

碩士學位論文

중합효소 연쇄반응 기법에 의한 Equine Herpesvirus
type-1 과 Equine Herpesvirus type-4의 감별



獸醫學科

文 赫

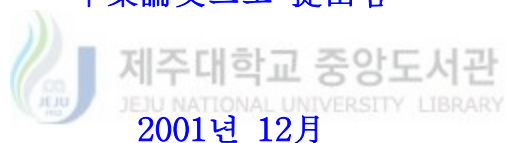
2001年 12月

중합효소 연쇄반응 기법에 의한 Equine Herpesvirus
type-1 과 Equine Herpesvirus type-4의 감별

指導教授 李 斗 植

文 赫

이 論文을 獸醫學 碩士學位
卒業論文으로 提出함



文赫의 獸醫學 碩士學位
論文을 認准함

委	員	長	印
委		員	印
委		員	印

濟州大學校 大學院

2002年 2月

초 록

중합효소 연쇄반응 기법에 의한 Equine Herpesvirus type-1 과 Equine Herpesvirus type-4의 감별

(지도교수: 이두식)

문 혁



제주대학교 대학원
수의학과

제주지역내 자연발생한 말 허피스바이러스 감염증(Equine Herpesvirus Infection, EHV)의 유형별 Equine Herpesvirus type-1(EHV-1)과 Equine Herpesvirus type-4(EHV-4)의 신속한 항원검출 및 감별진단하기 위해 2000년 10월에서 2001년 2월사이 제주대학교에 병성감정 의뢰된 유산테아 7두에서 채취한 폐, 간, 흉수와 EHV-1의 표준주(AustIV)와 EHV-4의 표준주(T252)를 EHV-1과 EHV-4의 공통지역의 glycoprotein (B) gene에서 16개의 다른 위치에 있는 8개의 primer를 조합하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 실시하였다. primer 조합에 의해 특이성이 나타난 2쌍의 primer로 폐샘플을 갖고 PCR를 한 결과 한층 더 민감성을 나타낸 특이 primer를 선택할 수 있었다. 특이성과 민감성이

확인된 primer로, 유산태아 7두에서 채취한 폐, 간, 흉수를 갖고 PCR을 한 결과 EHV-1의 특이적인 primer는 7두의 유산태아의 폐, 흉수, 간에서 각각 6두, 5두, 4두의 PCR 추출물에서 1735bp로 증폭되었고, EHV-4의 특이적인 primer는 7두의 유산태아의 폐에서 2두의 DNA추출물에서만 580bp로 증폭되었고, 반면에 다른 장기들에서는 검출되지 않았다. 또한 표준주의 민감성 확인에서는 1ng까지 검출 할 수 있었다. 결과적으로 PCR은 EHV-1과 EHV-4의 감별진단에 적용되었고, 앞서 제주도에서의 말 유산이 바이러스 병원체와 관련이 되어 주요한 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다.

주요어: 말 허피스 바이러스 감염증, equine herpesvirus type 1 and 4,
중합효소연쇄반응, 유산

목 차

I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
III. 결 과.....	9
IV. 고 찰.....	23
V. 결 론.....	25
VI. 참 고 문 헌.....	27
VII. 영 문 초 록.....	32



I. 서론

Equine herpesvirus (EHV)는 herpesviridae의 alphaherpesvirinae에 속하며 성마에 감염시 특별한 임상증상 없이 내과하는 불현성 감염이 많으나, 임신말기에는 태아에게 감염되어 유산을 일으키거나 출생 후 24시간 이내에 폐사하는 경우가 많다. 어린 말에 감염되었을 경우에는 발열, 비루의 분비와 식욕감퇴 및 악하 임과질의 종대가 일어나며, 세균 특히 연쇄상구균의 2차 감염시 기침을 동반한 인후두염, 폐렴등을 일으킨다. 이 질병은 Dimock와 Edwards(1933)가 미국 켄터키주에서 말의 바이러스성 유산증으로 보고되었고, 말의 유산증 바이러스와 호흡기 감염증의 원 인체가 서로 다른 것으로 인식되기도 하였으나, 그 후 두 증세에서 분리된 바이러스의 성상이 동일하여 equine herpesvirus 1(EHV-1)에 의해 호흡기 증상 및 유산이 일어날 수 있음이 증명되었다. 따라서 본 병은 현재 Doll 등(1957)의 제의에 따라 말 비폐렴(Equine rhinopneumonitis; ERP)으로 불려지고 있다(Duxbury 등, 1968; O'Callaghan 등, 1983; Timoney 등, 1988; Telford 등, 1992).

