

석사학위논문

제주지역 말에서 분리한 *Streptococcus equi*
subspecies *equi*의 특성과 선택배지의 개발



제주대학교 대학원

수의학과

문자호

2006년 2월

제주지역 말에서 분리한 *Streptococcus equi* subspecies *equi*의 특성과 선택배지의 개발

지도교수 손 원 근

문 자 호

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함



문자호의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	인
위 원	인
위 원	인

제주대학교 대학원

2005년 12월

초 록

제주지역 말에서 분리한 *Streptococcus equi* subspecies *equi*의 특성과 선택배지의 개발

(지도교수 : 손 원 근)

문 자 호

제주대학교 대학원 수의학과

상부호흡기의 화농성 인후두염과 림프절염을 일으키는 선역은 전염성이 아주 강하고 마과동물에서만 발생하는 질병이다. *S. equi* subsp. *equi*가 원인체이고 문헌적으로 상당히 오랫동안 임상적 측면과 역학적 측면에 관한 연구가 진행되어온 질병이다. 본 연구에서는 경부 림프절 농양, 발열, 점액화농성비루, 기침 증상을 보인 선역으로 의심된 제주지역 말에서 분리한 *S. equi* subsp. *equi*를 대상으로 배양에 필요한 대기조건, 표현형 및 생화학적 성상에 대한 특성을 확인하고, 이 균을 선택적으로 배양할 수 있는 선택배지를 개발하고자 본 연구를 실시하였다.

6곳의 제주지역 말 목장에서 선역이 의심되는 31두의 말로부터 비루를 채취하였다. 여기서 분리된 *S. equi* subsp. *equi*를 대상으로 증식에 필요한 대기조건에 따른 혈액배지상의 용혈양상과 PCR 및 API 20 STREP 검사로 표준균주와 차이점을 비교하였다.

31두의 말 중 3두에서는 호기성 *S. equi* subsp. *equi*가 분리 동정되었고 14두에서는 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi*가 분리 동정되었다. PCR 결과 표준균주와 동일한 692 bp PCR 산물이 나타났고 API 20 STREP 검사에서도 표준균주와 생화학적 특성이 동일함을 확인하였다.

선역 증상을 보인 말에서 채취한 시료에 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*가 오염된 경우 선역의 세균학적 감별이 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이 균들의 당분해능과 증식에 필요한 적정 혈액농도를 평가하여 이 균들이 혼합 감염되었을 때 *S. equi* subsp. *equi*를 신속하게 동정할 수 있는 선택배지를 개발하였다. 이 선택배지에는 *S. equi* subsp. *equi*가 분해하지 못하는 lactose와 trehalose, 그람음성균들을 억제하는 sodium azide를 첨가하였다. 이 선택배지를 사용하여 두 균을 각각 *S. equi* subsp. *equi*와 혼합 감염시켜 배양을 한 결과 신속하게 선역 원인균인 *S. equi* subsp. *equi*를 확인할 수 있었다.

주요어: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, 선역, 호이산화탄소성, 선택배지



목차

1. 종설	1
2. 서론	15
3. 재료 및 방법	17
4. 결과	23
5. 고찰	30
6. 결론	36
7. 참고문헌	37
8. 영문초록	46



종 설

1. 개요

선역은 *Streptococcus equi* subsp. *equi*의 감염에 의하여 마과동물(馬科動物)에만 발생하는 전염병이다(Bazely와 Battle, 1940). 발현되는 임상증상으로는 발열, 침울, 식욕부진, 화농성 비루 및 두경부의 종창이 있고, 특히 하악림프절과 후인두림프절의 뚜렷한 종창이 이 질병의 특징적인 임상증상이다(Dalgleish 등, 1993; Knight 등, 1975; Nara 등, 1983; Piche, 1984; Sweeney 등, 1989; Timoney, 1988; Wallace 등, 1995; Geroge 등, 1983). 모든 연령대의 말에서 나타나지만 특히 어린 말(1 ~ 5세)의 경우 감수성이 높고 임상증상도 심하게 나타난다. 보통 감염 후 1-2주가 경과하면 종대된 림프절의 농양이 터져 배출되고, 몇 주가 지나면 자연적으로 치유된다. 대다수 합병증이 발생하지 않은 경우 *S. equi* subsp. *equi*는 일시적인 국소 림프절종대, 하악림프절과 후인두림프절의 농양형성을 일으킨다. 합병증이 발생한 말에서는 이 균이 다른 장기로 전이하여 감염됨으로서 전이성 농양이 발생하고 이와 같은 상태를 'bastard strangles'이라고 한다. 전이성 농양은 폐, 장간막, 간, 비장, 신장 그리고 뇌에서 발견된다. 이들 전이성 농양의 합병증으로 폐사, 후낭축농증, 출혈성 자반증, 상부호흡기도 폐색, 후두편마비, 폐렴, 흉막폐렴, 무유증, 장간막림프절 농양, 안와주위 농양, 근병증, 사구체신염 등이 일어난다(Spoormaker, 2003; Ford 등, 1980; Judy 등, 1999; Pusteria 등, 2003; Valberg 등, 1996; Divers 등, 1992; Slater 등, 1993)

선역의 전염은 이환마 또는 보균마가 새로운 목장으로 도입될 때 많이 발생한다. 따라서 선역의 예방을 위해서는 엄격한 검역체계와 감염마의 조기발견을 통한 격리가 매우 중요하다. 선역에서 회복한 말은 75% 이상이 선역균에 대한 강한 면역을 획득한다고 보고되었고, 미국 등에서는 예방백신도 개발되어 있지만 질병의 정도와 감염된 말 두수를 줄일 수는 있겠지만 완벽하게 선역을 예방하지는 못한다(Bryant 등, 1985; Hoffman 등, 1991; Reif 등, 1985). 선역과 관련된 치료, 격리, 그리고 백신접종은 말 산업에 상당한 경제적 부담으로 작용하고 있다(Jorm, 1990).

2. 병원체, 임상증상, 발병기전

1) 병원체와 병원성인자

S. equi subsp. *equi*은 화농성 출혈성 Streptococci 군의 *Streptococcus* 속으로 분류되고, Lancefield의 C군 항원을 보유하고 있다. *S. equi* subsp. *equi*는 그람 양성, 통성 혐기성 구균이고 보통의 배지에서는 증식이 잘 안되며 혈액 또는 혈청을 첨가한 배지나 당을 첨가한 배지에서 잘 증식한다. 액체배지에 배양한 경우 연쇄상 증식 형태를 나타낸다. 혈액한천배지상에서는 투명·습윤하고 광택이 있는 점액성의 소집락을 형성하고 집락 주위에는 커다란 β-용혈환을 형성한다. 마체에 침입한 *S. equi* subsp. *equi*는 급속하게 전파되어 건강한 말에 감염을 일으킨다. 그렇지만 마체측의 면역계가 작동하기 시작하여 항체가 생산되면 균은 조금씩 제거되고 결국 소수의 예외를 제외하고 마체에서 완전히 소멸된다. 이에 비해 선역 병변부에서 분리되는 균종의 하나인 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*는 원래 건강한 말에 잠복하여 기생하고 있고, 어린말의 편도에서는 거의 100% 분리된다. 또한 보통 강한 병원성을 나타내지 않으나 수송스트레스와 바이러스 감염을 받은 후 또는 창상·염증을 보이거나 면역이상을 나타내는 말에서 일회성 감염을 일으키는 경우가 많다. 더욱이 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*는 말 이외의 많은 동물에서도 기생하고 있어서 넓은 숙주영역을 갖고 있다. 이처럼 선역균과 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*는 생물학적으로는 아주 비슷하지만 숙주범위와 병원성에서 아주 다르다(Timoney, 2004).

지금까지 보고된 *S. equi* subsp. *equi*의 병원성을 나타내는 인자들에는 비항원성 히알루론산 헤파, 스트렙토리신 S, 스트렙토키나아제, IgG Fc-수용체 단백질, SePE-I, II를 포함하는 발열외독소, 펩티도글리칸, 항식균 M 단백질(SeM) 등이 있다. 이들은 주로 항식균인자로 작용한다고 생각된다. *S. equi* subsp. *equi*의 헤파는 히알루론산이 세포 표면을 두껍게 덮고 있다. 이 헤파는 C군 연쇄상구균뿐만 아니라 병원성균인 *S. pyogenes*에도 존재해 항식균작용을 하는 것으로 알려져 있다. 세균의 펩티도글리칸과 보체가 상호작용하여 만들어내는 보체유도화학주성인자들은 많은 수의 다형핵 호중구를 끌어들인다(Oikawa 등, 1994). 이 호중구들은 히알루론산 헤파, 항식균성 SeM 단백질, Mac 단백질, 기타 확인되지 않은

항식균 인자들 때문에 *S. equi* subsp. *equi*를 포식하여 사멸시키지 못한다. 스트렙토리신 S와 스트렙토키나아제는 세포막 손상을 일으키고 플라스미노겐의 단백질 분해 특성들을 활성화시켜 농양발생과 용해를 일으킨다(Timoney 등, 1997; Meehan 등, 2002).

2) 임상증상

선역은 갑작스런 발열 후에 점액화농성 비루, 하악과 후인두림프절에서 농양이 형성되는 급성종창, 상부호흡기도 카타르가 특징적이다. Strangles이란 이름은 감염된 말에서 종창된 림프절이 기도를 막아 때때로 질식을 일으키기 때문에 붙여졌다. 이 질병의 증상은 말의 면역상태에 따라 상당히 달라진다. 나이가 많은 말들은 종종 비루와 작은 농양을 보이고 빠른 회복을 보이는 경증 형태를 보인다. 반면에 어린 말들은 시간이 지나면 누공이 형성되어 농이 배출되는 심한 림프절 농양을 일으키기 쉽다.

발열은 제일 먼저 나타나는 임상증상이고 림프절종대가 발생하여 농이 성숙할 때까지 지속된다. 인두염은 연하곤란을 일으키고, 이환마들은 식욕부진을 보이거나 먹기를 거부하고 종종 목을 쭉 뻗고 있다. 사료와 물을 삼킨 후 코로 사료와 물이 역류된다. 침울과 무기력도 흔히 관찰되는 임상증상이다. 인두염, 후두염, 그리고 비염을 일으켜 양측성 비루가 나타나며, 양측성 비루는 초기에는 장액성이지만 빠르게 점액화농성으로 변하여 후기에는 다량의 끈적끈적한 화농성 비루가 흘러 나온다. 화농성 삼출물이 축적되면 쿵쿵거리는 상부호흡기 잡음을 일으킨다. 코와 눈의 점막은 충혈되고, 눈에서 *S. equi* subsp. *equi*가 검출될 수도 있는 화농성 삼출물이 분비된다.

림프절종대가 주 임상증상이며 *S. equi* subsp. *equi* 감염에서 하악림프절과 후인두림프절은 거의 동등하게 감염되고, 감염 약 1주일 후부터 종창되어 통증을 일으킨다. 림프절종대의 첫 번째 증상은 열감이 있고, 미만성의 통증을 보이는 종창이다. 림프절 농양이 성숙하여 끈적끈적한 크림양 농이 배농되기 전에 농양을 덮고 있는 피부로부터 혈장이 스며 나온다. 배출되는 농은 악취가 없다. 경부 앞쪽 부분에 있는 다른 림프절(이하림프절, 앞쪽목림프절, 그리고 후인두림프절) 또한 빈번하게 감염되어 농양이 형성된다. 후인두림프절 농양은 후낭으로 배농되어 후낭축농증을 일으키기도 한다. 더 심부에 형성된 농양들이 자연적으로 피부로 배

농되기 위해서는 수일에서 수주가 걸리고 이 부종은 인두, 후두, 기관, 식도를 압박하여 심한 호흡곤란, 천명음, 그리고 연하곤란을 일으킨다. 후인두림프절 농양은 외부적으로 관찰될 수 있는 종창과 항상 관련이 있는 것은 아니다. 안와주위 농양은 눈꺼풀에 심한 부종을 일으킨다. 흉곽입구에 있는 림프절의 농양은 심각한 기관 압박, 질식, 그리고 폐사를 일으킨다. 기침은 많은 케이스에서 중요한 임상적 특징은 아니지만 일부 말들은 부드럽고 습한 기침을 하고, 이 기침은 증상이 진행됨에 따라 점점 더 습하게 되고 심해진다. 후두를 쥐어짜면 종종 눈에 띄는 통증을 보이고 천명음을 일으키며, 목을 놓았을 때 기침으로 헛구역질을 하고 목을 쭉 뻗은 후 구토를 한다. 기침과 함께 다량의 농이 코와 입으로 배출되면 후낭축농증이 있음을 나타낸다(Sweeney 등, 2005).

2) 심한 림프절 종창과 관계있는 임상소견

농양, 특히 후인두림프절의 농양은 상부호흡기도 폐쇄를 일으킬 수 있다. 종대된 림프절들은 인두, 후두, 또는 기관을 압박할 수 있기 때문에 종종 케이스들에서는 기관절개술을 실시해야 한다. 후인두림프절 또는 앞쪽 경부림프절들 중 하나가 종대되어 반회후두신경에 손상을 일으켜 일시적인 후두편마비로 호흡곤란이 발생한다. 합병증이 발생한 선역에 감염된 15두의 말 중에서 4두는 기관절개술을 필요로 하는 상부호흡기도 폐쇄가 있었고 이들 중 2두는 상부호흡기도 폐쇄에 의해 폐사했다는 보고도 있다(Sweeney 등, 1987). 또한 연하곤란도 림프절 종대나 후낭축농증의 결과로 일어난다.

