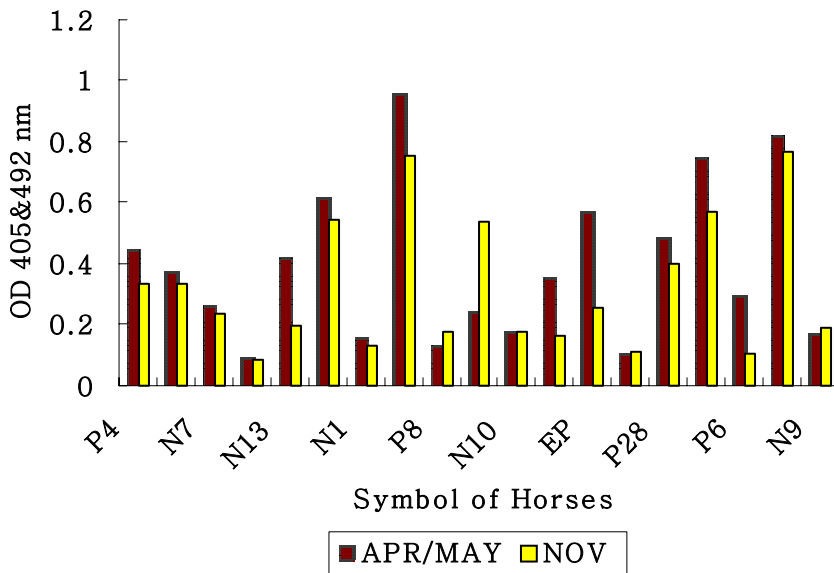


Fig. 3-6. Antibody titer against EHV-3 checked on APR/MAY and NOV in affected horses.

7. 씨수말 및 시정마의 임상증상, PCR 및 ELISA 결과

교배에 의한 전과원으로의 알려져 있는 수말(씨수말 및 시정마)의 임상 검사, PCR 검사 및 ELISA 검사결과를 표 3-2에 나타내었다. 한국마사회 씨수말 2두에서 PCR의 결과와 ELISA 결과는 비례하였다. 민간 씨수말 2두에서는 임상증상이 한국마사회의 씨수말과 비교하여 심하였고 항체가도 높았다. 한편, 시정마를 검사하였을 때 임상증상은 발견되지 않았으나, 비강에서 바이러스가 검출되었으며, 항체는 음성으로 나타났다.



Table 3-2. ECE clinical signs, PCR result and ELISA titers in male horses

Males	Clinical signs*	P C R†			E L I S A‡	
		EHV-1	EHV-4	EHV-3	(APR~MAY)	(NOV)
KS I	+++	-	-	++++	++++	+++
KS II	+++	-	-	+++	++	-
PS I	++++				++++	+++
PS II	++++				+++	++
TS	-			+	-	-

KS= Korea Racing Association stallion, PS= Private stud stallion, TS=teaser.

*Clinical sign (-: negative, +: mild, ++: moderate, +++: severe, ++++: very severe)

† PCR (-: negative, +: mild bright, ++: moderate bright, +++: very bright, very very bright)

‡ELISA(OD value) (-: <0.334, +:0.334 ~0.400 ++:>0.400, +++: >0.600, ++++: >0.800)



8. 씨암말의 임상증상, PCR 및 ELISA 결과

임상증상을 보이는 말에서 PCR 결과와 ELISA 결과가 모두 일치하지는 않았다. 4월과 5월에 1차 채혈을 한 말의 ELISA OD값이 양성인 말이 2차 채혈 때인 11월에는 음성인 말도 있었고 1차 채혈 때 음성인 말이 2차 때에는 양성인 경우도 있었으며 1, 2차 모두에서 음성인 말도 관찰됐다.

임상증상을 보이는 씨암말을 대상으로 EHV-1, 4 및 3 항원 검출을 위한 PCR 및 ELISA를 통한 항체를 조사하여 표 3-3에 나타내었다. PCR 양성이며 항체양성인 개체가 12두였으며 이중 2두(26, 28번마)는 교미시점과 6개월 후에 항체를 유지하는 동시에, PCR 항원 양성을 보였다.

PCR 양성으로서 항체음성을 보인 경우는 7두로 나타났다. 한편 EHV-3로 의심되는 임상증상을 보이며 PCR에 의한 바이러스항원이 검출되지 않는 경우도 15두가 있었으며 이중 항체 양성인 말이 2두(40, 42번마) 있었다.



Table 3-3. ECE clinical signs, PCR result and ELISA titers in broodmares

Broodmares	Clinical signs	P C R(APR~MAY)			E L I S A	
		EHV-1	EHV-4	EHV-3	(APR~MAY)	(NOV)
1	++	-	-	++	-	-
2	++++	-	-	++++	-	-
3	+++			+++	+++	
4	++			++	++	-
6	++			++	-	-
7	++			+++		++
8	++			++	-	-
9	++			+++	-	+
11	++			+++		++
12	++			++		+++
13	++			++	-	++
14	++			++		+++
15	+++			++	-	
24	+++			++	+++	
25	++			++		-
26	++			++	+++	++
27	++	-	-	++	++	
28	++++			++	++	++
29	++++	-	-	++++		-
30	++			-	-	-
31	++			-		-
32	++			-		
33	++			-	-	-
34	++			-	-	
35	++			-	-	-
36	++	-	-	-	-	-
37	++	-	-	-	-	
38	++			-	-	-
39	++	-	-	-	-	-
40	++			-		++++
41	++			-		
42	+++	-	-	-	++	-
43	+			-		
44	+			-	-	-
45	+			-		

*Clinical sign (-: negative, +: mild, ++: moderate, +++: severe, ++++: very severe)

† PCR (-: negative, +: mild bright, ++: moderate bright, +++: very bright, very very bright)

ΠELISA(OD value) (-: <0.334, +:0.334 ~0.400 ++:>0.400, +++: >0.600, ++++: >0.800)



9. PCR 검사와 ELISA OD value 비교

PCR 검사와 ELISA OD value를 비교하여 다음과 같은 결과가 산출되었다(표 3-4). PCR의 양성결과 중 ELISA에서도 양성인 말은 13두로써 민감도는 65.0 %(13/20)를 나타내었고 PCR 음성결과 중 ELISA에서도 음성인 말은 9두로서 특이도는 81.8 %(9/11)를 나타내었다.



Table 3-4. Comparison of PCR and ELISA OD value

		PCR		
		Positive	Negative	Subtotal(%)
ELISA	Positive	13	2	15(48.4)
	Negative	7	9	16(51.6)
	Subtotal	20	11	31(100)
		(%)	(64.5)	(35.5)

IV. 고 찰

말의 다양한 성매개성 감염증은 원충성 질환인 말구진 뿐만 아니라 *Trypanosoma equiperdum*에 의한 구역(dourine)과 세균성질환인 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus* 감염증 및 *Taylorella quigenitallium*에 의한 접촉성말자궁염(Contagious Equine Metritis)을 들 수 있다. 바이러스성 감염증으로는 equine arteritis virus에 의한 말바이러스성동맥염, 그리고 lentivirus에 의한 말전염성빈혈이 있다(Blanchard 등, 1992; Rose 등, 1993; Kobluk 등, 1995; Siegal 등, 1997).