EHV는 double stranded DNA virus로 핵내 봉입체를 형성한다. Herpesviridae는 사람을 포함하여 거의 모든 동물이 감염숙주가 되며, Shimizu 등(1959)이 처음으로 EHV의 항원적 차이를 보고하면서 EHV-1을 다시 두 개의 subtype으로 분류하였다. 따라서 현재 EHV-1의 subtype 1은 EHV-1으로, subtype 2는 EHV-4로 불리며 그 외에 EHV-3는 다른 항원 특성을 가지는 strain으로 분류되고 있다(Vail, 1993). EHV-1(일명 F strain)은 말에 감염시 호흡기 질환 및 유·사산, 자마의 폐사 및 신경증상을 일으키며, EHV-4(일명 R strain)는 대개 호흡기 질환에 관여하고 있고, EHV-3는 비뇨생식기 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Jackson 등, 1971; Henry 등, 1981).

말 비폐렴에 대한 실험실 진단은 혈청중화시험, 면역확산법, 보체결합반응, 효소면역측정법, 형광항체법과 단클론 항체를 이용한 ELISA방법 등의 혈청학적 방법과 비강분비물, buffy coat 및 유산 태아의 조직으로부터 바이러스 분리, 전자현미경적 관찰 및 병리조직학적 검사방법이 있다(Hartley 등, 1979; Matsumura 등, 1992, Matsumura 등, 1993). EHV는 대개 감염된 말의 인두, 폐, 갑상선, 태

반, 신장, 부고환, 하악하, 서혜림프절, 비즙, 유산 태아의 조직에서 분리가 용이하며 가끔 위내용물에서도 분리된다(Telford 등, 1992). 특히 Merkt와 Jochle(1993)은 1,788 두의 유산태아를 조사하여 이 중에서 EHV-1에 기인된 유산의 중요성을 보고한바 있고, Turtinen과 Allen(1982)은 바이러스의 감염에 대한 숙주 면역반응을 결정하는데 중요한 EHV-1의 envelope에서 6개의 glycoprotein이 있으며 이들 중 260kD과 87kD의 당단백질은 EHV-1과 EHV-4와의 공통항원이라고 하였다. EHV-1과 EHV-4는 주로 equine fetal kidney cells 혹은 RK 13 rabbit kidney cells에서 분리하며 두 바이러스는 유사한 세포변성 효과를 일으킨다. 이들 바이러스의 유사한 항원성 때문에 polyclonal antibody를 이용한 혈청학적인 진단법으로는 감별이 곤란하다. 따라서 두 바이러스를 감별하기 위한 단클론 항체가 보고된 바 있으며 O'Keefe 등(1991)과 Welch 등(1992)은 restriction endonuclease digestion에 의해 EHV-1과 EHV-4의 gB gene을 구분하였다. 그러나, 이런 기법들은 바이러스를 분리해야 하거나 DNA 증폭 후에 바이러스 type을 구별하기 위해서는 enzyme digestion 혹은 southern hybridization이 요구되는 등의 단점이 있다. 따라서 최근에는 바이러스의 분리배양을 하지 않고 가검물에서 직접 항원을 검출하여 두 type의 바이러스를 감별하는 연구가 다각도로 진행되고 있다. Ballagi 등(1990)은 EHV-1의 gp 13 gene에 기인한 primer를 이용하여 유산태아에서 EHV-1을 검출하였고, Sharma 등(1992)은 EHV-1과 EHV-4에 각각 특이적인 gp13과 gpH의 DNA probe를 제작하여 hybridization 방법을 보고한 바 있다. Welch 등(1992)은 잠복 감염된 어린 말의 림프조직과 말초혈액의 백혈구에서, PCR에 의해서는 잠복 바이러스를 검출할 수 없었다고 하였다. 그러나 Kirisawa 등(1993)은 EHV-1과 EHV-4의 glycoprotein B gene(gB gene)의 DNA가 서로 83%의 상동성이 있지만 nested primer를 이용한 PCR에서 잠복바이러스를 검출할 수 있었고, nested PCR이 first PCR보다 1,000배정도 민감성이 있다고 보고하였다. 또한 Borcher 등(1993)도 nested PCR기법이 EHV-1과 EHV-4에서 first PCR보다 각각 100배와 1,000배정도 더 민감성이 있다고 보고하였다.