3) 발병기전

S. equi subsp. *equi*는 구강 또는 코를 통해 침입하여 설편도와 구개편도의 음와세포들과 인두편도와 이관편도의 여포연관상피(follicular-associated epithelium, FAE)에 부착한다. 침입 이전에 집락형성에 대한 증거는 없고, *S. equi* subsp. *equi*은 몇 시간 이내에 편도의 더 깊은 조직에 도달한다. 결합을 일으키는 리간드들은 노출 표면단백질들인 SzPSe, Se73.9, 그리고 Se51.9이다. *S. equi* subsp. *zooepidemicus*에 의해 생산된 섬유결합소 결합 단백질인 FNZ도 또한 *S. equi* subsp. *equi*에 의해 생산되지만 C terminal anchor가 없기 때문에 기능은 없을 것이다. 감염 몇 시간 후에는 점막표면에서 검출하기 어렵지만 상피와 상피하소

포들의 세포내에서 *S. equi* subsp. *equi*가 나타난다. 몇 시간 후에 하악림프절과 인두위림프절로 자리를 옮기고 이 림프절들은 인두와 편도 부위로 배농된다 (Sweeney 등, 2005).

세균 펩티도글리칸과 보체의 상호작용 후에 만들어진 보체유도화학주성인자들은 많은 수의 다형핵 호중구를 끌어들이지만, *S. equi* subsp. *equi*가 림프절을 침입한 후 3-5일 동안은 염증의 육안적 증거는 보이지 않는다(Mukhtar 등, 1988). 호중구들이 연쇄상구균을 포식하여 사멸시키지 못하는 것은 히알루론산 협막, 항식균 SeM 단백질, Mac 단백질, 그리고 이 세균이 방출하는 기타 확인되지 않은 항식균인자의 작용에 의한 것으로 생각된다. 이것은 많은 수의 퇴행하는 호중구들에 둘러싸인 긴 사슬 형태의 많은 세포외 연쇄상구균을 축적시킨다. 세균들은 최종적으로 농양 피막의 용해와 이 내용물들의 배출에 의해 처리된다.

스트렙토리신 S와 스트렙토키나아제도 또한 세포막 손상을 일으키고 플라스미노겐의 단백질분해 특성들을 활성화시킴으로서 농양 발생과 용해에 관여한다. 선역은 주로 후낭과 관련된 림프절들이 존재하는 상부호흡기도에서 일어나지만, 종종 다른 부위로 전이가 일어난다. 혈행성이나 림프 채널을 통해서 전파되고, 이것은 림프절과 기타 흉부와 복부 장기들에 염증을 일으킨다. 이 형태의 선역을 “bastard strangles”이라고 부른다. 뇌로 전이된 기록도 또한 있다(Spoormakers 등, 2003). 폐혈증은 병원성 *S. equi* subsp. *equi*를 비강 내로 접종한 말에서 6-12일에 나타났다(Evers, 1968).

감염의 최초 증상은 39.5°C 이상의 급격한 직장온도 상승이다. 이 체온상승은 감염 후 3일에서 14일 사이에 일어나고 SePE-H와 I인 발열성 유사분열물질들의 방출과 관계가 있다. 혈액 섬유소 농도와 백혈구수 그리고 호중구수도 또한 증가한다. 농양 발생은 빠르고 종종 수입림프관의 림프 축적을 동반한다.

S. equi subsp. *equi*은 발열 시작 2-3일 후 코를 통해 배출되기 시작하고 대부분 말에서 2-3주간 지속적으로 배출된다. 균을 배출하지 않는 말도 있지만, 후낭 감염이 지속되고 있다면 균 배출은 훨씬 더 오랫동안 지속된다(Chanter 등, 1998; Newton 등, 1997). 전신면역반응과 점막면역반응은 감염 2-3주 후에 명확하게 나타나며 점막 청소와 동시에 일어난다(Galán 등, 1985).

초기 부착과 침투에 필수적인 병원성 인자들이 생체 내 증식 세균들에서 더 많이 발현되기 때문에 배지에서 증식된 세균의 감염량은 자연적인 전파 동안 요구

되는 감염량보다 훨씬 더 많다. 또한 배양된 *S. equi* subsp. *equi*의 비내 접종량이 많으면 많을수록 잠복기간은 더 짧아지고 증상은 더 심하게 나타난다. 10^6 CFU 미만의 균을 접종하였을 경우에는 항상 질병을 일으키지는 못하는데 그 이유는 이렇게 소량의 세균은 점막섬모 청소에 의해 효과적으로 제거되기 때문이다 (Sweeney 등, 2005).

약 75%의 말은 선역으로부터 회복한 후 선역에 대한 강력하고, 지속적인 면역을 획득한다(Todd, 1910; Hamlen 등, 1994). 회복기 직후의 말은 최초의 감염을 일으키는데 필요했던 세균수보다 훨씬 더 많은 수의 *S. equi* subsp. *equi*를 사용한 실험적 감염에 내성을 보였다(Galán 등, 1985). 이들 말들 중에서 낮은 비율의 말들은 수개월 이내에 이 질병의 이차 공격에 감수성을 보였는데, 이것은 적절한 농도의 점막항체와 전신항체들을 생산하지 못했거나 유지하지 못했음을 나타낸다 (Sweeney 등, 2005). SeM, Se44.2, Se46.8, Se45.5, 그리고 Se42.0을 포함하는 표면 단백질들에 대한 강력한 혈청 IgGb 반응은 회복기 동안 일어난다. 강력한 항식균성 면역원인 SeM에 특이적인 opsonophagocytic 혈청 IgGb는 일부 말에서 회복기 말기에 나타난다(Timoney 등, 1985). *S. equi* subsp. *equi* 감염 동안 그리고 감염 직후 SeM 특이 IgGa가 유발된다. 강력한 SeP 특이 점막 IgA와 IgGb 반응들이 급성기와 회복기 동안 일어나지만 M양 단백질의 근육내 백신접종 후에는 일어나지 않는다(Sheoran 등, 1997). 잔여면역을 가지는 늙은 말들은 제한적인 감수성을 보이고 종종 “catarrhal strangles”이라고 불리는 경미한 형태의 선역을 일으킨다. 이 말들은 감수성이 높고, 종종 나이가 더 어린 말들에서 심한 질병을 일으킬 수 있는 병원성 *S. equi* subsp. *equi*를 배출한다(Sweeney 등, 2005).

선역으로부터 회복한 모마의 모유에는 회복기 말들의 인후두 점막에서 발견되는 IgGb와 IgA와 유사한 특이성들을 갖는 IgGb와 IgA를 가지고 있다(Galán 등, 1985). 따라서 포유를 하는 망아지들은 이유할 때까지 이 항체들의 보호작용을 받는다. 분만 후 24시간 동안 섭취되는 초유 항체들은 비인두 점막으로 재순환되어 분만 후 첫 1주일 동안 망아지를 보호한다(Timoney, 2004).

3. 역학

1) 국내의 발생의 역사와 현황

선역은 아주 오래전부터 발생한 말의 질병 중 하나이다. 최초의 기록은 1251년 Jordanus Ruffus에 의해 이뤄졌다고 전해지고 있다. 1880년대가 되면서 선역에 대한 다양한 연구가 행해졌다. 선역이 농에 의해 전파되는 것은 1800년대 초기에 이미 확인되었다. 게다가 1880년대에 본증의 원인균인 선역균이 발견되었고, 1890년에는 당시 그 존재가 알려진 '항체'를 응용한 능동 및 수동면역이 이미 시도되고 있었다(Slater. 2003). 이처럼 심혈을 기울인 연구의 역사가 있었음에도 불구하고 본 질병은 아직도 세계 각국의 마필생산지에서 보고되고 있다. 2004년 OIE 보고서에 의하면 아르헨티나, 호주, 바바도스, 보츠나와, 카메룬, 캐나다, 칠레, 이디오피아, 프랑스, 이스라엘, 몽고, 남미비아, 네덜란드, 뉴질랜드, 노르웨이, 파나마, 파라과이, 필리핀, 세네갈, 남아프리카, 스웨덴, 스위스, 미국, 우루과이, 짐바브웨 등의 국가에서 발생이 보고되었다.

국내에서는 그 동안 외국에서 도입하는 경주마나 씨암말에서 선역의 산발적인 발생이 있었으나, 폭발적인 집단발병 양상을 보인 적은 없다. 최근에는 국내 일부 지역에 마필 생산과 사육 두수가 증가하고 외국에서 도입하는 말과 관련 제품들이 증가하면서 마필 생산농가와 집단사육장에서 선역의증의 발병과 유행 사례가 증가하고 있는 실정이다.

2) 전파

선역 증상이 나타나고 있거나 선역으로부터 회복하고 있는 말의 화농성 삼출물은 감수성이 있는 말들 사이에서 쉽게 확인할 수 있는 *S. equi* subsp. *equi*의 감염원이다. 전파는 이환마들과 감수성 말들 사이에서 이 화농성 삼출물들에 들어 있는 *S. equi* subsp. *equi*의 직접 또는 간접 전파가 있을 때 발생한다. 직접 전파는 특히 상호 머리 접촉과 같은 정상적인 말의 사회성을 통한 말과 말의 접촉을 말한다. 간접 전파는 *S. equi* subsp. *equi*의 확산을 예방하기 위한 적절한 예방지침들이 시행되지 않았을 경우 오염된 마사, 상수원, 사료 또는 사료통, 코틀이, 마구, 그리고 관리사, 장제사, 수의사들의 피복과 장비와 같은 매개물들을 통해 일어

난다.

외형적으로 건강한 말들로부터 발생하는 전파도 있다는 인식이 높아지고 있다. 이 경우 감염원을 쉽게 확인할 수 없어서 선역 임상증상이 예상치도 못한 말에서 나타난다. *S. equi* subsp. *equi*는 잠복하고 있는 외형적으로 건강한 말들로부터 배출되어 질병을 발생시키기도 한다. 이런 말들에서는 정상적인 코 분비물이 감염원이라고 추정된다.

최근 감염으로부터 회복하고 있는 외형상 건강한 말들은 완전히 임상적으로 회복한 후에도 계속해서 이 세균을 보균하기도 한다. 어느 정도 비율의 말들은 임상증상이 사라진 후 수 주 동안 계속 *S. equi* subsp. *equi*를 보균하고 있다는 증거가 있지만, 대다수에서는 완전히 회복한 후 4-6주에는 더 이상 균을 검출할 수 없다. 회복된 말은 선역의 임상증상들이 완전히 사라진 후 최소한 6주 동안은 잠재적인 감염원이 될 수 있다(Newton 등, 1999).

다른 말들은 선역으로부터 완전히 회복을 하지만 주기적인 *S. equi* subsp. *equi*의 배출을 통해 장기간 동안 계속 감염을 일으킬 수 있다. 이런 말들을 장기 준임상 *S. equi* subsp. *equi* 보균마라고 하며, 감수성이 있는 말들에게 감염원이 될 수 있다(George 등, 1983; Timoney 1988; Sweeney 등, 1989; Dalgleish 등, 1993; Wood 등, 1993). 말 집단에 이런 말들의 도입은 새로운 대규모 발병의 원인이 될 수 있고, 심지어 관리가 잘 되고 있는 말 집단에서도 대규모로 선역을 발생시킬 수 있다. 이 범주의 말들을 확인하여 진단을 하고 치료를 해야만 선역을 효율적으로 통제할 수 있다(Newton 등, 2000). 준임상적 장기 보균마들 중에서 *S. equi* subsp. *equi*의 가장 잘 알려진 보균 장소는 후낭이고, 후낭은 후낭 바닥을 통한 인접 후인두림프절 농양 파열이 일어난 후 감염이 된다고 알려져 있다. 단기간 지속된 후낭축농증은 후인두림프절 농양의 합병증이 발생하지 않은 배농의 가장 빈번한 결과이다. 이 보균 상태는 최대 10%의 이환마들에서 발생하고 만성 후낭축농증을 일으킨다. 만일 후낭에서 화농성 물질이 계속 존재한다면, 이것이 농축되어 결국에는 “콘드로이드”라는 분리성 덩어리가 된다. 한 개 또는 다수, 심지어 아주 많은 콘드로이드가 발생하기도 한다. 선역 발생 후 생긴 콘드로이드는 *S. equi* subsp. *equi*를 가지고 있고, 이것은 이들 말들로부터 제거한 콘드로이드의 배양을 근거로 그리고 콘드로이드 표면과 안의 lining fissures에서 조직학적으로 증명되었다. 일부 말에서는 *S. equi* subsp. *equi* 감염에 의한 후낭축농증은

수개월 또는 수년 동안 무증상으로 지속될 수 있다. 후낭축농증이 있는 말의 약 50%는 간헐적으로 기침을 하고 일부는 간헐적 편측성 비루를 보이기도 한다 (Newton 등, 1997).