말전염성빈혈의 원인체인 lentivirus는 Kobayashi에 의하여 1961에 분리되었으며 (Kobayashi, 1961a, b, c; Kobayashi와 Kono, 1967), EHV-3는 1968년에야 비로소 확인되었다(Girard 등, 1968; Bryans, 1968). 국내의 말 수입 검역규정 항목(농림부, 2004)에 포함되어 있지 않기 때문에 이 질병의 유입 방지를 위한 우선적인 연구는 편리한 진단법 개발에 관련된 것으로 사료되며 이는 본 연구의 주된 목적이기도 하다.

병원체의 감염에 따른 항체의 변화를 관찰하는 ELISA 방법은 이미 일상적인 실험실적 진단법으로 인식되고 있으며, 본 연구에서도 정제된 바이러스 항원을 합성수지상에 고정시키고 이에 반응한 마 혈청중의 EHV-3 특이항체를 효소와 2차 항체의 접합체로 검출하는 전형적인 방법을 적용하여 최적조건을 조사한 바, 감염에 따른 항체의 변동을 진단하기에 무리가 없었다고 판단되었다.

한편, EHV-3의 감염에 따른 항체의 변동을 관찰하기 위한 Pascoe와 Bagust (1975)의 연구에 의하면, EHV-3를 씨수말에 감염시키고 난 후 14~21일에 항체가가 최고조에 달하였으며 보체결합반응은 60일 이후에는 음성으로 나타났다고 하였다. 반면, 중화항체는 최소 1년간 유지된다고 하였다.

본 연구에서는 발병 후 약 6개월 후에 단순한 항체가만 비교해보았으며, 이 결과로도 발병 시의 항체에 비해하여 다소 감소한 항체를 보인 동물이 대부분이었다. 한편, 발병기보다 오히려 항체가 의미 있는 상승을 보인 경우도 1건 관찰되었는데, 이 경우는 발병초기 항체 형성이 고조에 달하지 않았던 이른 시기에 채혈한 것으로 추정된다.

모체항체 이행의 관점에서 볼 때, Bagust 등 (1975)에 의하면, 수유 이전의 신생망아지 혈청에서는 EHV-3에 대한 항체가 검출되지 않았으나, 포유 이후에는 모체이행 항체가 나타나 약 4~6개월 정도 지속한다고 하였다. 또한, 1~2세 가량의 어린 말에서의 항체 양성률은 낮으나 2세 이후에 연령의 증가에 따라 항체 양성률도 증가하여 8세 때에는 최고조를 보이며 52.6%까지의 양성률을 타내었다고 하였으며, 이는 EHV-3의 감염이 주로 교배에 의함을 보여주는 예라고 할 수 있다.

바이러스 역가(titer of virus)는 일반적으로 질병 초기에 감염부위에서 채취하였을 경우 매우 높다(Scott과 Miller, 2003). EHV-3에 대한 중화항체의 출현은 교배연령의 말(번식마)에서 주로 나타나는데, 이는 감염의 대부분이 교배과정에서 생식기를 통한 전파로 추정된다(Gibbs 등, 1972).

수말(씨수말 및 시정마)의 임상검사, PCR 검사 및 ELISA 검사결과에서 전기영동 밴드의 밝기와 ELISA OD값은 비례하였고 임상증상이 심한 말이 ELISA OD값도 높았다. 그리고 임상증상이 없는 시정마의 검사에서는 ELISA OD값은 cut-off value 값보다 이하인 음성이었기에 기계적으로 바이러스에 접촉했으므로 시정마의 면역계에 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

씨암말에서 임상검사, PCR 검사 및 ELISA 검사결과는 모두 일치하지는 않았다. 1차 채혈을 한 말의 ELISA OD값이 양성인 말이 2차 채혈 때에는 음성인 말도 있었고 1차 채혈 때 음성인 말이 2차 때에는 양성인 경우도 있었으며 1, 2차 모두에서 음성인 말도 관찰됐다.

씨암말과 포유망아지의 항체를 측정할 경우에서 모마의 항체와 망아지의 항체는 비례하였다. 이는 젖을 통해 항체가 이행한 것으로 판단

되고 모마의 항체가 높으나 망아지의 항체는 낮은 경우는 모체의 항체가 불완전하게 이행된 때 채혈하였거나 망아지의 수동면역장애로 추정된다.

발병시기보다 6개월 후의 항체가 상승한 말이 3두 있었다. 이는 1차 채혈에서 아직 항체가 출현하지 않았을 때 채혈하였고 그 후 계속하여 항체 역가가 증가하다가 다른 말들처럼 감소한 것으로 추정된다. 즉, 항체출현시기의 채혈에서 변화된 것으로 생각된다.

PCR 검사와 ELISA OD value를 비교하였을 때 민감도는 65.0 %를 나타내었고 특이도는 81.8 %를 나타내었다. 이는 임상증상이 발현되어 수포가 과열되면서 바이러스가 배출된 후 PCR 검사를 위해 면봉으로 병변에서 바이러스를 채취하는 시기와 바이러스가 감염 또는 재감염 되어 혈중에 항체가 출현하는 시기의 차이로 인해 나타난 결과라고 사료된다.

일부에서는 바이러스 오염을 피하기 위하여 인공수정으로 교배를 이룩하려하지만(Varner 등, 1991), 경주용 Thoroughbred 품종의 경우는 일반 산업동물의 경우와 달리 순수한 자연교배에 의한 망아지생산과 혈통등록이 인정이 되고 있기 때문에(Romanet, 2005) 인공수정의 채택은 의미가 없다고 하겠다. 이는, 자연교배를 통하여 이루어지는 증식과정 중 이병의 유입과 전파를 막는 프로그램의 당위성이다.

말구진의 경우 임상증상 만으로는 다른 피부질환과 감별진단이 어렵고(Robinson, 2003) 원인 바이러스 배출여부의 확인이 불투명하다. 또한 발정기가 되면 씨암말의 음순이 발적되고 부종이 생기므로(McKinnon과 Voss, 1993) 말구진상과 혼동하기 쉽다. 그래서 씨수말 소유자와 씨암말을 소유한 생산자간에 분쟁의 요인이 될 수도 있다. 그러므로, 본 연구에서 제시된 ELISA 진단법은 대량의 혈청시료를 단시간에 검사하여 EHV-3의 항체가 조사에 많은 도움을 줄 것으로 생각되며, 현장적용을 위한 신속검사법 개발을 위한 추가적인 연구가 요구된다.

V. 결 론

EHV-3 감염에 의한 말구진 의 혈청학적 진단을 위한 ELISA 검사법을 적용하였다. 이를 위하여 RK-13 세포주에 증식시킨 EHV-3를 초고속원심분리를 통하여 정제하였다. 정제된 바이러스를 ELISA 용 microplate에 흡착시켜 검사용 마혈청 중의 EHV-3 특이 항체를 고정시켰다. 고정된 항체는 HRP가 표지된 Goat anti-horse IgG로 추적하고 ABTS를 이용하여 항체가를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 말구진과 관련된 임상증상을 나타낸 72두와 음성을 나타낸 72두를 대상으로 ELISA를 실시하였을 때 각각 59.7 %(43/72) 및 13.9 %(10/72)의 항체양성률을 보였다.



2. 말구진과 관련된 임상증상을 나타낸 씨암말 12두에서 모체와 포유망아지의 항체가는 양의 상관관계를 보였다($y=0.5418x-0.0158$, $R^2=0.4931$).

3. 4월·5월에 채취한 혈청과 11월에 채취한 혈청을 비교한 결과 대부분 혈중에 항체가 유지되고 있었고 항체가가 상승한 경우와 감소한 경우가 있었다.