국내에서도 병리조직학적(Bak; 1981), 혈청학적(이 등;1985, 조 등; 1995) 및 면역조직학적 진단법(신 등; 1996)에 의하여 EHV에 대한 항체가 및 감염 예가 보

고된 바 있다. 그러나 이러한 보고들은 EHV-1과 EHV-4의 감별을 고려하지 않았기 때문에 국내에서 발생하는 말 유산의 주원인 바이러스 규명이 필요할 것이다. 따라서 본 실험은 유산된 새끼 마의 체액과 실질장기로부터 DNA를 직접 분리하여 EHV-1과 EHV-4의 감별진단할 수 있는 PCR 기법을 확립하고 말 사육 농가에 만연되어 있는 중빈마의 유산 원인을 규명하여 이에 대한 적절한 방역대책을 수립코자 수행되었다.



II. 재료 및 방법

1. PCR에 의한 EHV-1과 EHV-4의 검출 및 감별진단

1) 검사재료

2000년 10월에서 2001년 2월사이 제주지역의 말 사육농가에서의 EHV에 의한 유산으로 의심되어 제주대학교 수의학과 미생물실험실에 병성감정 의뢰된 유산태아 7두에서 채취한 실질장기와 체내 삼출물을 사용하였다. 무균적으로 채취한 간과 폐를 마쇄하여 항생제가 첨가된 alpha-Minimum Essential Medium(α -MEM, Gibco, USA)으로 10% 조직현탁액을 만들고 2,500rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 milipore membrane filter(0.2 μ m)를 사용하여 여과하였다.

2) 바이러스

공시 바이러스는 독일 베를린 자유대학교 수의과대학 Dr. Ludwig으로부터 분양받은 Aust IV주와 T252주를 EHV-1과 EHV-4의 양성 대조군으로 사용하였고, BHV-4(bovine herpesvirus-4)를 음성대조군으로 사용하였다.

3) DNA 추출

유산된 새끼 말의 흉수를 비롯한 삼출물과 폐, 간의 실질장기의 검사재료와 표준 균주인 Aust IV주, T252주 및 BHV-4를 QIAamp DNA mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출한 다음 끓는 물에 5분간 끓인 후에 -20 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하였다.

4) Primer 제작

EHV-1과 EHV-4의 감염을 확인하기 위한 PCR primer는 Borchers와 Slater(1993)가 보고한 primer의 조합을 변형하여 사용하였고, 각 primer는 EHV을 검출하기 위한 PCR기법에서 가장 많이 활용되는 glycoprotein B gene중에서 EHV-1과 EHV-4에 특이적인 nucleotide sequence를 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Nucleotide sequence of primer