3) 환경에서 *S. equi* subsp. *equi*의 생존

현재까지는 농장내 환경에서 *S. equi* subsp. *equi*가 장기간 생존한다는 증거는 없다. 한 실험실적 연구는 *S. equi* subsp. *equi*를 배양하여 도말한 세균 부유액에서 *S. equi* subsp. *equi*가 2°C에서 63일간 나무에서 생존했고 20°C에서는 48일간 유리나 나무에서 생존했다고 보고했다(Jorm, 1992). 이 연구는 다른 정상 환경 세균총과 혼합한 연구는 수행하지 않았다. *S. equi* subsp. *equi*는 환경에 존재하는 세균들이 생산하는 박테리오신(살균인자)에 감수성이 있어서 다른 토양매개 세균총들이 존재하는 상태에서 쉽게 생존하지 못한다. 따라서 야외 조건에 적용되었을 때의 Jorm의 연구에서 나온 결과는 신중하게 해석하여야 한다고 많은 학자들이 주장하고 있다. 실험실에서가 아니라 야외 조건하에 있는 임상 시료(예, 선역 케이스들의 화농성 삼출물)에서 *S. equi* subsp. *equi*가 얼마나 오랫동안 생존하는가를 확인하기 위해서는 더 많은 연구들이 실시되어야 한다(Sweeney 등, 2005).

4. 진단

1) 배양

비강 스왑, 비강 세척액, 또는 농양에서 뽑아낸 농을 배양하는 것이 *S. equi* subsp. *equi*의 검출을 위한 표준 검사법이다. 검체들은 5% 면양 혈액 또는 말 혈액이 첨가된 CNA(colistin, nalidixic acid) agar에 배양해야 한다. 다른 베타용혈성 연쇄상구균들, 특히 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*가 존재하면 배양의 판독이 어려워진다. 병원성 *S. equi* subsp. *equi*의 집락들은 항상 점액성이지만, 북아메리카에서 시판되고 있는 약독생백신의 *S. equi* subsp. *equi*의 집락들은 작고 건조하다. 공생하는 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*의 집락은 일반적으로 비점액성이고, 반면에 병변부의 신선한 분리주들은 종종 점액성을 보인다. *S. equi* subsp. *equi*와는 달리 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*는 sorbitol과 lactose를 분해한다(Sweeney

등, 2005).

비강 세척액은 스왑보다 소수의 *S. equi* subsp. *equi* 검출에 더 효과적인데 그 이유는 비강 안쪽의 더 넓은 표면들로부터 채취할 수 있기 때문이다. 이 기법은 15 cm 길이의 부드러운 고무관(직경 5-6 mm)을 비안각 정도까지 삽입하여 50 mL의 따뜻한 생리식염수를 이 관을 통해 주입한 후 세척액을 수집한다(Galán 등, 1985; Timoney 등 1997). 이 세척액을 원심분리하여 침전물을 배양시킨다. 잠복기와 초기 임상증상을 보이는 시기 동안에는 세척액 배양이 실패할 수 있다. *S. equi* subsp. *equi*는 정상적으로 발열 시작 후 24시간에서 48시간까지는 점막에 나타나지 않고, 따라서 대규모 발병 동안 매일 직장 온도를 측정함으로써 모니터링되고 있는 말들은 초기에 확인하여 *S. equi* subsp. *equi* 전파를 막기 위해 격리시킬 수 있다(Sweeney 등, 2005).

2) 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응은 *S. equi* subsp. *equi*의 항식균 M 단백질의 유전자인 SeM의 DNA를 증폭하여 검출하기 위해 만들어졌다. 이 유전자에 대한 대립유전자가 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*의 몇몇 균주에서도 발견되지만, 이 염기서열의 대부분은 동질성이 낮고 SeM으로부터 고안된 프라이머 염기서열은 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*로부터 나온 옴프리콘의 합성을 일으키지 않는다. 또한 SeM양 단백질이 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*에 의해 발현된다는 증거는 없다. SeM에 기반을 둔 중합효소연쇄반응은 *S. equi* subsp. *equi*의 검출을 위한 배양의 보조 방법이다(Timoney 등, 1985). 중합효소연쇄반응 검사는 몇 시간 이내에 끝날 수 있기 때문에 결과는 샘플이 채취된 그날 나올 수도 있다. 그렇지만 중합효소연쇄반응은 생균과 사균을 구별할 수 없기 때문에 양성검사결과는 배양에 의해 확진될 때까지 추정적인 것으로 간주되어야 한다. 또한 동일한 샘플의 배양에서 *S. equi* subsp. *equi*를 확진했지만 중화효소 억제제들이나 다량의 *S. equi* subsp. *equi*가 들어 있는 임상 시료들은 중합효소연쇄반응 음성반응을 보이기도 한다. (Timoney 등, 1997; Newton 등, 2000).

비강 스왑 또는 세척액의 배양을 동반한 중합효소연쇄반응은 후낭 내시경검사 대상마를 선택하는 대조프로그램에서 사용된다. 중합효소연쇄반응은 생균이 사라진 후 후낭 세척액에서 수주일 동안 *S. equi* subsp. *equi*의 SeM DNA를 검출한

다. 이것은 비인두에는 적용되지 않는데 비인두에서는 효과적인 점막섬모장치가 세균과 DNA를 동시에 제거하기 때문이다. 중합효소연쇄반응은 무증상 보균마 검출, 수송 전 *S. equi* subsp. *equi* 감염 상태 확인, 수송 후 다른 말과 혼합사육하기 전 *S. equi* subsp. *equi* 감염 상태 확인, 후낭으로부터 *S. equi* subsp. *equi* 제거 성공여부 판단에서 유용하게 사용된다(Newton 등, 2000).

3) 혈청검사

15개 이상의 표면노출 또는 표면분비 단백질들은 감염기와 회복기 동안 강력한 혈청 항체반응을 보인다. 이들 중 가장 반응이 좋고 많이 연구된 단백질은 주병원성 인자이고 면역원인 SeM이다(Timoney 등, 1997). SeM 특이 항체를 측정할 수 있는 ELISA 제품이 시판되고 있고 최근 *S. equi* subsp. *equi* 감염을 진단하고, 추가 접종이 필요성을 결정하며, 출혈성자반과 전이성 농양의 진단 보조방법으로 유용하게 사용된다. 그러나 이 제품은 백신반응과 감염반응을 감별하지는 못한다(Sweeney 등, 2005). 일련의 시료들로부터 얻은 역가를 비교하여 노출 상태와 감염 상태를 알 수 있다. 혈청 역가는 노출 후 약 5주에 최고에 달하고 최소한 6개월은 높게 유지된다(Sheoran 등, 1997). 추출 백신 제품들에 대한 반응은 약 2주에 최고에 달하고 6개월 동안 높게 유지된다(Sheoran 등, 1997).

SeM 특이 항체 측정 결과를 관독할 때 개체별 반응에서 상당한 차이가 있음을 염두에 두어야 한다. 출혈성자반을 일으킬 위험이 있는 말들은 고반응성 말들이고 아주 강한 항체반응을 일으킨다. 1 : 3,200을 초과하는 역가를 가지는 이런 말들은 백신을 접종해서는 안 된다(Heath 등, 1991; Galán 등, 1985).

5. 예방 및 치료

1) 발생예방

선역 예방을 위해서 가장 중요한 것은 *S. equi* subsp. *equi*를 배출하는 말을 다른 말들로부터 격리시키는 일이다. 과거 역학조사에 따르면 선역의 유행은 주로 보균마가 청정마군에 도입됨에 따라 일어나고 있다. 선역에 이환된 적이 있는 말과 그 말들과 접촉할 기회가 있었던 말을 청정마군에 도입할 때에는 격리된

장소에서 검역을 행할 필요가 있다. 발열, 점액화농성 콧물, 림프절 종창 등의 임상증상을 나타내는 말도 마찬가지로. 검역기간은 2~3주간이고, 이 사이에는 별도의 마사에 계류시키고, 체온검사 및 임상증상의 관찰과 선역균의 분리검사를 실시한다. 검역기간 중 검역 대상마와 다른 말의 접촉은 물론 피해야하고, 마구나 관리 기물과 마필취급자에 의한 간접적인 전파에도 충분히 주의를 기울여야 한다(Timoney, 1999). *S. equi* subsp. *equi*는 건조에 약하고, 열(56℃ 이상)과 소독 약에도 높은 감수성을 갖고 있지만, 농은 그 중에 포함된 균을 소독제로부터 보호하는 기능이 있기 때문에 소독할 때는 충분히 고려해야 한다. 말의 일상 건강 관리도 본증에 의한 피해를 최소화하는데 중요하다. 특히 질병의 조기발견은 감염마의 회복을 빠르게 할 뿐만 아니라, 선역이 유행하여 확대하는 것을 미연에 방지할 수 있다. 일반적인 마체상태 관찰과 체온검사를 매일 소홀히 하는 일이 없도록 하고, 만약 선역이 의심되는 사례를 발견한다면 제일 먼저 격리하고 다른 말과의 접촉을 막고 비인두 스왑의 세균학적 스크리닝을 반복 실시하면 선역 보균마의 도입을 막을 수 있다(Newton 등, 2000).

2) 약물치료



선역균은 페니실린, 세파로틴, 세파졸린, 에리스로마이신, 린코마이신에 강한 감수성을 나타낸다. 또한 그 외의 대부분의 그람양성균용 항균제에 감수성을 나타내지만 젠타마이신과 가나마이신 등의 아미글리코사이드 항생물질에 대한 내성이 지속적으로 관찰되고 있다(Sweeney 등, 2005). 대부분 선역분리균들은 trimethoprim sulfadiazine (TMS)에 감수성이 있다. 그렇지만 포니에서 피하에 삽입한 조직 챔버의 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 감염을 치료하지 못한 보고가 있고, 이 연구에서는 *S. equi* subsp. *equi*에 대한 TMS의 효과는 확인하지 않았다(Ensink 등, 2003). 이중, 페니실린이 가장 효과적인 항생물질이고, 내성주도 존재하지 않기 때문에 선역의 치료약으로는 이것을 사용해야 한다. 감염초기(발열개시 24시간 이내)에 항균제를 투여하면 좋은 치료효과를 나타낸다(Timoney, 1999). 이 시기의 감염마에서는 아직 농양 형성이 불충분하여 투여한 약제가 감염 부위까지 도달해서 충분한 살균효과를 나타낸다고 할 수 있다. 한편, 병세가 진행된 말에서 항균제 투여는 주의 깊게 행해야만 한다. 왜냐하면, 이미 농양을 형성하고 있는 말에 항균제를 투여할 경우, 질병 진행을 일시적으로 방지할 수는 있

어도, 감염물질에 대한 항체가 충분히 생성되는 것을 막고, 농양의 자유로운 배농을 지연시킬 수 있어서 결과적으로 회복을 늦추게 되기 때문이다. 또한 이 같은 말은 보균마가 되기도 하고 “bastard strangle”이 될 가능성이 높다고 주장하는 사람도 있다(Sweeny 등, 1987). 병세가 진행된 말에게 있어 항생제 치료의 적용예로서는 ① 인후두부 림프절의 종대에 의한 호흡곤란 ② 고열(40℃이상) ③ 중증의 쇠약과 식욕부진 등을 들 수 있다. 이것 외에도 오히려 항체가 생성되는 것을 기다려서 자연치료에 맡기는 편이 좋은 결과를 얻을 수 있다고 한다. 물론, 이러한 치료과정 중에도 환마의 격리는 반드시 필요하다. 출혈성자반병의 치료는 부신피질호르몬 등의 항염증제와 항생물질을 함께 사용한다(Sweeney 등, 2005).

3) 백신접종

대부분 말들은 선역으로부터 회복하는 동안 강한 면역을 형성하고, 이 면역은 75% 이상의 말에서 5년 이상 지속된다(Todd, 1910; Hamlen 등, 1994). 이것은 적절한 예방적 면역원을 제공하면 높은 수준의 면역 자극이 생물학적으로 가능하다는 것을 보여준다. 물론 *S. equi* subsp. *equi*와 밀접한 관계가 있지만, *S. equi* subsp. *zooeidemicus*는 교차방어를 하는 면역을 자극하지 않고(Bazely, 1942) 따라서 방어면역에 대한 최근과 현재 조사들은 *S. equi* subsp. *equi*에서는 발현되지만 *S. equi* subsp. *zooeidemicus*에서는 존재하지 않는 면역원들을 확인하는데 주로 초점을 맞추고 있다. 선역에 대한 획득 면역에 대한 기초는 완전하게 풀리지 않았지만 부분적으로 *S. equi* subsp. *equi*에만 유일하게 존재하는 SeM과 기타 면역원들에 대한 항체들이 있다고 생각된다(Sweeney 등, 2005). 호주에서의 초기 연구들은 방어 면역원들은 56℃ 이상의 온도에 민감하다고 주장했다(Bazely, 1942). 재감염에 대해 저항을 보이는 말들에서 면역은 점막 수준에서 매개되고 *S. equi* subsp. *equi* 침입을 막는 기능을 한다. 그렇지만 비병원성 *S. equi* subsp. *equi*의 비경구적 접종 후에 나타나는 전신적 면역도 또한 방어기능이 있다. 이 결과들은 최적 면역은 전신반응과 점막반응 두 가지 모두를 필요로 한다는 것을 보여준다(Sweeney 등, 2005).