4. ELISA검사결과를 PCR 검사와 비교하였을 때 민감도는 65 %, 특이도는 81.8 %로 나타났다.

총 결 론

말에서 바이러스에 의한 성매개성 감염증이면서 피부병인 말구진은 미약한 수포형성에서부터 심한 궤양형성까지 다양한 임상증상을 나타낸다. 국내 발병한 말구진의 임상적 및 역학적 특성, 원인 바이러스의 특성 그리고 말이 바이러스에 노출되었는지 여부를 EHV-3에 대한 특이항체를 검출하는 ELISA을 통하여 신속히 판단하고자 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

한국마사회 씨수말에서는 귀두, 음경체 및 포피 등에서 수포, 농포, 가피, 궤양, 부종 및 백점 등이 관찰됐고 음낭 및 후지에서는 병변을 거의 찾을 수가 없었다. 민간 씨수말에서는 한국마사회 씨수말과 거의 비슷한 병변분포를 보였으나 부종이 뚜렷한 게 특징이었다. 씨암말에서는 회음부, 음순, 질점막피부접합부 및 외측질에서 수포, 농포, 가피, 궤양, 부종 및 백점이 관찰됐고 내측질, 음핵와, 유두, 후지 및 복부에서는 어느 병변도 관찰할 수 없었다. 또한 포유망아지와 시정마에서는 아무런 임상증상을 관찰할 수 없었다. 리비도는 발병전후 비슷한 양상을 나타냈고 한국마사회 씨수말 1두에서는 귀두열창 그리고 민간씨수말 3두에서는 보행곤란의 합병증이 관찰됐다. 임상증상을 발현한 말과 정상마의 임상병리학(혈액학)적 비교에서는 차이점이 나타나지 않았다. 또한 호르몬 검사에서는 유의성은 인정되지 않았으나 임상증상을 보인 말이 증상을 나타내지 않은 말보다 Testosterone과 LH가 높았고 FSH, Estradiol 및 T₄는 낮았다. PCR 기법을 이용하여 바이러스의 DNA를 검출한 결과 한국마사회 4두 중 2두에서 양성반응이 나타났고 씨암말 44두 중에서 28두가 양성반응을 나타냈다. 그리고 포유망아지의 비공에서 추출한 swab에서는 음성반응이었으나 시정마의 비공에서는 양성반응이 나타났다. 발병 시기를 살펴보면, 교배하기 전에 발병한 암말이 임상증상만을 양성으로 하였을 경우는 10두 (22%), PCR 검사에서 양성으로 기준하였을 경우는 2두에서 발생하였다.

씨수말의 바이러스 배출기간을 확인한 결과 최초분리에서 분리가 안 될 때까지의 기간은 약 22일과 23일이 소요됐고 씨암말에서는 18일과 19일이 소요됐다. 그리고 심한 임상증상으로 병변이 지속됐던 1두에서는 58일 동안 분리되었다. 임상증상이 있는 씨암말을 양성으로 하였을 경우 416두 중에서 44두가 양성이기에 10.6 %의 이환율을 나타냈고 PCR 검사에서 양성을 기준으로 하였을 경우 305두 중에서 28두가 양성이었기에 9.5 %의 이환율을 나타냈다. 임신검사에서는 PCR 양성을 나타낸 씨수말 2두에서는 발병전의 임신율이 발병후보다 높았다. 그리고 carrier로 의심되는 씨수말 2두 중 1두는 발병전이 높았으나 1두는 발병후가 높았다. 그리고 이들 4두는 전체 임신율보다 다소 낮았다. 그리고 씨수말에서 말구진 치료 후 교배한 결과 교배대상 씨암말에서는 아무런 임상증상이 나타나지 않았다.

세포배양은 MDBK cell과 RK-13 cell을 이용하였다. 두 세포에서 접종 48시간에 CPE가 관찰되었고 분리한 DNA를 spectrophotometer로 정량하여 PCR 검사를 한 결과 1 pg까지 검출되었다. 그리고 MDBK cell에서 추출하여 전자현미경검사를 한 결과 herpesvirus 입자 2개가 관찰되었다. RK-13 cell에서 분리한 바이러스를 PCR을 이용하여 검사한 결과 EHV-3만 검출됐고 EHV-1과 EHV-4는 검출이 되지 않았다. 분리된 EHV-3의 gG를 증폭한 후 염기서열을 분석하여 EHV-3 334/74 strain과 400개의 염기 중에서 397개가 일치하고 3개가 점돌연변이를 나타내어 99.25 %의 상동성을 보였다. 또한 SDS-PAGE에서 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 나타내었고 국내 분리주인 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 밴드를 관찰하였다.

말구진의 원인 바이러스인 EHV-3에 노출되었는지를 확인하기 위해 EHV-3에 대한 특이항체를 검출하는 ELISA을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 말구진과 관련된 임상증상을 나타낸 72두와 음성을 나타낸 72두를 대상으로 ELISA를 실시하였을 때 각각 59.7 %(43/72) 및 13.9 %(10/72)의 항체양성률을 보였다. 말구진과 관련된 임상증상을 나타낸 씨

암말 12두에서 모체와 포유망아지의 항체는 양의 상관관계를 보였다 ($y=0.5418x-0.0158$, $R^2=0.4931$). 4월·5월에 채취한 혈청과 11월에 채취한 혈청을 비교한 결과 대부분 혈중에 항체가 유지되고 있었고 항체가 상승한 경우와 감소한 경우가 있었다. ELISA검사결과를 PCR 검사와 비교하였을 때 민감도는 65 %, 특이도는 81.8 %로 나타났다.



V. 참고문헌

Agius, C. T., Crabb, B. S., Telford, E. A., Davison, A. J. and Studdert, M. J. 1994. Comparative studies of the structural proteins and glycoproteins of equine herpesviruses 2 and 5. *J Gen Virol.*, 75(10). 2707~2717.

Aiello, S. E., Mays, A., Amstutz, H. E., Anderson, D. P., Armour J., Jeffcott, L. B., Loew, F. M. and Wolf, A. M. 1998. The merck veterinary manual. 8th. ed. Merck & Co., INC., New Jersey, pp.1008~1035.

Allen, G. P. and Bryans, J. T. 1974. Studies of an established equine cell line derived from a transitional cell carcinoma. *Amer J Vet Res.*, 35. 1153~1160. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Allen, G. P. and Bryans, J. T. 1976. Cell-free synthesis of equine herpesvirus type 3 nucleocapsid polypeptides. *Virol.*, 69. 751~762.

Allen, G. P. and Bryans, J. T. 1977. Replication of equine herpesvirus type 3: kinetics of infectious particle formation and virus nucleic acid synthesis. *J Gen. Virol.*, 34. 421~430.

Allen, G. P., O'Callaghan, D. J. and Randall, C. C. 1977. Genetic relatedness of equine herpesvirus type 1 and 3. *J Virol.*, 24(3). 761~

767.

Bagust, T. J., Pascoe, R. R. and Harden, T. J. 1972. Studies on equine herpesviruses 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. *Aust Vet J.*, 48. 47~53.

Bak, U. B., Lim, C. H., Kang, B. H. and Lee, S. Y. 1981. A pathological survey on equine rhinopneumonitis occurred in Korea. *Korean J Vet Res.*, 21(1). 11~23.

Balan, P., Davis-Poynter, N., Bell, S., Atkinson, H., Browne, H. and Minson, T. 1994. An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutant herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J Gen Virol.*, 75. 1245~1258.

Ball, M. A. 1997. Equine herpesvirus. *The horse*, 14(9). 28~31.