Primer(P)	Sequence	Position	Annealing Temperature
EHV-1(P1)	5-TCTACCCCTACGACTCCTTC-3	1869	58℃
EHV-1(P2)	5-GCTTTCTTTTCCTGCTTTTC-3	3749	58℃
EHV-1(P3)	5-CTTTAGCGGTGATGTGGAAT-3	2329	58℃
EHV-1(P4)	5-CCTTTGTTGTTATGGGGTAT-3	3604	58℃
EHV-4(P1)	5-TCTATTGAGTTTGCTATGCY-3	1974	58℃
EHV-4(P2)	5-TCCTGGTTGTTATTGGGTAT-3	2906	58℃
EHV-4(P3)	5-TGTTTCCGCCACTCTTGACG-3	2126	58℃
EHV-4(P4)	5-ACTGCCTCTCCACCTTACC-3	2706	58℃

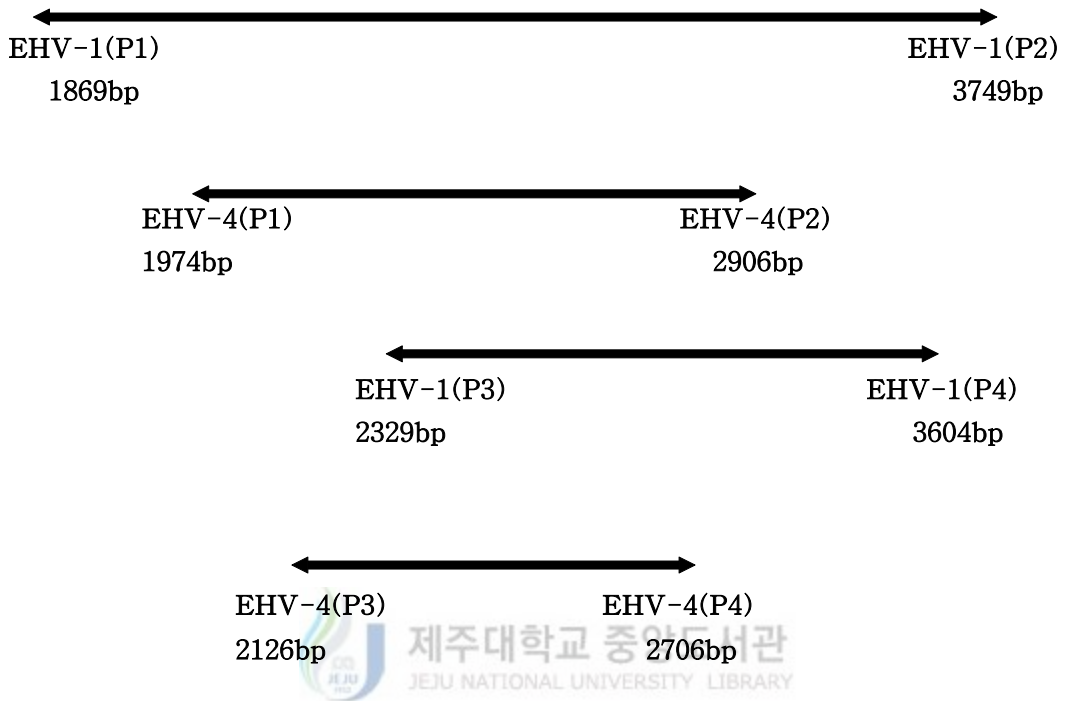


Fig. 1. Construction of primer set for the amplification of EHV-1 and EHV-4 gB gene.

5) Polymerase chain reaction

EHV-1과 EHV-4의 DNA를 증폭하기 위한 PCR은 Borchers와 Slater(1993) 방법을 변형하여 사용하였다. 요약하면, PCR용 premix (40 mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5mM MgCl₂, 250 μ m dNTP, 2.5U Taq DNA polymerase, Bioneer)에 43 μ l PCR grade sterile water, 0.4 μ M의 forward primer와 reverse primer를 각각 1 μ l씩, 5 μ l DNA를 첨가하여 총 용량이 50 μ l가 되도록 하여 PCR을 실시하였다. PCR의 반응 조건은 pre-denaturation을 94 $^{\circ}$ C에 4분간 실시한 다음, denaturation 94 $^{\circ}$ C에 2분, annealing 58 $^{\circ}$ C 2분, extension 72 $^{\circ}$ C에 2분씩 33 cycle을 반복한 후, post-extension을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하였다. 모든 PCR은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer 9600, USA)에서 반응시켰다.