이전의 세균백신들은 hot acid 또는 mutanolycin과 계면활성제로 추출한 백신에 의해 만들어진 *S. equi* subsp. *equi* 보강 추출물로 대체되었다. Hot acid는 산내성 단백질을 쪼개서 제거하고, 뮤라미데이스는 세균 세포벽을 가수분해시키며

계면활성제를 만나면 무손상 표면단백질을 방출한다. 양 유형의 백신은 효과가 있고 면역원성 SeM을 함유하고 있다. 그렇지만 추출백신은 효과가 만족스럽지 못했고 실질적인 예방을 뒷받침하는 보고도 거의 없다(Sweeney 등, 2005). 한 논문은 마지막 보강접종 후 50%의 임상적 발병률의 감소를 주장하였다(Hoffman, 1991). 부작용에는 주사부위의 통증과 농양 그리고 가끔 발생하는 출혈성자반 케이스가 있다.

당 이용성에 결함이 있고 자연감염에 의해 자극된 면역을 모방하도록 고안된 *S. equi* subsp. *equi*의 약독화, 탈협막화 균주는 실험적 감염에 대하여 높은 수준의 면역을 자극하였다(Timoney, 1985). 유도부위는 인두편도와 설편도였고 따라서 백신균들은 이들 부위로 예방적 반응을 일으키기에 충분한 많은 수가 도달했음이 틀림없다. 안전성 문제들에는 낮은 비율의 백신접종마에서 발생하는 발달이 느린 하악 농양 형성이 있는 잔여면역, 비루, 그리고 가끔씩 나타나는 면역매개맥관염의 케이스들이 있다. 이 백신은 살아있는 *S. equi* subsp. *equi*를 함유하고 있기 때문에 먼 접종 부위들의 우발성 감염은 이 부위들에서 농양 형성을 일으킨다. 이 이유 때문에, 이상적으로는 어떤 다른 백신을 동시에 접종하지 않고 또는 비내 백신 접종 전에 투여한다. 다른 비내 백신 동시 투여 효과를 언급한 자료는 찾을 수 없다. 이 백신의 유전적 안정성은 협막 합성에 필요한 2개 유전자(HasA와 B) 부분의 결손으로 향상되었다. 이 결손은 또한 집락 특징들과 중합효소연쇄반응을 사용하여 백신 균주들과 야외 균주들을 동정하는 신뢰성 있는 방법을 제공하고 있다(Sweeney 등, 2005).

I 서론

선역은 *Streptococcus equi* subsp. *equi*의 감염에 의해서 마과동물(馬科動物)에서 발생하는 급성전염병이다(Bazely와 Battle, 1940). 감염된 말에서는 발열, 식욕부진, 콧물 및 두경부 림프절 종창과 같은 임상증상이 나타나며, 특히 하악과 후인두림프절의 뚜렷한 종창이 이 질병의 특징적인 임상증상이다. 이 질병에 대한 최초의 기록은 1251년 Jordanus Ruffus에 의해 이뤄졌다고 전해지며 1880년대가 되면서 다양한 연구의 결과로서 원인균이 분리되었다(Slater, 2003). 본 질병의 높은 이환율에 의한 피해가 증가하면서 세계 각국에서 선역에 대한 예방 및 근절 방법에 관한 연구가 수행되었으나 오늘날까지도 말을 사육하는 국가에서 본 질병이 지속적으로 발생하고 있다. Piche(1984)는 캐나다의 한 Standardbred 목장의 선역 발병에서 폐사율과 이환율이 각각 3.6%, 62%라고 보고했고, Sweeny 등(1989)은 미국의 켄터키 주에 있는 한 Standardbred 목장의 선역 발병으로 폐사율과 이환율이 각각 2.6%, 31.5%였다고 보고했다. Jorm(1990)은 호주 New South Wales의 많은 말 목장이 모여 있는 지역에서 100마리 당 2.1두의 말에서 선역이 발생했다고 발표했다. 이와 같이 선역의 이환율과 폐사율이 지역이나 연구자에 따라 차이가 나타나는 것으로 볼 때 감염균의 특성, 감염량, 첫 감염 후 목장에서서의 대처 방안에 따라 그 피해를 최소화할 수 있다.

우리나라의 경우 다른 축산업에 비하여 마필산업에 대한 연구가 미흡한 실정이기 때문에 정확한 말 질병 자료가 빈약한 것이 현실이다. 2004년 농림통계연보에 따르면 2003년 국내에서는 805 가구가 16,302두의 말을 사육하고 있고 제주지역에서는 465 가구에서 11,366두의 말을 사육하고 있는 것으로 나타났다. 종류별 통계를 보면 드러브렛은 7,372 두 중 제주지역에 3,263두(44.5%)가 사육되고 있고 재래종인 조랑말은 8,623두 중 8,091두(93.8%)가 제주지역에서 사육되고 있다.

국내에서 선역의 발생정도는 명확하지 않으나 제주지역 말 생산목장의 경우 이유기 망아지에서부터 2세마까지 광범위한 발생이 인정되고 있다. KRA 경주마목장에서는 6개월령 망아지를 입식할 때 선역 예방접종을 실시하고 있지만, 생산 농가들에서는 거의 예방접종이 이루어지지 않고 있다. 따라서 특히 이유 후 집단

사육으로 스트레스를 받는 망아지 무리에서는 발병하면 증상의 정도 차이는 있지만 이환율이 비교적 높은 것으로 생각된다. 임상증상도 점차 심한 양상을 보이고 있다. 선역이 발생하면 많은 두수에서 발생하고, 증상이 오래 지속되며 심한 경우 후인두림프절의 종창으로 압박을 받아 호흡이 불규칙하고, 채식을 하지 못하는 경우도 있다. 따라서 목장주나 관리자들이 간호를 위하여 많은 시간과 노력을 소모하게 된다(Jorm, 1992).

가검 시료에서 선역의 원인균인 *S. equi* subsp. *equi*를 분리하기 위하여 가장 많이 사용하는 배지는 5% 면양 또는 말 혈액이 첨가된 혈액배지(Pacifico 등, 1995)와 혈액배지에 항생제를 첨가하여 선택성을 높인 CNA(colistin, nalidixic acid) 배지이다(Timoney, 1993). 누공이 형성되지 않은 림프절의 농으로부터 균을 분리할 경우에는 거의 대부분 *S. equi* subsp. *equi*만 분리되기 때문에 혈액배지 혹은 CNA 배지에서 증식한 균을 분자생물학적 방법이나 생화학적 방법으로 동정하여 확인할 수 있다. 그러나 동일한 병변이 *S. equi* subsp. *zooeconomicus* 혹은 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*에 의해 발생할 수도 있고 이 균들이 말의 호흡기 시료에서 비교적 자주 분리되기 때문에 누공이 형성된 림프절 화농시료에 오염될 수 있으며 선역 의심마의 비루 속에도 다량으로 존재할 수 있다. 이들 균종들이 배지상에서 다소 다른 모양의 집락을 형성한다고는 하지만 3 균종이 모두 증식할 수 있는 혈액배지와 CNA 배지에서 이들을 육안적으로 감별하기란 쉽지 않다. 이 때문에 한 시료에서 3개 이상의 집락을 선택하여 동정하는 데 많은 시간과 노력이 소모된다. *Streptococcus* 속균들의 동정과 감별은 전통적으로 Lancefield group을 이용한 혈청학적인 방법과 lactose, trehalose 그리고 sorbitol의 발효와 같은 표현형 차이를 이용한 생화학적 방법에 의존하고 있다. *S. equi* subsp. *zooeconomicus*는 lactose와 sorbitol을 분해하고 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*는 trehalose를 분해한다. *S. equi* subsp. *equi*는 세 가지 당을 모두 분해하지 못하는 것이 특징이다(Lämmle and Hahn, 1994; Harrington 등, 2002).

본 연구에서는 선역의 원인균인 *S. equi* subsp. *equi*를 분리하기 위하여 호기성 배양, CO₂ 배양, 저산소분압하에서 배양하여 제주지역에서 분리된 균과 표준균주와의 차이를 API 20 STREP 검사와 중합효소연쇄반응으로 확인하였고 *S. equi* subsp. *equi*와 가장 흔히 함께 분리되는 *S. equi* subsp. *zooeconomicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*를 감별할 수 있는 선택감별배지를 개발하였다.

II 재료 및 방법

1. *Streptococcus equi* subsp. *equi*의 분리

선역 임상증상을 보이는 목장 6곳의 말 31두로부터 화농성 비루를 면봉 ((주) 마이크로 미디어, 부산)으로 채취하여 아이스박스에 넣어 3시간 내에 실험실로 운반하였다. 균을 분리하기 위하여 5% 면양 혈액이 들어있는 Tryptose blood agar base(TBA) (Difco, Detroit, USA)에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 candle jar에서 배양하였다. β-용혈을 나타내는 균 집락을 시료당 6개 선발하여 2장의 TBA 배지에 희선 접종하고 그중 한 장의 TBA는 호기성으로 나머지 한 장은 CO₂ 배양기에서 하룻밤 배양시켰다. CO₂ 배양기에서 배양된 균과 양쪽 조건에서 모두 자란 균을 각각 따로 분류하여 순수배양한 다음 20% glycerol (aMRESCO, Ohio, USA)에 부유시켜 -70℃에 보관하였다.

2. 균 동정방법

보관된 균들은 TBA에 계대배양하여 API 20 STREP(Biomerieux)과 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)으로 동정하였다.

1) API 20 STREP

세균집락을 증류수 2 ml에 탁도가 McFarland No. 4이상 되도록 부유시킨 후 API 20 STREP strip에 접종하였다. Voges-Proskauer(VP)에서 arginine dehydrolase(ADH)까지 접종을 한 후 남은 부유액은 2 ml API 부유배지에 넣어 희석하여 ribose(RIB)에서 glycogen(GLYG)까지 접종하였다. ADH에서 GLYG까지는 미네랄 오일을 넣고 덮개를 닫은 후 35 ~ 37℃에서 4시간 배양 후 결과를 관찰하였다. 4시간 배양 후 반응이 명확하게 일어나지 않은 경우 24시간 배양 후 결과를 관찰하였다. 검사결과는 제조사의 설명서에 따라 판독하였다.

2) 중합효소연쇄반응 (PCR)

한 개의 균 집락을 증류수(Milli-Q System, Millipore, Bedford, MA) 100 μ l에 부유시켜 1분간 끓인 후 사용시까지 냉동시켜두었다. PCR은 1 U의 Taq DNA polymerase, 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각 250 μ M), Tris-HCl(pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Stabilizer and tracking dye을 포함하는 AccuPower[®]PCR Premix(Bioneer, Korea)를 이용하였다. Template DNA 1 μ l와 30 pmole/ μ l 농도의 3FF (5'-GCATAAAGAAGTTCCTG TCATTAAAAT-3'), 3FR primer (5'-GATTTCGGTAAGAGCTTGACGCTCA -3') 1 μ l를 넣고, 증류수를 17 μ l를 넣어 총 20 μ l로 PCR을 시켰다. PCR은 첫 denaturation을 95 $^{\circ}$ C로 10분 실시 후, denaturation 95 $^{\circ}$ C 1분, annealing 60 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분으로 30 cycle 반복했으며, final extension 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 수행하였다. PCR 산물은 1.5%(w/v) agarose gel에서 30분 동안 100V에서 전기영동하였고 ethidium bromide로 15분간 염색한 후 30분간 증류수에 탈색시켜 관찰하였다(Newton 등, 2000).

3. 공시균주



선택감별배지의 개발을 위하여 사용한 공시균주는 Table 1에서 보는 바와 같다. *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682는 일본 키타사토 대학의 Takai 박사로부터 분양받았으며, *S. equi* subsp. *equi* B3D7, *S. equi* subsp. *equi* B3F2, *S. dysgalatiae* subsp. *equisimilis* B3A1는 제주대학교 수의학과 수의미생물학교실에서 말의 질병으로부터 분리한 균주였으며, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* B3A9는 본 연구를 위하여 말의 비루에서 분리한 균주였다. 기타 선택배지의 선택성을 보기 위하여 호흡기에서 자주 분리되는 그람양성구균인 *Staphylococcus aureus* SA-1, 그람음성간균인 *Bordetella bronchiseptica* Bb-3, *Klebsiella pneumonia* Kpp-1, *Pseudomonas aeruginosa* Pa-5는 본 실험실에서 보관하고 있던 균주들이며 기타 그람음성균인 *Escherichia coli* IMSNV20367, *Citrobacter freundii* IMSNV10253, *Enterobacter aerogenes* IMSNV10256, *Proteus mirabilis* IMSNV20365는 제주대학교 현박사로부터, *Salmonella typhimurium* ATCC14028

은 경상대학교의 김박사로부터 분양받아 사용하였다. 기타 선택배지의 개발을 위하여 본 실험에서 분리한 *S. equi* subsp. *equi* 15균주와 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 17주를 사용하였다.