Ball, M. A. 2001. Equine herpesvirus. *The horse*, 18(6). 61~70.

Ben-Porat, T., Rixon, F. J. and Blankenship, M. L. 1979. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. *Virology*, 95(2). 285~294.

Bernard, W. V., LeBlanc, M. M., Webb, B. A. and Stromberg, A. J. 2004. Evaluation of early fetal loss induced by gavage with eastern tent caterpillars in pregnant mares. *J Am Vet Med Assoc.* 225(5). 717~721.

Bitsch, V. 1972. Cases of equine coital exanthema in Denmark. *Acta*

Vet Scand., 13. 281~283.

Blanchard, T. L., Kenny, R. M. and Timoney, P. J. 1992. Venereal disease. *Vet Clin N Am Equine practs.*, 8. 191~203.

Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J. S., Love, C. C., Brinsko, S. P. and Rigby, S. L. 2003. Manual of equine reproduction. 2nd. ed. Mosby, St. Louis, pp.149~153.

Borchers, K., Wiik, H., Frolich, K., Ludwig, H. and East, M. L. 2005. Antibodies against equine herpesviruses and equine arteritis virus in Burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the Serengeti ecosystem. *J Wildl Dis.*, 41(1). 80~86.

Bowen, J. M. 1987. Venereal diseases of stallions. p.567. In "Current therapy in equine medicine 2nd. ed." (ed. Robinsosn N. E.) Saunders, Philadelphia.

Boyle, M. S., Skidmore, J., Zhang, J. and Cox, J. E. 1991. The effects of continuous treatment of stallions with GnRH analogue. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44. 169~182. In "Equine behavior" (ed. McGreevy P). Saunders, China, 2004.

Brown, C. M. and Bertone, J. 2002. The 5-minute veterinary consult : equine. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp.512~763.

Bryans, J. T. 1969. The herpesviruses in disease of the horse. *Proceedings Am Assoc Equine Pract.*, 14. 239~265.

Bryans, J. T. 1980. Herpesviral diseases affecting reproduction in the horse. *Vet Clin N Am Large Ani pract.*, 2. 303~305.

Bryans, J. T. and Allen, G. P. 1973. *In vitro* and *in vivo* studies of equine coital exanthema. pp.322~336. In "Equine Infectious Diseases III" (eds. Bryans, J. T. and Gerber, H.), S. Karger, New York.

Carlton, W. W. and McGavin M. D. 1995. Thomson's special veterinary pathology. Mosby, Missouri, p.163.

Chowdhury, S. I., Buhk, H. J., Ludwig, H. and Hammerschmidt, W. 1990. Genomic termini of equine herpesvirus 1. *J Virol.*, 64(2). 873~880.

Church, S. L. 2005. Neurologic herpesvirus in Canada and Pennsylvania. *The horse*, 22(4), 14~15.

Colahan, P. T., Mayhew, I. G., Merritt, A. M. and Moore, J. N. 1991. Equine medicine and surgery 4th. ed. American Veterinary Publications, California, pp.1058~1707.

Colahan, P. T., Merritt, A. M., Moore, J. N. and Mayhew, I. G. 1999a. Equine medicine and surgery 5th. ed. Mosby, Missouri, pp.1071~1921.

Colahan, P. T., Mayhew, I. G., Merritt, A. M. and Moore, J. N. 1999b. Manual of equine medicine and surgery. Mosby, Missouri, pp.287~481.

Crabb, B. S., Allen, G. P. and Studdert, M. J. 1991. Characterization of

the major glycoproteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. *Gen Virol.* 72(9). 2075~2082.

Craig, J. F. and Kehoe, D. 1921. Horse pox and coital exanthema. *J Comp pathol Therapeutics*, 34. 126~129.

Crandell, R. A. and Davis, E. R. 1985. Isolation of equine coital exanthema virus (equine herpesvirus 3) from the nostril of a foal. *J Am Vet Med Assoc.*, 187. 503~504.

Darlington, R. W. and James C. 1966. Biological and morphological aspects of the growth of equine abortion virus. *J Bacteriol.*, 92. 250~257. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Darlington, R. W. and Randall, C. C. 1963. The nucleic acid content of equine abortion virus. *Virology*, 19. 322~337.

Davies Morel, M. C. G. 1999. Equine reproductive physiology, breeding and stud management. CABI Publishing, Oxon, p.396.

de la Fuente, R., Awan, A. R. and Field, H. J. 1992. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antiviral Res.*, 18(1). 77~89.

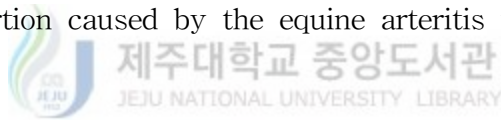
Dimmock, N. J. and Primrose, S. B. 1994. Introduction to modern

virology. 4th. ed. Blackwell Science, Oxford, pp.201-251.

Dingwell, K. S., Brunetti, C. R., Hendricks, R. L., Tang, Q., Tang, M., Rainbow, A. J. and Johnson, D. C. 1994. Herpes simplex virus glycoprotein E and I facilitate cell to cell spread in vivo and across junctions of cultured cell. *J Virol.*, 68. 834~845.

Doll, E. R., Bryans, J. T., McCollum, W. H. and Crowe, M. 1957a. Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.*, 47. 3~41.

Doll, E. R., Knappenberger, R. E. and Bryans, J. T. 1957b. An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet.*, 47. 69~75.



Dumas, A. M., Geelen, J. L. M. C., Weststrate, M. W., Wertheim, P. and van der Noordaa, J. 1981. XbaI, PstI, and BglIII restriction enzyme maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. *J Virol.*, 39(2). 390~400.

Dunowska, M., Wilks, C. R., Studdert, M. J. and Meers, J. 2002. Viruses associated with outbreaks of equine respiratory disease in New Zealand. *N Z Vet J.*, 50(4). 132~139.

Dutta, S. K., Myrup, A. C. and Thaker, S. R. 1986. In vitro interference between equine herpesvirus types 1 and 2. *Am J Vet Res.*, 47(4). 747~750.

Dutta, S. K., Talbot, N. C. and Myrup, A. C. 1983. Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res.*, 44(10). 1930~1934.

Dwyer R. 1993. Post partum deaths of mares. *Equine Dis Qtly.*, 2. 104~105.

Dwyer, R., Powell, D. and Williams N. 2004. Second quarter 2004. *Equine disease quarterly*, 13(4). 2.

Dynon, K., Varrasso, A., Ficorilli, N., Holloway, S. A., Reubel, G. H., Li, F., Hartley, C. A., Studdert, M. J. and Drummer, H. E. 2001. Identification of equine herpesvirus 3 (equine coital exanthema virus), equine gammaherpesviruses 2 and 5, equine adenoviruses 1 and 2, equine arteritis virus and equine rhinitis A virus by polymerase chain reaction. *Aust Vet J.*, 79. 695~702.

Eades, S. C. and Bounous, D. I. 1997. Laboratory profiles of equine diseases. Mosby, St. Louis, pp.5~83.

Ehlers, B., Borchers, K., Grund, C., Frolich, K., Ludwig, H. and Bukk H. J. 1999. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesvirus by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes*. 18(3). 211~220.

England, G. C. W. 1996. Allen's fertility and obstetrics in the horse. 2nd. ed. Black Publishing, Oxford, pp.123~192.

England, I. J. and Reed, D. E. 1980. Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viruses of veterinary importance. *Cornell Vet.*, 70. 125~136.