6) PCR products의 확인

PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 10 μ l의 PCR 산물을 TAE (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH8.0) buffer를 running buffer로 하는 0.7% agarose gel에 loading 한 후 100V에서 30분간 mini-gel electrophoresis unit(MUPID -2)에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide(EtBr, 0.5 μ g/ml) 용액으로 염색한 후 UV transilluminator로 EHV-1과 EHV-4에 특이적인 gB gene에 대한 증폭산물의 크기를 관찰하였다.

2. PCR의 검출한계 측정

PCR의 검출 한계를 조사하기 위하여 EHV-1과 EHV-4의 표준주인 AustIV주와 T252주에서 DNA를 추출한 다음 이를 Spectrophotometer(Pharmacia Biotech, Gene Quant)로 정량하였다. 정량된 측정값을 이용하여 멸균된 3차중류수인 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 2.5 μ l용액에 DNA가 10ng에서 0.1pg까지 되게 10배 계단희석하였다. 이를 PCR기법을 이용하여 증폭시킨 후 검출한계를 조사하였다.



Ⅲ. 결 과

이 실험에 사용된 각 가검물의 유산시기와 백신접종 및 임상유무는 Table 2에서 보는 바와 같다. 유산은 임신 9~10개월째에 나타났으며 유산된 종마는 의심스러운 임상증상은 보이지 않았으며 임신 전 EHV-1과 EHV-4 혼합 백신 (Pneumabort-K + 1b, Fort Dodge)을 1회씩 접종한 바 있었다.

Table 2. Main clinical history of pregnant mare with abortion

Case No	Abortion time(month)	Vaccination	Clinical signs
1	10	1*	ND**
2	9	1	ND
3	10	1	ND
4	9	1	ND
5	10	1	ND
6	9	1	ND
7	10	1	ND

* Number of injection with EHV-1 and EHV-4 Combined vaccine during pregnancy.

** Not detected.

1. Primer 조합에 대한 PCR결과

EHV-1 또는 EHV-4에 특이적인 primer를 선택하기 위하여 EHV-1 혹은 EHV-4에 특이적인 8개의 primer의 조합으로 얻어진 PCR 산물의 결과는 **Fig. 2, Fig. 3**과 같다. 1번에서 4번 lane의 EHV-1 P(1)과 P(2), EHV-1 P(1)과 P(4), EHV-1 P(1)과 EHV-4 P(2), EHV-1 P(1)과 EHV-4 P(4) 그리고, 5번에서 8번 lane의 EHV-4 P(1)과 EHV-1 P(2), EHV-4 P(1)과 EHV-1 P(4), EHV-4 P(1)과 EHV-4 P(4), EHV-4 P(1) 그리고, 9번에서 12번 lane의 EHV-1 P(3)과 P(2), EHV-1 P(3)과 P(4), EHV-1 P(3)와 EHV-4 P(2), EHV-1 P(3)와 EHV-4 P(4) 그리고, 13번에서 16번 lane의 EHV-4 P(3)과 EHV-1 P(2), EHV-4 P(3)와 EHV-4 P(2), EHV-4 P(3)와 EHV-1 P(4), EHV-4 P(3)와 EHV-4 P(4)의 primer에 의하여 증폭된 PCR산물로서 EHV-1의 표준주인 AustIV에서는 1번과 2번 lane인 EHV-1의 P(1)과 P(2), EHV-1의 P(1)과 P(4)가 예상 크기와 실제크기인 1880bp와 1735bp로 일치하였으며, 비특이 반응없이 EHV-1에서만 특이성을 보였다(**Fig. 2**).

EHV-4의 표준주인 T252에서는 8번과 16번 lane인 EHV-4 P(1)과 P(2), EHV-4 P(3)와 P(4)가 예상 크기와 실제 크기인 932bp와 580bp로 일치하였으며, 비특이 반응없이 EHV-4에서만 특이성을 보였다(**Fig. 3**).