Table 1. *Streptococcus* spp. and other bacteria used in this study

Bacterial strain	Strain no.	Characteristic	Source
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	NCTC9682	Gram positive, aerobe	Dr. Takai
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	B3D7	Gram positive, capnophilic	our lab.
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	B3F2	Gram positive, aerobe	our lab.
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	B3A9	Gram positive, aerobe	this study
<i>Streptococcus dysgalatiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	B3A1	Gram positive, aerobe	our lab.
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-1	Gram positive, aerobe	our lab.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bb-3	Gram negative	our lab.
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Kpp-1	Gram negative	our lab.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa-5	Gram negative	our lab.
<i>Escherichia coli</i>	IMS NV20367	Gram negative	Dr. Hyeon
<i>Citrobacter freundii</i>	IMS NV10253	Gram negative	Dr. Hyeon
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IMS NV10256	Gram negative	Dr. Hyeon
<i>Proteus mirabilis</i>	IMS NV20365	Gram negative	Dr. Hyeon
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028	Gram negative	Dr. Kim

4. 선택배지 개발

1) 최소발육억제 농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)

면양혈액 5%를 첨가한 Todd-Hewitt Agar (Difco, Detroit, MI)에 colistin sulfate (Sigma, MO, USA), gentamicin sulfate (Sigma, MO, USA), nalidixic acid (Sigma, MO, USA), neomycin sulfate (AMRESCO, Ohio, USA), sodium azide (AMRESCO, Ohio, USA), 을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 2배수로 희석하여 Todd-Hewitt broth에 *Streptococcus* spp.을 multiple inoculator로 접종한 후 48 시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양 후 증식 여부를 판독하여 MIC를 측정하였다.

2) 배지조성

선택배지는 증류수 1L에 peptone (BD, MD, USA) 10g, beef extract (BD, MD, USA) 3g, yeast extract (BD, MD, USA) 3g, NaCl (AMRESCO, Ohio, USA) 5g, bromo cresol purple (AMRESCO, Ohio, USA) 0.04 g, lactose (Difco, MI, USA) 5 g, trehalose (SIGMA, MO, USA) 5 g, sodium azide (AMRESCO, Ohio, USA) 0.2g, agar (BD, MD, USA) 15g 첨가 후 1N NaOH로 pH를 7.2로 조정하였다.

3) Lactose/Trehalose 첨가배지에서의 pH 변화

Lactose (SIGMA, MO, USA) 0.5%, trehalose (SIGMA, MO, USA) 0.5%, lactose와 trehalose를 각각 0.5% 첨가한 Todd-Hewitt broth (Difco, MI, USA) 5 ml에 *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682와 B3D7, *S. equi* subsp. *zoepidemicus* B3A9, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1을 접종해 24 시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 각 배양액의 수소이온농도를 pH meter (MERK, Darmstadt, Germany)로 측정하였다.

S. equi subsp. *equi* NCTC9682와 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi* B3D7, *S. equi* subsp. *zoepidemicus* B3A9 그리고 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1을 1% 면양혈액을 넣어 만든 선택배지에 배양을 하여 pH 변화에 따른 집락 주위부의 색깔 변화를 관찰하였다.

4) 혈액 농도에 따른 균의 발육정도

선택배지에 각각 1%, 3%, 5% 면양혈액을 첨가 한 다음 *S. equi* subsp. *equi* B3D7을 각각 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1과 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* B3A9와 혼합 접종하여 CO₂ 배양기에서 24시간과 48시간동안 배양시켜 각 균들의 배양 특성을 비교 관찰하였다. 집락이 작거나 거의 관찰되지 않으면서 작은 용혈환을 나타내는 5개와 집락형성이 뚜렷하면서 용혈환이 큰 5개를 Fig. 1에서와 같이 선발하여 TBA배지에 접종한 다음 당분해 정도를 평가함으로써 *S. equi* subsp. *equi*와 다른 두 균종의 차이를 관찰하였다.

5) 공시균주 선택배지 배양

선택배지에서 그람음성균 혹은 말 호흡기도에서 자주 분리되는 그람양성균들이 증식하는 지를 확인하기 위하여 선택배지에 공시균주를 접종하여 CO₂ 배양기에서 배양하여 증식 여부를 관찰하였다.



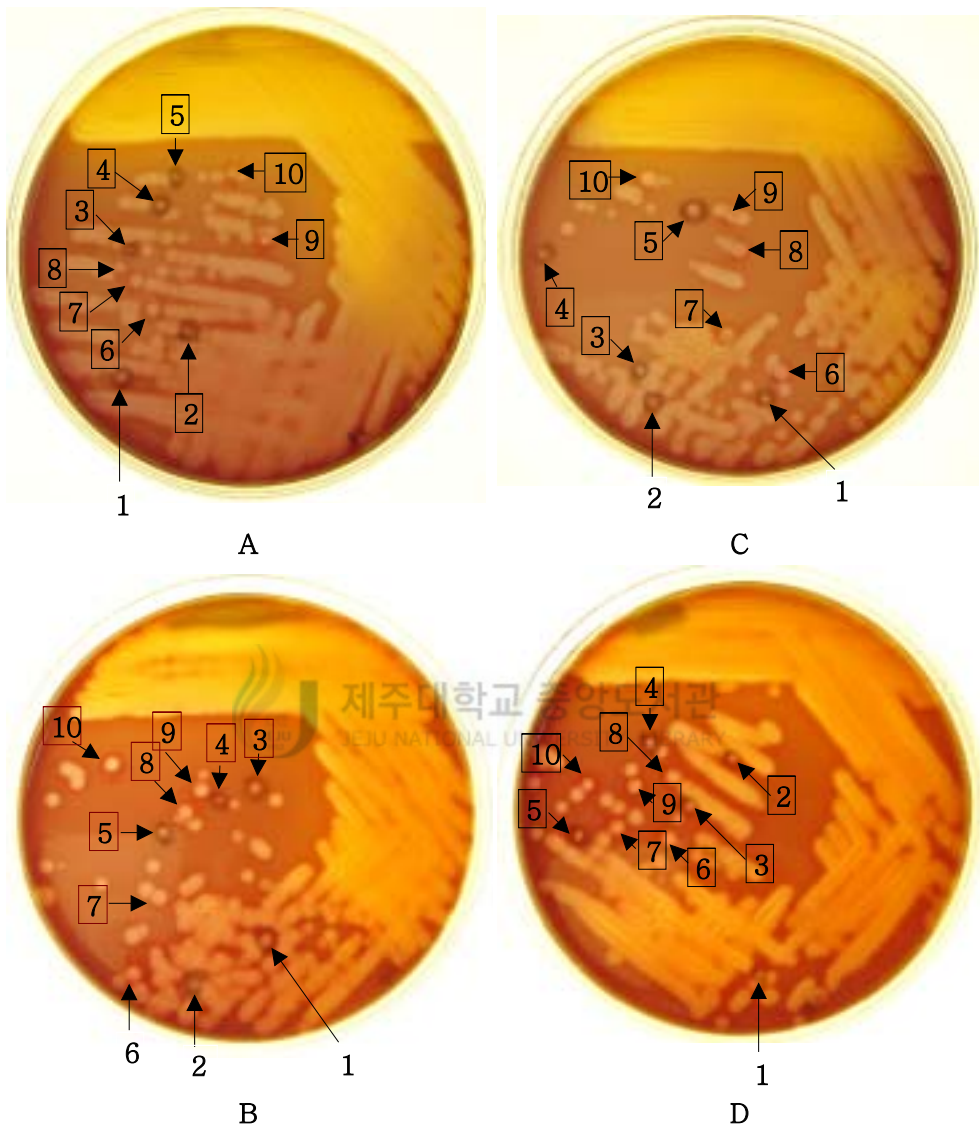


Fig 1. Bacterial colonies grown on selective medium. Fig A(3% sheep blood agar) and B(5% sheep blood agar) showed co-cultures of *S. equi* subsp. *equi* B3D7 and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1, and Fig C(3% sheep blood agar) and D(5% sheep blood agar) showed co-cultures of *S. equi* subsp. *equi* B3D7 and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* B3A9. Each no. 1 to no. 5, and no. 6 to no. 10 colonies were selected by colonial characteristics, indicating small or no colonies with narrow hemolysis zone and large colonies with wide hemolysis zone, respectively.

III 결과

1. 분리균의 특성

Table 2는 6곳의 목장 31두에서 채취한 비루를 호기성 배양기와 CO₂ 배양기에서 배양하여 분리된 원인균들의 분리율을 나타낸 것이다. 호기성 *S. equi* subsp. *equi*가 3두(9.7%)에서 분리 동정되었고, 14두(45.2%)에서는 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi*가 분리 동정되었다. 호기성 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*는 17두(54.8%)에서 분리 동정되었다.

Table 2. Isolation rates of *Streptococcus equi* subspecies from purulent nasal discharge.

No. of horse tested	No. of horse with		
	aerobic <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	Capnophilic <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
31	3(9.7%)	14(45.2%)	17(54.8%)

3-6 colonies from each candle jar culture were examined for growth property in aerobic and CO₂ incubator and identified by API 20 STREP and PCR for *S. equi* subsp. *equi*

Table 3. Results of API 20 STREP tests for *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

API 20 Strep	VP	HIP	ESC	PY RA	AG AL	BG UR	BG AL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GL YG	HEM
SEE(17) ^{a)}	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	β
SEZ(17) ^{b)}	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	β
SDE(2) ^{c)}	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	β

a) *S. equi* subsp. *equi*, b) *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, c) *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, () : Number of bacterial strains tested

Table 3은 분리균들의 생화학적 특성을 나타낸 것으로 제주에서 분리된 *S. equi* subsp. *equi*는 API 20 STREP에서 lactose와 trehalose를 분해하지 못하는 전형적인 선역균의 특성을 보였다. *S. equi* subsp. *zooeidemicus*는 sorbitol과 lactose를 분해하였고, 본 연구실에서 보관 중이던 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*도 lactose와 trehalose를 분해하여 표준균주로 활용 가능성이 있었다.

S. equi subsp. *equi*에만 존재하는 SeM 유전자를 PCR로 증폭한 결과는 Fig. 2와 같다. 육안적으로 림프절 농양을 확인할 수 없었던 말로부터 분리된 호이산화 탄소성 *S. equi* subsp. *equi* 균주들은 표준균주 *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682와 동일한 692 bp PCR 산물을 보였고 *S. equi* subsp. *zooeidemicus*는 음성을 나타내었다.

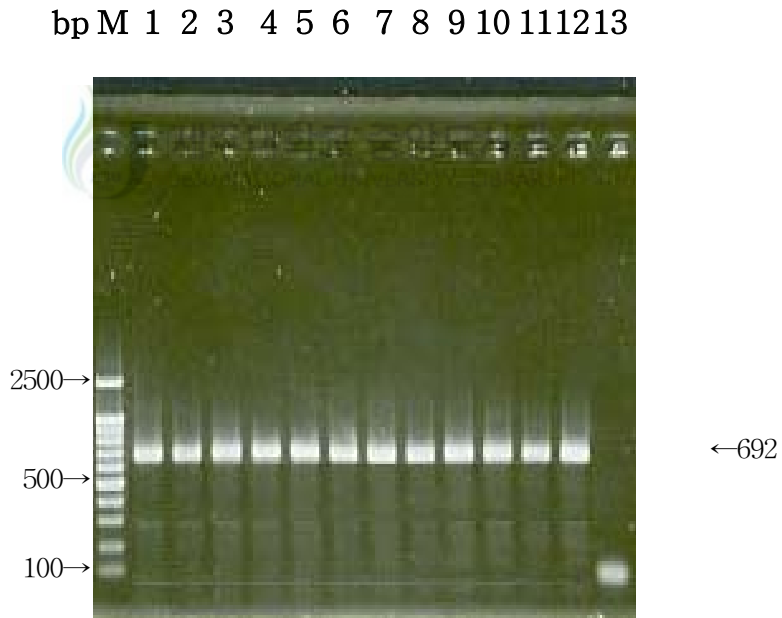


Fig. 2. *Streptococcus equi* subsp. *equi* possessed a 692bp PCR products which show SeM gene. Lane M, 100 bp DNA ladder (Invitrogen); 1, *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682; 2~4, aerobic *S. equi* subsp. *equi*; 6~12 anaerobic *S. equi* subsp. *equi*; 13, *S. equi* subsp. *zooeidemicus*.

2. 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi*의 배양특성

본 연구에서 분리된 *S. equi* subsp. *equi*들이 호기성에서 증식하지 않는 특성이 있었기 때문에 이를 비교분석한 결과 호기성의 경우 다량이 접종된 첫 접종부에서 미약한 용혈대(Fig. 3 A)를 보이거나 소수의 집락이 관찰되었지만 candle jar, CO₂ 배양기, Gaspak (BBL, MD, USA)을 이용한 혐기성 조건에서 배양한 경우에는 활발하게 증식하여 선명한 용혈대를 보이는 다수의 집락이 관찰되었다(Fig. 3 B).