Evans, J. W., Torbeck, R. L., Rossdale, P. D., Nolan, M. J., Brandt, G. W., Bowen, J. M., Gratny, L. L., Hadden, W. A., Spence, G. S. and White, M. A. 1982. Breeding management & foal development. Equine Research INC, Texas, pp.200~248.

Feilen, C. P., Walker, S. T. and Studdert, M. J. 1979. Equine herpesvirus type 3 (equine coital exanthema) in New South Wales. *Aust Vet J.*, 55. 443~444.

Fields, B. N., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Howley, P.M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. and Straus, S. E. 1995. Fundamental virology. 3rd. ed. Lippincott-Raven, New York pp.1043~1107.

Fraser, C. M., Bergeron, J. A., Mays, A. and Aiello, S. E. 1991. The merck veterinary manual. 7th. ed. Merck & Co., Inc. Rahway, p.684.

Friday, P. A., Scarratt, W. K., Elvinger, F., Timoney, P. J. and Bonda, A., 2000. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J Vet Intern Med.*, 14(2). 197~201.

Fu, Z. F., Robinson, A. J., Horner, G. W., Dickinson, L. G., Grimmett, J. B. and Marshall, R. B. 1986. Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. *N Z Vet J.*, 34(9). 152~155.

Fukushi, H., Tanaiguchi, A., Yasuda, K., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T. and Hirai, K. 2000. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. *J Neurovirol.*, 6(4). 314~319.

Fukushi, H., Tomita, T., Tanaiguchi, A., Ochiai, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T. and Hirai, K. 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. *Virology*, 227. 34~44.

Gibbs, E. P. J., Roberts, M. C. and Morris, J. M. 1970. Equine coital exanthema in the U. K. *Vet Rec.*, 87. 91~97.

Gibbs, E. P. J., Roberts, M. C. and Morris, J. M. 1972. Equine coital exanthema in the United Kingdom. *Equine Vet J.*, 4. 74~80.

Girard, A., Greig, A. S. and Mitchell, D. 1968. Virus associated with vulvitis and balanitis in the horse—a preliminary report. *Can J Comp Med.* 32. 603~604.

Gleeson, L. J., Sullivan, N. D. and Studdert, M. J. 1976. Equine herpesvirus: Type 3 as an abortigenic agent. *Aust. Vet. J.*, 52(8), 349~354. In "Virus infections of equines". (ed. Studdert M. J.). Elsevier, Amsterdam.

Gutekunst, D. E., Malmquist, W. A. and Becvar, C. S. 1978. Antigenic relatedness of equine herpes virus types 1 and 3. *Arch. Virol.*, 56. 33~45.



Hartley, C. A., Drummer, H. E. and Studdert, M. J. 1999. The nucleotide sequence of the glycoprotein G homologue of equine herpesvirus 3 (EHV3) indicates EHV3 is a distinct equid alphaherpesvirus. *Arch Virol.*, 144. 2023~2033.

Hawcroft, T. 1994. A-Z of horse disease & health problems. Howell Book House, New York, p.177.

Hayes, M. H. 2002. Veterinary notes for horse owners 18th ed. Simon & Schuster, Great Britain, pp.365~495.

Henning, M. W. 1946. The etiology of epizootic or infectious equine abortion. *Ondersteport J Vet Res.*, 21. 17~40.

Henry, B. E., Robinson, R. A., Dauenhauer, S. A., Atherton, S. S., Hayward, G. S. and O'Callaghan, D. J. 1984. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology*, 115(1). 97~114.

Herbert, K. S. 2005. EHV-1 outbreak confirmed at Churchill Downs. *The horse*, 22(7), 14~15.


Higgins, A. J. and Wright, I. M. 1995. The equine manual. Saunders, London, pp.602~610.

Hinojosa, A. M., Bloeser, J. R., Thomson, S. R. M. and Watson, E. D. 2001. The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions. *Theriogenology*. 56(5). 903~912. In "Equine behavior" (ed. McGreevy P). Saunders, China, 2004.

Hsuing, G. D., Fischman, H. R., Fong, C. K. and Green, R. H. 1969. Characterization of a cytomegalovirus-like virus isolated from spontaneously degenerated equine kidney culture. *Proc Soc Exptl Biol and Med.*, 130. 80~84. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Jacob, R. J. 1986. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema : Temperature-sensitive function(s) in cells infected with equine herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 11. 221~237.

Jacob, R. J., and Steiner, M. R. 1986. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema(ECE) : Identification and expression of infected cell polypeptides at the restricted temperature during equine herpesvirus 3 infection. *Vet Microbiol.*, 18. 363~371.

A logo for Jeju National University Library, featuring a stylized 'J' and 'U' with a green and blue wave-like design. The text '제주대학교 중앙도서관' and 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY' is visible.

Jacob, R. J., Cohen D., Bouchey D., Davis, T. and Borchelt, J. 1988. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema : Identification of a new equine herpesvirus isolated from lesions reminiscent of coital exanthema in a donkey. pp. 140~146. In "Equine infectious disease V". (ed. Powell D. G.). The university press of Kentucky, Lexington.

Jamieson, A. T., Gentry, G. A. and Subak-Sharpe, J. H. 1974. Induction of both thymidine and deoxycytidine kinase activity by herpes viruses. *J Gen Virol.*, 24. 465~480. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert, C. M. 1988.

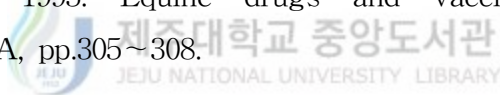
Zinsser microbiology. 19th. ed. Appleton & Lange, Connecticut, pp.649~801.

Jones, T. C. and Hunt, R. D. 1983. Veterinary pathology. Lea & Febiger, Philadelphia, p.1576.

Jubb, K. V. F. and Kennedy, P. C. 1985. Pathology of domestic animals. 3rd. ed. Academic, New York, p.409.

Kamada, M. and Studdert, M. J. 1983. Analysis of small and large plaque variants of equine herpesvirus type 3 by restriction endonucleases. *Arch Virol.*, 77. 259~264.

Kellon, E. M. 1995. Equine drugs and vaccines. Breakthrough Publications, USA, pp.305~308.



King, M. 2002. Sexually transmitted diseases. *The horse*, 19(10). 49~54.

Kleiboeker, S. B. and Chapman, R. K. 2004. Detection of equine herpesvirus 3 in equine skin lesions by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.*, 16(1). 74~79.

Knottenbelt, D. C. and Pascoe, R. R. 1997. Diseases and disorders of the horse. Mosby-Wolfe, Barcelona, pp.390~410.

Kobayashi, K. 1961a. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. I. Serial cultivation of the virus in the culture of

various horse tissues. *Virus*, 11. 177~189.

Kobayashi, K. 1961b. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. II. Propagation of the virus in horse born marrow cell culture. *Virus*, 11. 189~201.

Kobayashi, K. 1961c. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. III. Propagation of the virus in horse leucocyte culture. *Virus*, 11. 249~256.

Kobayashi, K. and Kono, Y. 1967. Propagation titration of equine infectious anemia virus in horse leucocyte culture. *Nat Inst Anim Hlth Quart.*, 7. 8~20.

Kobluk, C. N., Ames, T. R. and Geor, R. J. 1995. The horse diseases & clinical management. Saunders, Philadelphia, pp.557~985.

Krogsrud, J. and Onstad, O. 1971. Equine coital exanthema. Isolation of a virus and transmission experiments. *Acta Vet Scand.*, 12. 1~14.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15;227. 680~685.