2. 가검물에서의 PCR 민감도 시험

Primer 조합에 의해 특이성이 나타난 2쌍의 Primer로, 유산태아의 폐에서 추출한 DNA를 Template로 하여 EHV-1 P(1)과 P(2)는 2번과 6번 시료에서 음성을 확인할 수 있었으나, EHV-1 P(1)과 P(4)는 6번 시료에서만 음성을 나타내어 더욱 민감성이 있음을 확인할 수 있었다(**Fig. 4**).

EHV-4 P(1)과 P(2), P(3)와 P(4)는 3번과 7번 시료에서만 양성을 나타냈으나 육안적으로 P(3)와 P(4)가 더욱 민감성을 나타내었다(**Fig. 5**).

3. Control 특이성 검사

PCR에서 가장 민감성이 높았던 EHV-1 P(1)과 P(4), EHV-4 P(3)와 P(4)의 특이성을 검정하기 위하여 EHV 표준주와 Bovine herpesvirus type-4(BHV-4)에 대한 PCR을 수행하였다. EHV-1의 표준주인 AustIV주는 EHV-1의 P(1)과 P(2)에서만, EHV-4의 표준주인 T252주는 EHV-4의 P(3)와 P(4)에서만 각각 1735bp와 580bp에 해당하는 PCR 산물이 관찰되었다. 그러나, BHV-4에서는 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 6).

4. 각 장기별 PCR결과

민감도와 특이성이 확인된 primer를 이용하여, 유산 새끼마의 흉수와 폐, 간으로부터 추출한 DNA를 PCR로 증폭하였다. 폐에서 EHV-1은 2번 시료를 제외한 나머지에서 양성을 보였으며(Fig. 7), EHV-4는 3번, 7번 시료에서 양성을 보였다(Fig. 8). 흉수에서 EHV-1은 2번,6번 시료에서만 음성을 보이고 나머지 시료에서는 양성이었다고(Fig. 9), EHV-4는 양성 control를 제외한 나머지에서 음성을 보였다(Fig. 10).

간에서 EHV-1은 2번, 6번, 7번 시료에서 음성을 보이고, 나머지 시료는 양성을 보였으며(Fig. 11), EHV-4는 흉수와 마찬가지로 양성 Control를 제외한 나머지에서 음성을 보였다(Fig. 12). 결과적으로 표준주인 Aust IV와 T252, 그리고 유산된 말의 흉수와 폐, 간에서 추출한 DNA에서 약 1735bp와 580bp의 각각의 바이러스의 glycoprotein B gene에 특이적인 유전자 증폭산물이 관찰되었고, 유산된 7두의 폐, 간, 흉수에서 추출한 DNA중 EHV-1은 폐와 흉수에서 6두와 5두, 간에서는 4두에서 특이적인 PCR 산물이 검출되었고, EHV-4는 폐에서 추출한 2두의 DNA추출물에서만 특이적인 PCR 산물이 검출되었다(Table 3).

5. EHV-1과 EHV-4에 대한 PCR 민감도 검사

본 실험에서 사용한 PCR 기법의 민감도를 확인하기 위해 EHV-1과 EHV-4의 표준주인 AustIV주와 T252주에서 추출한 DNA를 멸균된 3차증류수인 DEPC(diethyl pyrocarbonate)에 10ng부터 0.1pg까지 10배씩 단계희석 한 후 각각의 DNA 희석액을 PCR로 증폭하였다. 실험결과 육안적으로 관찰가능한 최소 DNA량은 1ng이었으며 사진촬영시 1ng까지 확인할 수 있었다(**Fig. 13**).