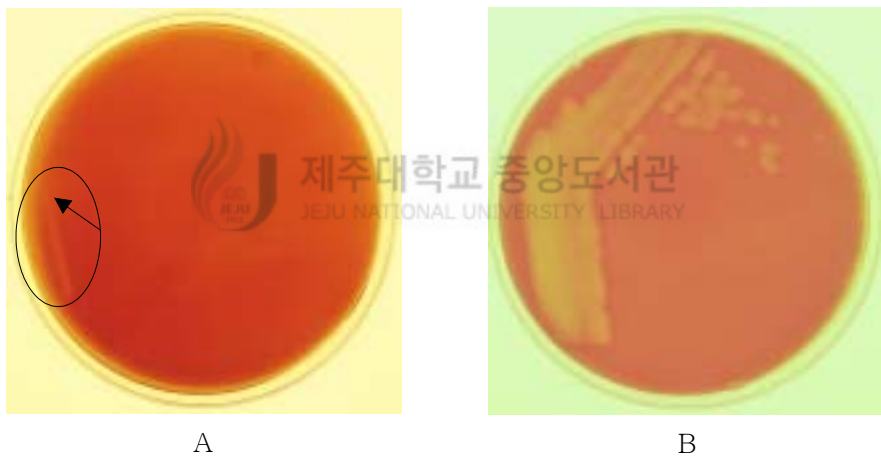


Fig. 3. Capnophilic characteristics of *Streptococcus equi* subsp. *equi* B3D7 onto blood agar incubated in aerobic and CO₂ incubator at 37°C. A few colonies were grown in aerobic incubator for 72 hrs (Arrow and circle of Fig. A), and much more colonies, in CO₂ incubator for 15hrs (Fig. B).

3. 선택배지

1) 선택성분에서의 최소발육억제 농도(MIC)

Streptococcus 속균들의 colistin(CT), gentamicin(GM), nalidixic acid(NA), neomycin(NM), crystal violet(CV), 그리고 sodium azide(SA)에 대한 최소발육억제 농도를 측정한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 속균에 관계없이 모든 균주들은 NA, NM, SA가 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가되어도 증식하였고 CT와 CV의 MIC는 전 균주가 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상이였다. GM의 MIC는 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 2균주에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상이였고, 나머지 두 속은 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상을 나타내었다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration of *Streptococcus* spp. to antimicrobial agents.

Bacterial strain	No. of bacteria tested	CT	GM	NA	NM	CV	SA
SEE	15	50	25	100	100	25	100
SEZ	17	50	25	100	100	25	100
SDE	2	50	50	100	100	25	100

SEE, *S. equi* subsp. *equi*; SEZ, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*; SDE, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; CT, colistin; GM, gentamicin; NA, nalidixic acid; NM, neomycin; CV, crystal violet; SA, sodium azide

2) Lactose/Trehalose 첨가배지에서의 pH 변화

당분해 여부에 따른 pH 변화를 측정한 결과 lactose와 trehalose를 분해하는 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* B3A9, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1 이 배양된 배지의 pH는 5.0에서 5.5사이였다. 반면에 두 당을 모두 분해하지 못하는 *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682와 B3D7이 배양된 배지의 pH는 6.5에서 7.0 이였다 (Table 5). 이와 같은 pH 변화를 기초로 하여 선택배지에 첨가할 pH 지시제인 bromo crezol purple을 선택하였다.

Table 5. pH changes by lactose/trehalose fermenting and non-fermenting bacteria.

	SEZ B3A9	SDE B3A1	SEE B3D7	SEE NCTC9682
Trehalose	6.5~7.0	5.5	6.5~7.0	6.5
Lactose	5.0~5.5	6.5	6.5	6.5~7.0
Tre+Lac	5.0~5.5	5.5	6.5~7.0	6.5

SEE, *S. equi* subsp. *equi*; SEZ, *S. equi* subsp. *zoepidemicus*; SDE, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

1% 면양혈액을 첨가한 선택배지에 *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682(Fig 5 A)와 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi* B3D7(Fig 5 C)은 lactose와 trehalose를 분해하지 못하여 배지의 색깔이 보라색으로 나타나 당을 분해하는 *S. equi* subsp. *zoepidemicus* B3A9(Fig 5 B)와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1(Fig 5 D)과 감별을 할 수 있었다.

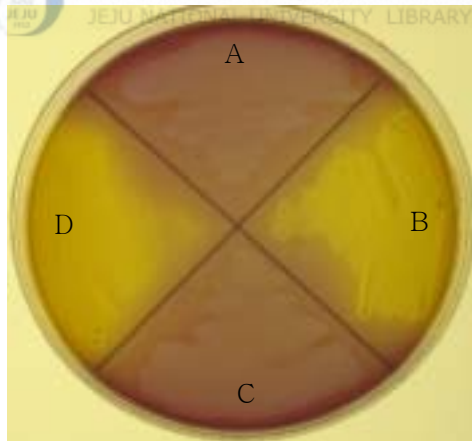


Fig. 5. Bacterial colonies grown onto selective medium containing 1% seep blood. Capital letters A, and C showed both lactose and trehalose non-fermenter, *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682 and capnophilic *S. equi* subsp. *equi* B3D7, respectively, while capital letters B and D showed both lactose and/or trehalose fermenter, *S. equi* subsp. *zoepidemicus* B3A9 and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1, respectively.

3) 혈액농도에 따른 균의 발육 정도

면양 혈액을 각각 1%, 3%, 5% 첨가한 선택배지에 *S. equi* subsp. *equi* B3D7과 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1, *S. equi* subsp. *zooeconomicus* B3A9를 혼합 접종하여 하룻밤 배양한 후 용혈환이 작고 집락이 잘 나타나지 않는 5개와 용혈환이 크고 집락이 잘 보이는 5개의 집락을 선발하여 어떤 집락이 *S. equi* subsp. *equi* 인지를 조사한 결과는 Table 6에 나타낸 바와 같다. 1% 면양 혈액이 첨가된 선택배지에서는 발육이 미약하여 집락의 구분이 어려웠다. 3%와 5% 면양 혈액이 첨가된 선택배지에서 *S. equi* subsp. *equi* B3D7과 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1을 함께 배양한 결과 3%에서는 집락이 없고 작은 용혈환만 나타낸 집락 5개 모두 *S. equi* subsp. *equi* B3D7이었고, 5%에서는 5개 집락 중 3개의 집락이 *S. equi* subsp. *equi* B3D7로 확인되었다. *S. equi* subsp. *equi* B3D7과 *S. equi* subsp. *zooeconomicus* B3A9를 혼합 배양한 경우에도 3% 배지에서는 집락이 거의 없고 작은 용혈환을 나타낸 5개 집락 모두 *S. equi* subsp. *equi* B3D7로 동정된 반면에 5% 선택배지에서는 5개 집락 중 2개가 *S. equi* subsp. *equi* B3D7이었다.



Table 6. Number of *S. equi* subsp. *equi* B3D7 in 5 colonies which show 2 different types onto the selective media containing 3 % and 5% sheep blood.

Colony type	Conc. of Adding blood	No. of SEE in co-culture with SDE	No. of SEE in co-culture with SEZ
Small/narrow hemolysis zone	3%	5/5	5/5
	5%	3/5	2/5
Large/wide hemolysis zone	3%	3/5	0/5
	5%	5/5	1/5

SEE, *S. equi* subsp. *equi* B3D7; SEZ, *S. equi* subsp. *zooeconomicus* B3A9; SDE, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B3A1

4. 공시균주의 선택배지 배양 결과

선택배지에 공시균주를 배양한 결과 말의 상부호흡기 감염에 흔히 분리되는 *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*는 혈액배지에 비하여 집락의 크기는 작은 편이었지만 뚜렷한 증식을 나타내었고 *Staphylococcus aureus*는 아주 미약한 증식을 보였으나 나머지 그람 음성균들은 전혀 증식하지 않아 선택성이 우수한 것으로 관찰되었다(Table 7).

Table 7. Growth characteristics of bacterial strains tested onto selective medium

Bacterial strain	Strain No.	Characteristic
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	NCTC9682	Growth, hemolysis
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	B3D7	Growth, hemolysis
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	B3F2	Growth, hemolysis
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	B3A9	Growth (yellow)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	B3A1	Growth (yellow)
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-1	Very weak growth
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bb-3	No growth
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Kpp-1	No growth
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa-5	No growth
<i>Escherichia coli</i>	IMSNV20367	No growth
<i>Citrobacter freundii</i>	IMSNV10253	No growth
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IMSNV10256	No growth
<i>Proteus mirabilis</i>	IMSNV20365	No growth
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028	No growth

IV 고찰

우리나라의 선역 발생에 대한 정확한 역학적 자료는 찾을 수 없었으나 외국에서 보고된 사례들이나 제주지역 말목장의 병력을 통해 볼 때 선역은 국내에서도 말 산업에서 문제가 되고 있는 질병 중의 하나이다. 본 연구에서 2002년부터 2005년까지 제주지역 6개 목장의 31두의 말에서 채취한 시료를 검사한 결과 선역을 일으키는 *S. equi* subsp. *equi*가 17두에서 분리 동정되었다.

선역은 발병되면 이환율이 매우 높다. 이환된 말은 증상이 호전되어 회복되더라도 짧게는 1달, 길게는 수개월 동안 균을 배출하기도 한다. 특히 회복된 후에도 말에서만 존재하는 후낭내에서 균이 장기간 생존할 수 있기 때문에 선역이 발병한 목장에서는 감수성이 있는 어린 말들에서 지속적으로 발병하게 된다(Newton 등, 2000). 이러한 지속적인 발병을 막기 위해서는 임상증상을 보이는 말을 신속하게 진단하고 격리하여 치료를 해야 한다. 신속한 진단을 위해서는 배양을 하여 균을 동정하거나 PCR 혹은 혈청학적 진단법들을 이용한다(Sweeney 등, 2005).

*Streptococcus*는 통성혐기성균으로 알려져 있고 일반적으로 추천되는 배양방법은 호기성에서 배양하는 것이다(George 등, 2001). 그러나 본 연구실에서 2001년에 처음으로 선역의심 환축의 경부림프절 화농액을 호기 조건으로 배양하였지만 균들이 전혀 증식하지 않는 시료가 있었다. 그 당시에는 지속적인 항생제의 사용으로 인해 어떤 원인균이 증식할 수 없을 정도로 감소하였거나 원인균이 일반 혈액배지에서 증식하지 않는 것으로 판정하였다. 그 후 제주지역에서 선역 의심 환축의 수가 증가하여 원인균 검사 의뢰가 많아지고 동일한 예가 반복적으로 관찰되어 *S. equi* subsp. *equi*의 분리방법에 대한 보고들을 조사한 결과 *S. equi* subsp. *equi*를 분리할 때 활용되는 대기 증식조건들은 연구자마다 차이가 있었다. Anzai 등(1997)은 호기성 배양을, Prescott 등(1982)과 George 등(1983)은 산소분압을 낮춘 candle jar에서 배양을 하였다. Sweeney 등(1989)과 Newton 등(2000)은 CO₂ 배양기를 이용하였다. 그동안 보관 중이던 시료와 새로 의뢰된 시료를 대상으로 대기조건을 달리하여 원인균을 분리한 결과 31두의 말 시료 중 3두에서만 호기성 배양조건에서 자라는 *S. equi* subsp. *equi*가 분리되었고 14두에서 CO₂ 배양기와 candle jar에서만 증식하는 *S. equi* subsp. *equi*가 분리 동정되

었다. 호기조건에서 증식하지 않는 *S. equi* subsp. *equi*는 GasPak을 이용한 혐기성에서도 증식이 가능하여 호기조건 외에는 모두 활발한 증식을 하였다. 지금까지 일부 *Streptococcus* spp. 중 산소에 민감하거나 호이산화탄소성인 균주들이 보고(Devriese, 1997; Quentin, 1990) 되었으나 *S. equi* subsp. *equi*에 관한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

S. equi subsp. *equi*에서는 lactose, trehalose, sorbitol 세 가지 검사에서 모두 음성반응이 특징적인데(Lämmler and Hahn, 1994; Harrington 등, 2002), 제주에서 분리된 균도 API STREP 20 검사에서 lactose와 trehalose를 분해하지 못하는 전형적인 생화학적 특성을 보였고, Grant 등(1993)이 보고한 lactose와 trehalose 중 하나 또는 둘 모두를 발효시키는 비특이적인 *S. equi* subsp. *equi*는 분리되지 않았다.

S. equi subsp. *equi*의 SeM의 유전자를 증폭할 수 있는 PCR에서 표준균주와 동일한 증폭산물이 관찰되었다. *S. equi* subsp. *equi*의 항탐식성 M 단백질의 유전자인 SeM에 대한 대립유전자가 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*의 몇몇 균주에서도 발견되지만, 이 염기서열의 대부분은 동질성이 낮고 SeM 유전자서열로부터 고안된 프라이머 염기서열에 의해 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*로부터 PCR 산물이 증폭되거나 SeM 단백질과 유사한 SeM양 단백질이 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*에 의해 발현된다는 증거도 없다(Timoney 등, 1985). 따라서 본 연구에서 분리한 호기성 및 호이산화탄소성 균주들이 모두 *S. equi* subsp. *equi*로 동정되었다.