Lemaire, M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, J. and Thiry, E. 2000. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol.*, 38. 1885~1894.

Lloyd, D H., Littlewood, J. D., Craig, J. M. and Thomsett, L. R. 2003. Practical equine dermatology. Blackwell Science, Oxford, pp.48~50.

Lugwig, H., Biswal, N., Bryans, J. T., McComb, R. M., and Benyesh, M. M. 1971. Some properties of the DNA from a new equine herpesvirus. *Virology*, 45, 534~537. In "Virus infections of equines". (ed. Studdert M. J.). Elsevier, Amsterdam.

Lui, I. K. M. 1983. Equine herpesvirus. p.4. In "Current therapy in equine medicine 1st. ed." (ed. Robinsosn N. E.) Saunders, Philadelphia.

Martin, W. B., Martin, B., Hay, D. and Lauder, I. M. 1966. Bovine ulcerative mammilitis cause by a herpes virus. *Vet Rec.*, 78A. 494~497.



Matsumura, T., Kondo, T., Sugita, S., Damiani, A. M., O'Callaghan, D. J. and Imagawa, H. 1998. An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horse. *Virology*, 242. 68~79.

Matumoto, M., Ishizak, R. and Shimizu, T. 1965. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in various countries. *Arch Gesamte Virusforsch.*, 15. 609~624. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Mayfield, J. E., Good, P. J., VanOort, H. J., Campbell, A. R. and Reed, D. E. 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine

herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol.*, 47(1). 259~264.

McCollum, W. H., Doll, E. R. Wilson, J. C. and Johnson, C. B. 1962. Plaque formation by equine rhinopneumonitis virus on monolayer cell cultures of equine, ovine, and porcine kidneys. *Cornell Vet.*, 52. 534~542. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

McKinnon, A. O. and Voss, J. L. 1993. Equine reproduction. Williams & Wilkins, Media, pp.126~884.

McMullan, W. C. 1982. The skin. p. 789. In "Equine medicine and surgery 5th. ed." (ed. Mansmann, R. A. and McAllister, E. S.) American Veterinary Publications, California.



Metcalf, E. S. 2001. The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim Reprod Sci.*, 68. 229~237.

Morris, D. D. 1989. Review of anemia in horses I; Clinical signs, laboratory findings and diagnosis. *Equine Pract.*, 11. 27~34.

Morrow, D. A. 1986. Current therapy in theriogenology. Saunders, Philadelphia, pp.646~651.

Murray, M. J., del Piero, F., Jeffrey, S. C., Davis, M. S., Furr, M. O., Dubovi, E. J. and Mayo, J. A. 1998. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J Vet Intern Med.*, 12(1). 36~41.

Narita, M., Uchimura, A., Kawanabe, M., Fukushi, H. and Hirai, K. 2001. Invasion and spread of equine herpesvirus type 9 in the olfactory pathway of pigs after intranasal inoculation. *J Comp Pathol.*, 124(4). 265~272.

Narita, M., Uchimura, A., Kimura, K., Tanimura, N., Yanai, T., Masegi, T., Fukushi, H. and Hirai K. 2000. Brain lesions and transmission of experimental equine herpesvirus type 9 in pigs. *Vet pathol.*, 37. 476~479.

Neidhardt, H., Schroder, C. H. and Kaerner, H. C. 1987. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E is not indispensable for viral infectivity. *J Virol.*, 61. 600~603.

O'Callaghan, D. J., Allen, J. P. and Randall C. C. 1978. Structure and replication of the equine herpesviruses. *J Equine Med Sur. Suppl.*, 1. 1~31.

O'Callaghan, D. J., Gentry, G. A. and Randall, C. C. 1983. The Herpesvirus Vol. 2. Plenum, New York, pp.215~318.

O'Callaghan, D. J., Henry, B. E., Wharton, J. H., Dauenhauer, S. A., Vance, R. B., Staczek, J. and Robinson, R. A. 1981. Developments in Molecular Virology Vol. 1. Nijhoff, The Hague, pp.387~418.

O'Callaghan, D. J., Hyde, J. M., Gentry, G. A. and Randall, C. C. 1968. Kinetics of viral deoxyribonucleic acid, protein, and infectious particle production and alterations in host macromolecular synthesis in equine

abortion (herpes) virus-infected cells. *J Virol.*, 2. 793~804. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Ostlund, E, N. 1993. The equine herpesvirus. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 9. 283~294.

Pascoe, R. R. 1980. Equine dermatoses. The university of Sydney, Sydney, pp.31~32.

Pascoe, R. R. 1981. The effect of equine coital exanthema on the fertility of mares covered by stallions exhibiting the clinical disease. *Aust Vet J.*, 57. 111~114.

Pascoe, R. R. 1994. Differential diagnosis of disease of horses, The university of Sydney, Sydney, pp.323~335.

Pascoe, R. R. and Bagust, T. J. 1975. Coital exanthema in stallions. *J Reprod Fertil Suppl.*, 23. 147~150.

Pascoe, R. R. and Knottenbelt, D. C. 1999. Manual of equine dermatology. 1st. ed. Saunders, Philadelphia, pp.95~96.

Pascoe, R. R., Bagust, T. J. and Spradbrow, P. B. 1972. Studies on equine herpesviruses: 4. Infection of horses with a herpesvirus recovered from equine coital exanthema. *Aust Vet J.*, 48. 99~104.

Pascoe, R. R., Spradbrow, P. B. and Bagust, T. J. 1968. Equine coital

exanthema. *Aust Vet J.*, 44. 485.

Pascoe, R. R., Spradbrow, P. B. and Bagust, T. J. 1969. An equine genital infection resembling coital exanthema associated with a virus. *Aust Vet J.*, 45. 166~170.

Plummer, G., Bowling, C. P. and Goodheart, C. R. 1969. Comparison of four horse herpesviruses. *J Virol.*, 4. 738~741. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Pycock JF. 1997. Self-assessment color review of equine reproduction and stud medicine. Manson Publishing, Barcelona, pp.13~120.

Randall, C. C. and Lawson, L. A. 1962. Adaptation of equine abortion virus to Earle's cell in serum-free medium with plaque formation. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 110. 487~489. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Rebordosa, X., Pinol, J., Perez-Pons, J. A., Lloberas, J., Naval, J., Serra-Hartmann, X., Espuna, E. and Querol, E. 1996. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res.*, 45. 59~68.

Reed, S. M. and Bayly, W. M. 1998. Equine internal medicine. Saunders, Philadelphia, pp.545~546.

Riegel, R. J. and Hakola, S. E. 1999. Illustrated atlas of clinical equine anatomy and common disorders of the horse. Vol. 2. Equistar Publications, Ohio, pp.41~42.

Roberts, C. M., Gleeson, L. J. and Studdert, M. J. 1976. Equine herpesvirus. Type 3. (Equine coital exanthema) in Victoria. *Vic Vet Proc.*, 34. 44~47.

Robinson, N. E. 1992. Current therapy in equine medicine 3rd. ed. Saunders, Philadelphia, p.710.

Robinson, N. E. 1997. Current therapy in equine medicine 4th. ed. Saunders, Philadelphia, p.513.

Robinson, N. E. 2003. Current therapy in equine medicine 5th. ed. Saunders, Philadelphia, p.303~474.

Roizman, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C., and Studdert, M. J. 1992. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.*, 123, 425~449. In "Virus infections of equines". (ed. Studdert M. J.). Elsevier, Amsterdam.