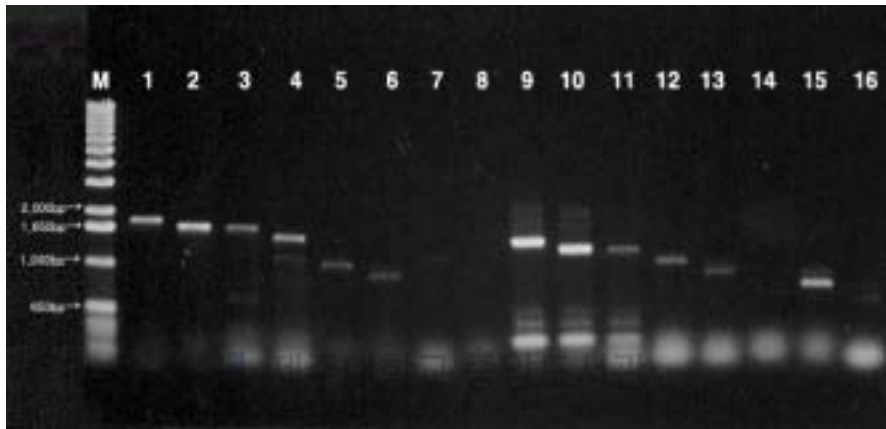


Fig. 2. PCR products of purified chromosomal DNA extracts of AustIV, using 16 different primer pairs EHV-1 or EHV-4 primer. PCR products were electrophoresed on a 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 4: 1-P1 to 1-P2 1-P4, 4-P2, 4-P4, Lane 5 to 8: 4-P1 to 1-P2, 1-P4, 4-P4, 4-P2, Lane 9 to 12: 1-P3 to 1-P2, 1-P4, 4-P2, 4-P4, Lane 13 to 16: 4-P3 to 1-P2, 4-P2, 1-P4, 4-P4.

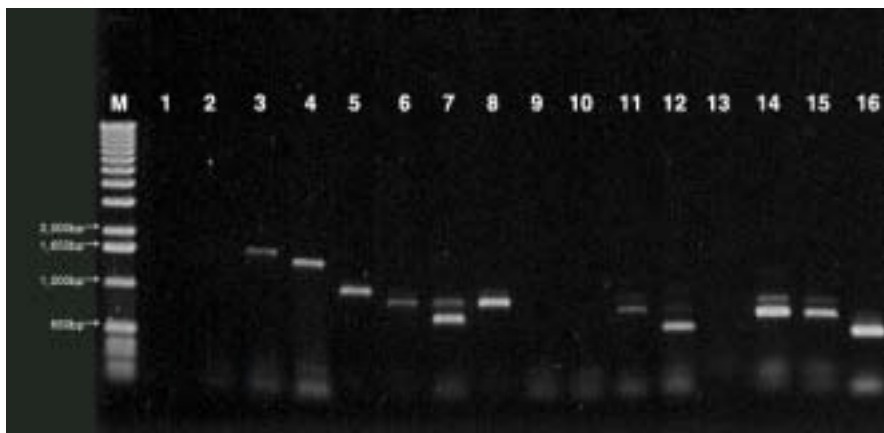


Fig. 3. PCR products of purified chromosomal DNA extracts of T252 ,using 16 different primer pairs EHV-1 or EHV-4 primer. PCR products were electrophoresed on a 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 4: 1-P1 to 1-P2 1-P4, 4-P2, 4-P4, Lane 5 to 8: 4-P1 to 1-P2, 1-P4, 4-P4, 4-P2, Lane 9 to 12: 1-P3 to 1-P2, 1-P4, 4-P2, 4-P4, Lane 13 to 16: 4-P3 to 1-P2, 4-P2, 1-P4, 4-P4.



Fig. 4. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from lungs of aborted fetuses EHV-1(P1)-EHV-1(P2), EHV-1(P1)-EHV-1(P4) primer pairs was used in lane 1 to 7, Lung(P1+P2), lane 8 to 14, Lung(P1+P4), respectively.