SeM에 기반을 둔 PCR은 *S. equi* subsp. *equi*의 검출을 위한 배양의 보조방법이다(Timoney 등, 1985). PCR 검사는 몇 시간 이내에 끝낼 수 있기 때문에 시료가 채취된 그날 결과를 얻을 수도 있지만 생균과 사균을 구별할 수 없는 단점이 있다. 또한 동일한 시료의 배양에서 *S. equi* subsp. *equi*를 분리 동정하였지만 중합효소 억제제들이나 다량의 *S. equi* subsp. *equi*가 들어 있는 임상 시료들은 음성을 보일 수 있다(Timoney 등, 1997; Newton 등, 2000). 따라서 PCR 양성검사 결과는 배양에 의해 확진될 때까지 추정적인 것으로 간주되어야 한다.

16S rRNA 유전자의 종특이 분절(species-specific segments)을 사용하는 PCR 매개동정법(PCR-mediated identification)은 이미 다양한 연쇄상구균들의 동정을 위해 수많은 저자들에 의해 사용되어왔다(Bentley 등, 1991; Bentley and Leigh

1995; Kawamura 등, 1995; Abdulmawjood 등, 1998; Abdulmawjood and Lämmler, 1999). 그렇지만, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 중 일부 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열이 *S. equi* subsp. *equi*의 것과 동일하거나 동질성이 아주 높기 때문에 이 두 아종의 동정과 감별을 위한 PCR에는 적합하지 않은 유전자이다. 16S와 23S rDNA 사이의 유전자도 PCR에 활용되지만 적어도 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 균주간에도 매우 동질성이 낮아 종특이 합성 프라이머의 고안이 불가능하다(Chanter 등, 1997). M양 단백질의 유전자를 기반으로 하는 PCR 기법이 *S. equi* subsp. *equi*의 동정을 위하여 연구된 바가 있지만(Timoney와 Artiushin, 1997; Newton 등, 2000), *S. equi* subsp. *equi*는 두개의 M양 단백질을 암호화하는 유전자들을 가지고 있고 이 M양 단백질 중 하나는 *S. equi* subsp. *equi*에만 나타나고 다른 M양 단백질은 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*의 M양 단백질과 동종이다(Timoney 등, 1997). 또 M양 단백질의 가치를 친 형태들이 나타날 수 있다(Chanter 등, 2000).

15개 이상의 표면노출 또는 표면분비 단백질들은 감염과 회복 동안 강력한 혈청 항체 반응을 보인다. 이들 중 가장 반응이 좋고 많이 연구된 단백질은 주병원성 인자이면서 면역원인 SeM이다(Timoney 등, 1997). 그러나 혈청학적 진단방법은 bastard strangles을 제외하고는 감염을 확인하는데 유용하지는 않다. 선역 증상이 사라지고 간헐적 발열과 호중구증가증과 함께 높은 *S. equi* subsp. *equi*의 항체가 나타나면 진단에 도움이 된다. SeM 특이 IgG는 일반적으로 회복기 혈청에서는 수치가 높고 백신이 접종된 말의 혈청에서는 아주 낮거나 존재하지 않는다(Timoney, 1999).

이와 같은 이유로 *S. equi* subsp. *equi* 검출을 위한 표준 검사법은 비강 스왑, 비강 세척액, 또는 농양의 농을 배양하여 동정하는 것이다. 검체들은 5% 양 혈액 또는 말 혈액이 첨가된 CNA(colistin, nalidixic acid) 배지에 배양한다(Timoney, 2004). CNA 배지에서 병원성 *S. equi* subsp. *equi*의 집락들은 항상 점액성이고 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*의 집락은 일반적으로 비점액성이지만, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*의 경우 병변부의 신선한 분리주들이 종종 점액성을 나타낸다(Timoney, 2004). 이와 같은 집락의 차이에도 불구하고 혈액배지나 CNA 배지에서 다른 균들이 함께 증식한 경우 *S. equi* subsp. *equi*를 감별하여 분리하기란 쉽지 않다(Timoney, 1993). 본 실험에

서 채취한 비루시료를 배양한 결과 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*가 같이 존재하고 있었으며 혈액배지 상에서는 전혀 *S. equi* subsp. *equi*와 구분할 수 없었다. 따라서 한 시료로부터 3개에서 6개의 집락을 선별하여 생화학적 특성과 PCR을 통해 동정할 수밖에 없었고, 시료가 의뢰될 때마다 많은 시간과 노력이 필요하였다.

일반적으로 비슷한 속군들을 감별하기 위한 배지는 세균의 당분해 능력을 이용하여 개발하고 있다. 본 연구에서 분리한 *S. equi* subsp. *equi*는 알려져 있는 바와 마찬가지로 lactose와 trehalose를 분해하지 못하였기 때문에 균 분리를 위한 선택감별배지를 창안하게 되었다. 2가지의 당을 첨가한 액체배지에 *S. equi* subsp. *equi*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*를 배양하여 pH 범위를 측정함으로써 선택배지에 첨가할 pH 지시제인 bromo cresol purple을 선정하였다.

Lancefield group B Streptococci, *S. pneumonia*, *Enterococcus* sp. 등을 분리하기 위해 많이 사용되고 있는 선택배지인 selective broth medium(SBM), Lim broth(LB), colistin nalidixic acid agar(CNA) 그리고 neomycin nalidixic acid agar(NNA)(Rauen 등, 2005)에 포함된 항균성 물질인 colistin, gentamicin, nalidixic acid, neomycin, sodium azide, crystal violet에 대한 공시균주들의 발육 정도를 평가하였다. 보고된 *Streptococcus* 선택배지에는 일반적으로 10 µg/ml 농도의 항균물질이 첨가되기 때문에 정확한 항균물질의 농도를 결정하기 위하여 MIC를 평가하였고, 모든 균주들이 전 항균물질에서 25 µg/ml 이상의 MIC를 나타내어 다양한 농도의 항균물질을 조합하여 선택배지를 만들어 재평가하였다. 항균물질이 단독으로 첨가된 경우에는 측정된 MIC 농도에서 균의 증식이 용이하였으나 2가지 이상의 항균물질을 혼합한 경우에는 균의 증식이 없었다. 최종적으로 5% 면양 혈액이 첨가된 THA에 gentamicin 10 µg/ml과 neomycin sulfate 10 µg/ml이 첨가된 선택배지를 만들었으나 당분해능을 이용하기 위하여 lactose와 trehalose만 첨가하고 glucose를 첨가하지 않은 경우에는 *S. equi* subsp. *equi*의 증식이 거의 일어나지 않았다. 이와 같은 결과는 *S. equi* subsp. *equi*가 이용할 수 있는 탄소원이 없었기 때문으로 추정된다.

따라서 최종적으로 그람음성균을 억제하는 sodium azide와 pH 지시제인 bromo cresol purple을 첨가하였고 *S. equi* subsp. *equi*는 혈액이 첨가되었을 때

가장 잘 증식하며 용혈성을 관찰하는 것 또한 본 균을 확인하는 데 반드시 필요한 요소이기 때문에 혈액의 농도에 따른 용혈성 정도, bromo cresol purple의 색깔 변화를 관찰하게 되었다. 1% 면양 혈액을 넣어 만든 선택배지에 배양한 결과 *S. equi* subsp. *equi* NCTC9682와 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi* B3D7은 lactose와 trehalose를 분해하지 못하여 배지의 색깔이 보라색으로 나타나 당을 분해하는 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*와 구분되었다. 그러나 이들 균들이 혼합 배양되었을 경우와 당을 분해하는 균이라도 단독 집락을 형성하는 경우에는 약 3일 정도 배양되어야 당분해 여부를 관찰할 수 있어 조기 분리에 어려움이 있었다. 3%와 5%의 면양 혈액을 첨가한 배지에서는 pH의 변화를 쉽게 색깔로 관찰하기 어려웠으나 당을 분해하여 탄소원을 이용할 수 있는 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*는 탄소원의 이용이 어려운 *S. equi* subsp. *equi*에 비하여 증식이 잘되고 보다 큰 집락이 형성됨을 관찰할 수 있었다.

이와 같은 차이를 토대로 *S. equi* subsp. *equi*와 다른 2 균종 중 한 균종을 혈액 농도를 달리한 선택배지에 혼합 접종하여 집락 형성이 거의 없이 작은 용혈환을 보이는 것과 집락의 형성이 뚜렷하고 큰 용혈환을 보이는 것으로 나누어 어떤 집락들이 *S. equi* subsp. *equi*인지를 확인하였다. 1% 면양 혈액이 첨가된 선택배지에서는 구분이 용이한 경우도 있었으나 접종한 균의 양이 많을 경우 균주를 선별하는데 어려움이 있었다. 3%와 5% 면양 혈액이 첨가된 선택배지에서는 집락의 차이가 선명하여 균주의 선별이 용이하였고, 3% 혈액 첨가 배지에서는 어떤 균종과 혼합배양되더라도 집락형성이 거의 없고 용혈환이 작은 것이 모두 *S. equi* subsp. *equi*로 동정되어 가장 우수한 감별력을 나타내었다. 5% 면양 혈액 첨가 배지에서도 작은 용혈환을 보이는 집락 중 50% 정도는 *S. equi* subsp. *equi*로 동정되었지만 높은 혈액 농도에 의해 균의 발육이 왕성하였기 때문에 *S. equi* subsp. *equi*와 *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 혹은 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*를 정확하게 구분하는데 어려움이 있었다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 선택배지에는 영양원으로는 peptone, beef extract 및 yeast extract를, 삼투압 조절을 위해 NaCl을, 당분해능 평가를 위해 lactose와 trehalose을, pH 변화를 보기 위해 bromo cresol purple을, 균의 선택성을 높이기 위해 sodium azide를 첨가하였으나 당분해 능력을 pH 변화로 관찰하

기에는 어려움이 있었고, 탄소원의 활용 여부에 의한 세균의 발육 정도에 의해 *S. equi* subsp. *equi*를 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*로부터 구별할 수 있는 감별배지라고 할 수 있다. 또한 실제 임상증상을 보이는 말의 시료를 직접 본 선택배지에 접종해서 효과를 검증하지는 못하였으나 말의 호흡기질환에서 흔히 분리될 수 있는 포도상구균과 8종의 그람음성균을 본 선택배지에 접종하여 증식 여부를 관찰한 결과 포도상구균만 미약한 증식을 보였고 나머지 그람음성균들은 증식이 되지 않아 실제 임상시료에 적용을 하여도 신속하게 원인균을 분리할 수 있을 것으로 생각한다. 또한 당분해능을 육안적으로 평가할 수 있는 방법을 찾는다면 보다 효율적인 *S. equi* subsp. *equi* 선택감별배지의 개발에 도움이 될 것이다.



V 결론

제주에서 선역 증상을 보인 말로부터 분리한 *S. equi* subsp. *equi*의 미생물학적, 생화학적, 분자생물학적 특성을 규명하고 말의 상부호흡기 감염에서 흔히 분리되는 *Streptococcus* spp.와 효율적으로 신속하게 선택 배양할 수 있는 선택배지를 개발하고자 한 본 연구의 결론은 다음과 같다.

1. 제주지역 말 목장 6곳의 31두 중에서 호기성 *S. equi* subsp. *equi*가 3두에서 지금까지 보고되지 않았던 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi*가 14두에서 분리 동정되었다.
2. 호이산화탄소성 *S. equi* subsp. *equi*는 비교적 높은 농도의 이산화탄소가 있거나 산소분압이 낮은 환경에서 증식할 수 있는 특징을 제외하고는 생화학적 특성과 연쇄중합효소반응에서 나타난 산물은 표준균주와 동일하였다.
3. 말 호흡기에서 자주 분리되는 그람음성균과 그람양성균은 증식하지 않고 *S. equi* subsp. *zooepidemicus*와 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*로부터 *S. equi* subsp. *equi*를 감별할 수 있는 선택배지를 개발하였다.
4. 선택배지에 첨가된 성분은 영양원인 peptone, beef extract 및 yeast extract, 삼투압 조절을 위해 NaCl이, 당분해능 평가를 위해 lactose와 trehalose가, pH 변화를 보기 위해 bromo crezol purple이, 균의 선택성을 높이기 위해 sodium azide가 첨가되었고, 3% 면양 혈액 첨가배지가 가장 좋은 선택감별력을 나타내었다.
5. 선택배지의 선택성은 sodium azide에 의한 그람음성균 억제력과 *S. equi* subsp. *equi*가 이용할 수 있는 당이 없기 때문에 발생하는 발육지연에 기인한 것으로 보인다.

참고문헌

Abdulmawjood, A., and C. Lämmler. 1999. Amplication of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B. *Res. Vet. Sci.* 67:159-162.

Abdulmawjood, A., and C. Lämmler. 2000. Determination of intraspecies variations of the V2 region of the 16S rRNA gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*. *Res. Vet. Sci.* 68:33-39.

Abdulmawjood, A., R. Weiss, and C. Lämmler. 1998. Species identification of *Streptococcus porcinus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *Res. Vet. Sci.* 65:85-86.

Anzai T., Nakanishi A., Wada R., Higuchi T., Hagiwara S., Takazawa M., Oobayashi K., Inoue. 1997. Isolation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* from thoroughbred horses in a racehorse-breeding area of Japan. *J Vet Med Sic.* 59:1031-1033.

Anzai, T., A.S. Sheoran, Y. Kumamoto, T. Kondo, R. Wada, T. Inoue, and J.F. Timoney. 1999. *Streptococcus equi* but not *Streptococcus zooeconomicus* produces potent mitogenic responses from equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67:235-246.