Romanet L. 2005. International agreement on breeding, racing and wagering and appendixes. International Federation of Horseracing Authorities, France, pp.36~39.

Rooney, J. R. and Robertson, J. L. 1996. Equine pathology, Iowa State University Press, Ames, pp.239~265.

Rose, R. J. and Hodgson, D. R. 1993. Manual of equine practice. Saunders, Philadelphia, p.273.

Rose, R. J. and Hodgson, D. R. 2000. Manual of equine practice. 2nd. ed. Saunders, Philadelphia, pp.378~379.

Rossdale, P. D. and Wreford, S. M. 1989. The horse's health from A to Z. Kangaroo Press, Great Bratain, p.107.

Ruyechan, W. T., Dauenhauer, S. A. and O'Callaghan, D. J. 1982. Electron microscopic study of equine herpesvirus type 1 DNA. *J Virol.*, 42(1). 297~300.

Savage, C. J. 1999. Equine medicine secrets. Hanley & Belfus, Philadelphia, p.244.



Scott, D. W. and Miller, W. H. Jr. 2003. Equine dermatology. 1st .ed. Saunders. Philadelphia. pp.376~394.

Seki, Y., Seimiya, T. M., Yaegashi, G., Kumagai, S., Sentsui, H., Nishimori, T. and Ishihara, R. 2004. Occurrence of equine coital exanthema in pastured Draft horses and isolation of equine herpesvirus 3 from progenital lesions. *J Vet Med Sci.*, 66. 1503~1508.

Sellnoe, S. 1999. Post foaling problems in mares. *The Horse.* 16(3). 40~51.

Sertich, P. L. 1994. Periparturient emergencies, *Vet Clinic North Am*

Equine Practice. 10(1). 19~36.

Siegal, M., Barlough, J. E. and Siegal, V. B. 1996. Book of horses, Harper Collins Publishers, Davis, pp.125~311.

Slater, J. D., Borchers, K., Thackray, A. M. and Field, H. J. 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol.*, 75. 2007~2016.

Soehner, R. L., Gentry, G. A. and Randall, C. C. 1965. Some physicochemical characteristics of equine abortion virus nucleic acid. *Virology*, 26. 394~405.

Spear, P. G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars virol.* 4. 167~180.



Stevely, W. S. 1977. Inverted repetition in the chromosome of pseudorabies virus. *J Virol.*, 22(1). 232~234.

Stokes, A., Friday, P. A., Scarratt, W. K., Elvinger, F., Killington, R. A., Hliburton. I. W., Whittaker, G. R., Wheldon, L. A. and Nicolson, L. 1991. Studies on glycoprotein 13 (gp13) of equid herpesvirus 1 using affinity-purified gp13, glycoprotein-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides in a hamster model. *J Gen Virol.* 72(4). 923~931.

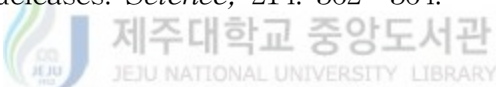
Straus, S. E., Aulakh, H. S., Ruyechan, W. T., Hay, J., Casey, T. A., Vande Woude, G. F., Owens, J. and Smith, H. A. 1981. Structure of varicella-zoster virus DNA. *J Virol.*, 40(2). 516~525.

Straus, S. E., Owens, J., Ruyechan, W. T., Takiff, H. E., Casey, T. A., Vande Woude, G. F. and Hay, J. 1982. Molecular cloning and physical mapping of varicella-zoster virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79(4). 993~997.

Studdert, M. J. 1974. Comparative aspects of equine herpesviruses. *Cornell Vet.*, 64. 94~122.

Studdert, M. J. 1996. Virus infections of equines. Elsevier, Amsterdam, pp.39~46.

Studdert, M. J., Simpson, T. and Roizman, B. 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, 214. 562~564.

 제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
Sullivan, D. C., Atherton, S. S., Staczek, J. and O'Callaghan, D. J. 1984. Structure of the genome of equine herpesvirus type 3. *Virology*, 132(2). 352~367. In "Virus infections of equines". (ed. Studdert M. J.). Elsevier, Amsterdam.

Taniguchi, A., Fukushi, H., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T. and Hirai, K. 2000. Pathogenicity of a new neurotropic equine herpesvirus 9 (Gazelle herpesvirus 1) in horses. *J Vet Med Sci.*, 62(2). 215~218.

Taniguchi, A., Fukushi, H., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T. and Hirai, K. 2000. Equine herpesvirus 9 induced lethal encephalomyelitis in experimentally infected goats. *Arch Virol.*, 145(12). 2619~2627.

Thein P. 1978. The association of EHV-2 infection with keratitis and research on the occurrence of equine coital exanthema (EHV-3) of horses in Germany. 33-41. In "Equine infectious disease IV." (ed. Bryans, J. T. and Gerber, H.) Veterinary Publications, Inc., Princeton.

Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W., Barlough, J. E. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed., Cornell University Press, New York, pp.593~615.

Uppal, P. K., Yadav, M. P., Singh, B. K. and Prasad, S. 1989. Equine coital exanthema (EHV-3 virus) infection in India. *J. Vet. Med. B.*, 36. 786~788.

van de Moer, A., Rice, M. and Wilks, C. R. 1993. A type-specific conformational epitope on the nucleocapsid of equid herpesvirus-1 and its use in diagnosis. *Arch Virol.*, 132(1-2). 133~144.

Varner, D. D., Schumacher, J. and Blanchard, T. L. 1991. Disease and management of breeding stallions. 1st ed. American veterinary publications, California, p. 299.

Vivrette, S. 1997. Current therapy in equine medicine. 4th ed. Saunders, Philadelphia, pp.547~559.

West, G. P. 1992. Black's veterinary dictionary. 17th ed. A & C Black, London, p.193.

Wharton, J. H., Henry, B. E. and O'Callaghan, J. O. 1981. Equine

cytomegalovirus: culture characteristics and properties of viral DNA. *Virology*, 109. 106~119.

Wilks, C. R. and Studdert, M. J. 1976. Equine herpesvirus 6; Sequential infection of horses with types 2, 3 and 1. *Aust Vet J.*, 52. 199~203.

Yanai, T., Fujishima, N., Fukushi, H., Hirata, A., Sakai, H. and Masegi, T. 2003. Experimental infection of equine herpes 9 in dogs. *Vet Pathol.*, 40. 263~267.

Yanai, T., Tujioka, S., Sakai, H., Fukushi, H., Hirai, K. and Masegi, T. 2003. Experimental infection with equine herpes 9(EHV-9) in cats. *J Comp Pathol.*, 128(2-3). 113~118.

Yeargan, M. R., Allen, G. P., and Bryans, J. T. 1985. Rapid subtyping of equine herpesvirus 1 with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.*, 21. 694~697.

남도영. 2003. 濟州道 牧場史. 개정판. 한국마사회, 과천. pp.41~173.

농림부. 2004. 말 수입 위생조건. 과천. 6 pp.

문혁, 강완철, 김은주, 김진희, 고현주, 양재혁, 손원근, 이두식. 2001. 제주도내 자연발생한 말유산태아에서 PCR을 이용한 Equine Herpesvirus Type-1 검출. *韓家衛誌*, 24(1). 83~88.

신태균, 이두식, 진재광, 임윤규, 조길재. 1996. 유산망아지에서 말 herpesvirus의 면역조직학적 및 immunogold 기법에 의한 전자현미경적

진단. *J Res Ins Anim Sci.*, 12. 111~118.

이영옥, 안수환, 전영, 윤용덕, 박봉균, 허영, 김종만, 장환, 김용희, 설동섭, 송지봉, 정종기, 이근희, 김희파. 1986. 주요 말 전염성 질병에 대한 국내 보유마필의 감염현황조사. *대한수의학회지*, 26(1). 87~92.

임윤규. 1991. Protein G를 이용한 효소표지면역반응법의 확립과 실험동물에서의 Sendai Virus에 대한 항체검출. 서울대학교 박사학위논문.

조길재, 김봉환, 이두식, 신태균, 양기천, 임윤규, 조성수. 1995a. 국내 말로부터 비페렴바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구, I. 말 비페렴바이러스(equine rhinopneumonitis virus)에 대한 혈청학적 역학조사. *대한수의학회지*, 35(4). 735~741.

조길재, 김봉환, 이두식, 오문유, 고미희. 1995b. 국내 말로부터 비페렴바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구, II. 국내 분리 말 비페렴바이러스의 특성 및 면역원성 조사. *대한수의학회지*, 35(4). 743~752.

조길재, 김봉환, 소신희, 이두식. 1995c. 국내 말로부터 비페렴바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구, III. 말 비페렴바이러스의 실험동물에 대한 면역원성 조사. *대한수의학회지*, 35(4). 753~758.

한국마사회. 2004. 마사연감. 과천, pp.333~429.

요 약

국내 발생 말구진에서 Equine herpesvirus type 3의 분리와 특성연구 및 혈청학적 진단법 개발

말구진(equine coital exanthema: ECE)은 equine herpesvirus type 3(EHV-3)에 의해 유발되는 급성의 성매개성 감염증이고 이런 질환 등으로 인해 교배가 불가능하게 되면 망아지 생산성의 저하뿐만 아니라 경주마 생산농가의 경제적 피해를 초래하게 되고 말산업 및 국내 경마산업에 적지 않은 피해를 입히게 된다.

본 연구에서는 말 생산농가에 경제적 피해를 최소화하기 위한 기초연구를 목적으로 국내에서 처음 발병한 말구진의 임상학적 및 역학적 특징을 규명하고 원인바이러스의 특성을 규명하여 면역학적 자료로 활용하며 감염여부를 확인하기 위한 혈청학적 진단법을 개발하였다.

씨수말에서 병변은 귀두, 음경체 및 포피에 집중되어 수포, 농포, 가피 및 궤양 등이 나타났고 치료 후에는 탈색된 반점이 남았으며 EHV-3의 배출기간은 약 22~23일이었다. 씨암말에서의 병변은 회음부, 음순 및 점막피부접합부에 국한되었고 수포, 농포, 가피 및 궤양 등이 나타났고 치료 후에는 탈색된 반점이 남았다.

임상증상을 보이는 씨수말에서 리비도에는 영향이 없었고 말구진의 합병증은 귀두열창 및 보행장애를 유발하였다. 임상증상을 보이는 씨암말의 임상병리검사(혈액학 및 호르몬)에서 건강한 말들과 차이점이 없었고 그 포유망아지의 비공과 구강검사에서 병변은 없었고 PCR 검사에서 음성이었다. 시정마의 비공에서 EHV-3가 검출되어 무증상 carrier로 작용할 가능성이 있다. 감염된 씨수말의 임신능력에는 영향이 없었고 치유 후에 교

배를 하여도 교배 상대마에서 임상증상은 관찰할 수 없었다.

세포배양은 MDBK cell과 RK-13 cell을 이용하였다. 두 세포에서 접종 48시간에 CPE가 관찰되었고 이는 기존의 세포배양 방법보다 느린 편이었다. 그리고 herpesvirus 입자 2개가 관찰되었다. RK-13 cell에서 분리한 바이러스를 PCR을 이용하여 검사한 결과 EHV-3만 검출됐고 EHV-1과 EHV-4는 검출이 되지 않았다. 분리된 EHV-3의 gG를 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. EHV-3 334/74 strain과 400개의 염기 중에서 397개가 일치하고 3개가 점돌연변이를 나타내어 99.25 %의 상동성을 보였다. 또한 국내 분리주인 EHV-3 (거로주로 명명함)의 단백질을 분석한 결과 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 나타내었고 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 밴드를 관찰하였다.

EHV-3 감염진단을 위하여 ELISA 법을 개발하였다. ELISA 용 microplate에 흡착된 정제된 EHV-3와 반응하여 결합된 마혈청 중의 EHV-3 특이 항체는 HRP와 goat anti-horse IgG 접합체에 의하여 인지되어 ABTS의 발색에 의하여 EHV-3에의 노출여부가 확인되었다. 15 두의 음성대조 마혈청에 의한 cut-off는 OD₄₀₅ 0.334 로 나타났다. PCR에 의하여 항원이 양성인 말의 혈청 20 건에 대한 항체 양성률은 65 % (13/20)로 나타났으며, PCR 음성으로 나타난 말의 혈청 12 건에 대한 항체 양성률은 25 % (3/12)를 나타내었다. 씨수말과 씨암말을 대상으로 검사하였을 때, 임상증상을 보이고 있는 말에서의 항체 양성률은 59.7 % (43/72)를 보였으며, 임상증상을 보이지 않은 말의 혈청에서는 13.9 % (10/72)의 항체 양성률을 나타내었다. 임상증상을 보였던 씨암말과 그녀의 망아지에서의 혈중 항체가와는 상관관계($y = 0.5418x - 0.0158$, $R^2 = 0.4931$)를 보여 씨암말의 감염에 따른 특이항체전이가 있었음을 짐작할 수 있었다.

주요어 : 말구진, EHV-3, RK-13 cell, DNA Sequencing, ELISA

감사의 글

오랜 기간 지속적인 사랑과 지혜로 학문의 길을 밝혀주신 임 윤규 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 본 논문을 정성껏 다듬어 주시고 심사해주신 이 경갑, 황 규계 교수님, 경북대학교 조 길재 교수님, 한국마사회 김 준규 박사님과 학부시절부터 많은 가르침을 주셨던 김 희석 교수님을 포함한 모든 교수님께도 고개 숙여 감사드립니다.

또한 인간적으로, 학문적으로 많은 도움을 주셨던 제주도보건환경연구원 김 영주 박사님, 국립수의과학검역원 김 성희 박사님, 밤늦도록 실험에 헌신해 준 바이오돔의 이 기정 연구원, 경익, 형순 그리고 제주도가축위생방역연구소의 하 종철 선생에게도 고마움을 전합니다.

어렸을 적부터 제게 학문의 존귀함을 보여주셨던 양 중해 백부님, 스승이자 사촌형인 양 보현 선생님, 한림대 의대 양 익 형님, 삼성연구원의 양 호 형님께도 존경과 고마움을 전합니다. 그리고 연구에 정진할 수 있도록 배려해주신 한국마사회 김 희파 처장님, 최 귀철 부장님, 양 영진·이 용덕 박사님 그리고 바쁜 업무 속에서도 묵묵히 도와준 이 영우·조 영재 선생에게도 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

앞으로 지속적인 말수의학 연구에 정진할 것을 다짐하며 제 뒷바라지에 헌신하셨던 사랑하는 어머님과 아내 은화 그리고 두 딸 현서, 예서와 이 기쁨을 나누려합니다.

아버님! 아버님께서 생전에 그토록 원하셨던 박사학위를 제가 이루었습니다.

하얀 눈이 세상을 덮은 2006년 벽두 교래리에서