Artiushin S.C., Timoney J.F., Sheoran A.S., Muthupalani S.K. 2002. Characterization, immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H, SePE-I of *Streptococcus equi*, *Microb. Pathog.* 32:71-85

Bazely PL. 1942. Studies with equine streptococci: 4. Cross-immunity to *S. equi*. *Aust Vet J.* 18:189-194.

Bazely PL. 1942. Studies with equine streptococci: 3. Vaccination against strangles. *Aust Vet J.* 18:141-155.

Bentley, R. W., J. A. Leigh. 1995. Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. parauberis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:1-7.

Bentley, R. W., J. A. Leigh, and M. D. Collins. 1991. Intergeneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:487-494.

Byrant, S., Brown, K. K., Lewis, S., Stewart. R. C. and Parizek, R. 1985. Protection against strangles with an enzymatic *Streptococcus equi* extract. *Vet. Med.* 80:(2) 58-70.



Chanter, N., N. Collin, N. Holmes, M. Binns, and J. Mumford. 1997. Characterization of the Lancefield group C streptococcus 16S 23S RNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing. *Epidemiol. Infect.* 118:125-135.

Chanter N, Newton JR, Wood JLN, et al. 1998. Detection of strangles carriers. *Vet Rec.* 142:496

Chanter, N, N. C. Talbot, J. R. Newton, D. Hewson, and K. Verheye. 2000. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. *Microbiology.* 146:1361-1369.

Dalglish, R., Love, S., Pirie, H.M., Pirie, M., Taylor, D.J. and N.G. 1993. An outbreak of strangles in young ponies. *Vet. Rec.* 132: 528-531.

Devriese LA, Pot B, Vandamme P, Kersters K, Collins MD, Alva Haesebrouck F, Hommez J. 1997. *Streptococcus hyovaginalis* sp. nov. and *Streptococcus thoralensis* sp. nov., from the genital tract of sows. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1073-1077.

Divers TJ, Timoney JF, Lewis RM, et al. 1992. Equine glomerulonephritis and renal failure associated with complexes of group-C streptococcal antigen and IgG antibody. *Vet Immunol Immunopathol.* 32:93-102.

Ensink JM, Smit JA, Van Duijkeren E. 2003. Clinical efficacy of trimethoprim/sulfadiazide and procaine penicillin G in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. *J Vet Pharmacol Therap.* 26:247-252.

Evers WD. 1968. Effect of furaltodone on strangles in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 152:1394-1398

Ford J, Lokai MD. 1980. Complications of *Streptococcus equi* infection. *Equine Pract.* 4:41-44.

Galán JE, Timoney JF. 1985. Mucosal nasopharyngeal immune response of the horse to protein antigens of *Streptococcus equi*. *Infect Immun.* 47:623-628.

Galán JE, Timoney JF. 1985. Immune complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of *Streptococcus equi*. *J Immunol.* 135:3134-3137.

Galán JE, Timoney JF. 1987. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in

Escherichia coli. Infect Immun. 55:3181-3187.

Grant, S. T., Efstratiou, and N, Chanter. 1993. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.* 133: 215-216.

George J.L., Rief J.S., Shideler R.K., Small C.J., Ellis R.P., Snyder S.P., McChesney A.E. Identification of carriers of *Streptococcus equi* in a naturally infected herd. *J Am Vet Med Assoc.* 1983;183:80-81.

Hamlen H.J., Timoney J.F., Bell R.J. 1994. Epidemiologic and immunologic characteristics of *Streptococcus equi* infection in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 204:768-775.

Harrington, D.J., I.C. Sutcliffe, and N. Chanter. 1993. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.* 133:215-216

Heath SE, Geor RJ, Tabel H, et al. 1991. Unusual patterns of serum antibodies to *Streptococcus equi* in two horses with purpura hemorrhagica. *J Vet Intern Med.* 5:263-267.

Hoffman AM, Staempfli HR, Prescott JF. 1991. Field evaluation of a commercial M protein vaccine against *Streptococcus equi* infection in foals. *Am J Vet Res.* 52:589-595.

Jorm LR. 1990. Strangles in horse studs: incidence, risk factors and effect of vaccination. *Aust Vet J.* 67:436-9.

Jorm LR, 1992. Laboratory studies on the survival of *Streptococcus equi*

subspecies *equi* on surfaces. In: Plowright W, Rosedale PD, Wade JF, eds. *Proceedings of Equine Infectious Diseases VI*. Newmarket, UK: R & W Publications Ltd; 39-43.

Judy CE, Chaffin MK, Cohen ND. 1999. Empyema of the guttural pouch (auditory tube diverticulum) in horses: 91 cases (1977-1997). *J Am Vet Med Assoc*. 215:1666-1670.

Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:406-408.

Lämmler, C., and G. Hahn, 1994: Streptokokken. In: Blobel, H., and Schliesser, T. (eds). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Band II/2: Streptokokken-Infektionen und Rotlauf. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena/Stuttgart.

Lindmark H, Jacobson K, Frykberg L, et al. 1996. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*. *Infect Immun*. 64:3993-3999.

Lucia Pacifico, Alessandro Ranucci, Giampietro Ravagnan, and Claudio Chiesa. 1995. Relative Value of Selective Group A Streptococcal Agar Incubated under Different Atmospheres. *J Clin Micro*. 2480-2482.

Meehan M, Kelly SM, Price NC, Owen P. 2002. The C-terminal portion of the fibrinogen-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *equi* contains extensive alpha-helical coiled-coil structure and contributes to thermal stability. *FEMS Microbiol Lett*. 206(1):81-86.

- Mukhtar MM, Timoney JF, Goehring LS, et al. 1998. Chemotactic response of equine polymorphonuclear leucocytes to *Streptococcus equi*. *Res Vet Sci* 45:225-229
- Newton JR, Wood JLN, Dunn KA, et al. 1997. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Vet Rec.* 140:84-90
- Newton JR, Verheyen K, Talbot NC, et al. 2000. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J.* 32:515-526.
- Oikawa M., Kamada M., Yoshikawa Y., Yoshikawa T. 1994. Pathology of equine pneumonia associated with transport and isolation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J. Comp. Pathol.* 111:205-212
- Pacifico L, Ranucci A, Ravagnan G, Chiesa C. 1995. Relative value of selective group A streptococcal agar incubated under different atmospheres. *J Clin Microbiol.* 33:2480-2482.
- Piche CA. 1984. Clinical observations on an outbreak of strangles. *Can Vet J.* 25:7-11.
- Prescott J.F., Srivastava S.K., deGannes R, Barnum D.A. 1982. A mild form of strangles caused by an atypical *Streptococcus equi*. *J Am Vet Med Assoc.* 180:293-299.
- Pusteria N, Watson JL, Affolter VK, et al. 2003. Purpura hemorrhagica in 53 horses. *Vet Rec.* 153:118-121.

Quentin R, Pierre F, Dubois M, Soutoul JH, Goudeau A. 1990. Frequent isolation of capnophilic bacteria in aspirate from Bartholin's gland abscesses and cysts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:138-141.

Rauen NC, Wesenberg EM, Cartwright CP. 2005. Comparison of selective and nonselective enrichment broth media for the detection of vaginal and anorectal colonization with group B streptococcus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 51(1):9-12.

Reif, J. S., George, J. L., and Sheideler, R. K. 1981. Recent development in Strangles research: Observation on the carrier state and evaluation of a new vaccine. *AAEP Proceedings.* 27:33-39.

Sheoran AS, Sponseller BT, Holmes MA, et al. 1997. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Vet Immunol Immunopathol.* 59:239-251.

Slater JD. 2003. Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. *Equine Vet J.* 35(2):118-120

Spoormakers TJ, Ensink JM, Goehring LS, et al. 2003. Brain abscesses as a metastatic manifestation of strangles: Symptomatology and the use of magnetic resonance imaging as a diagnostic aid. *Equine Vet J.* 35:146-151

Sweeney CR, Whitlock RH, Meirs DA, et al. 1987. Complications associated with *Streptococcus equi* infection on a horse farm. *J Am Vet Med Assoc.* 191:1446-1448

Sweeney, C. R., Bensen, C. E., Robert, W. H., Meirs, D. A., Barningham, S. O., Whitehead, S. C., and Cohen, D. 1989. Description of an epizootic and

persistence of *Streptococcus equi* infections in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 194:1281-1286.

Sweeney, C. R., Timoney, J. F., Newton, R., Hines M. T. 2005. *Streptococcus equi* Infection in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles. *J Vet Intern Med.* 19:123-134.

Timoney JF, Galan JE. 1985. The immune response of the horse to an avirulent strain of *Streptococcus equi*. In:Kimura Y, Kotami S, Shokawa Y, eds. Recent Advances in Streptococci, Streptococcal Diseases. Bracknell, UK: Reedbooks. 294-295.

Timoney JF, Trachman J. 1985. Immunologically reactive proteins of *Streptococcus equi*. *Infect Immun.* 48:29-34

Timoney JF. 1993. Strangles. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2:365-374.

Timoney JF, Artuishin SC. 1997. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. *Vet Rec.* 141:446-447

Timoney JF, Artuishin SC, Boschwitz JS. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. *Infect Immun* 1997;65:3600-3605.

Timoney J. F. 1999. Equine Strangles. *AAEP Proceedings.* 45:31-37.

Timoney J. F. 2004. The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* 35:397-409.

Todd TG. 1910. Strangles. *J Comp Path Therap.* 23:212-229.

Valberg SJ, Bullock P, Hogetvedt W. 1996. Myopathies associated with *Streptococcus equi* infections in horses. *Proc Am Assoc Equine Pract.* 42:292-293.

Verheyen K, Newton JR, Talbot NC. 2000. Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J.* 32:527-532.

농림부. 2004. 농림통계연보. pp. 124, 130.



Abstract

Characteristics of *Streptococcus equi* subspecies *equi* isolated from horses in Jeju and development of selective medium

Advised by Professor Won-Geun Son

Ja-Ho Moon



Department of Veterinary Medicine
Graduate School
Cheju National University

Strangles, a purulent pharyngitis and lymphadenitis of the upper respiratory tract, is highly contagious for naive horses; unique to equids, ubiquitous and caused exclusively by *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Many clinical and epidemiological aspects have been comprehensively reviewed. We performed this study to investigate the optimal atmospheric culture conditions, phenotypic and biochemical characteristics of *S. equi* subsp. *equi* isolated from horses showing common signs of pyrexia, mucopurulent nasal discharge and coughing with and/or without lymph node abscesses of the head.

Nasopharyngeal swabs were taken from 31 horses showing signs and symptoms indicative of *S. equi* subsp. *equi* infection. To detect significant differences between *S. equi* subsp. *equi* reference strain and strains isolated in Jeju, O₂ or CO₂ cultures on 5% sheep blood agar were compared with each other for the detection of beta-hemolysis based on the colony morphology and beta-hemolysis on the surfaces of the media. Beta-hemolytic colonies were identified by PCR and API 20 STREP.

Aerobic *S. equi* subsp. *equi* was identified from 3 horses, capnophilic *S. equi* subsp. *equi* cultured from 14 horses. Capnophilic *S. equi* subsp. *equi* displayed typical strong beta-hemolysis only incubated in candle jar and CO₂ incubator. PCR product sizes were identical between *S. equi* subsp. *equi* reference strain and strains isolated in Jeju. *S. equi* subsp. *equi* strains isolated in Jeju did not ferment lactose, trehalose, and sorbitol.

To detect infection from 'strangles' outbreak, *S. equi* subsp. *equi* should be isolated from blood culture. Contaminations by *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* make it difficult to isolate the etiologic agent. Selective medium for the rapid diagnosis from clinical samples of 'strangles' were developed through evaluation of the glycolytic ability and appropriate sheep blood concentration of these microorganisms. Lactose, trehalose, and sodium azide added to selective medium. *S. equi* subsp. *equi* can't ferment lactose and trehalose. Sodium azide inhibit the growth of Gram negative bacterium. The combination *S. equi* subsp. *equi*-*S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *S. equi* subsp. *equi*-*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* were each inoculated on selective medium and incubated anaerobically. *S. equi* subsp. *equi* easily and rapidly distinguished from the other strains on the basis of colonial morphology.

Key words: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, strangles, capnophilic, selective medium

감사의 글

석사과정 동안 항상 올바르게 지도해주시고 학문적 가르침을 주신 손원근 지도교수님께 진심으로 감사드리며, 정성으로 심사하여 주시고 지도하여 주신 이두식 교수님, 배종희 교수님께 심심한 감사를 드립니다.

이 실험을 수행하는 동안 많은 도움과 격려를 해주신 수의학과 교수님과 KRA 가족 여러분께 감사드립니다. 특히 실험을 하는 동안 많은 도움을 준 수의미생물 학교실 석사과정에 있는 송현호군을 비롯한 실험실 후배님들의 아낌없는 도움에도 감사의 말씀을 전합니다.

힘든 여건 속에서도 깊은 이해와 헌신적인 사랑으로 내조를 해준 아내 장혜진과 딸 소진이, 항상 묵묵히 믿어주시고 성원해주신 부모님, 형제자매와 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2005년 12월

문 자 호