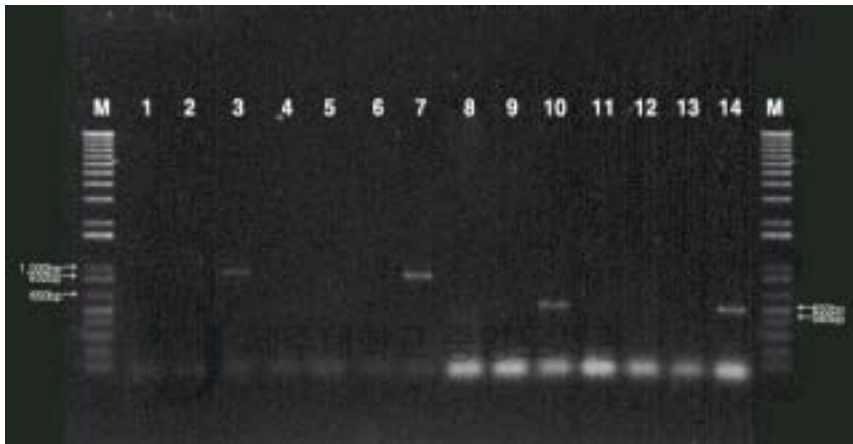


Fig. 5. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from lungs of aborted fetuses EHV-4(P1)-EHV-4(P2), and EHV-4(P3)-EHV-4(P4) primer pairs was used in lane 1 to 7, Lung(P1+P2), lane 8 to 14, Lung(P3+P4), respectively.

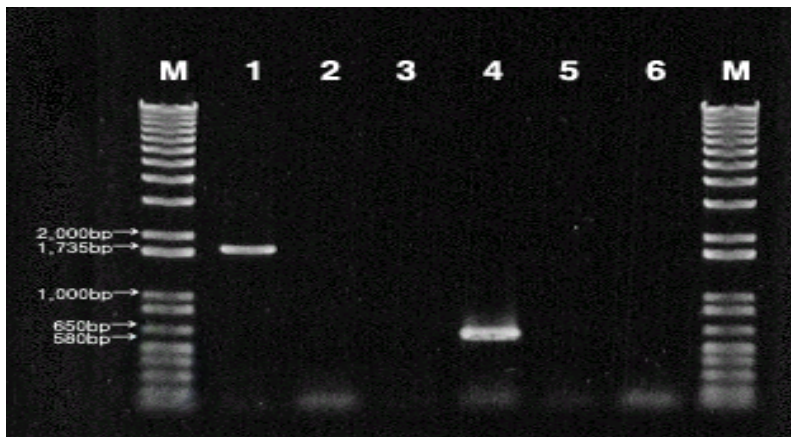


Fig. 6. The specificity of PCR amplification when AustIV(EHV-1), T252(EHV-4) and BHV-4 were used as template. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1: AustIV (EHV-1, P1+P4), Lane 2: AustIV (EHV-4, P3+P4), Lane 3: T252 (EHV-4, P3+P4), Lane 4: T252 (EHV-1, P1+P4), Lane 5: BHV-4 (EHV-1, P1+P4), Lane 6: BHV-4 (EHV-4, P3+P4),

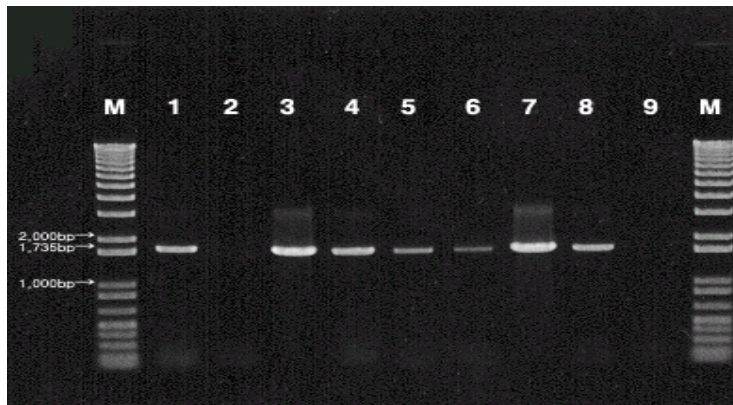


Fig. 7. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from lungs of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-1. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Lung. Lane 8, Positive control (AustIV) Lane 9, Negative control (T252)

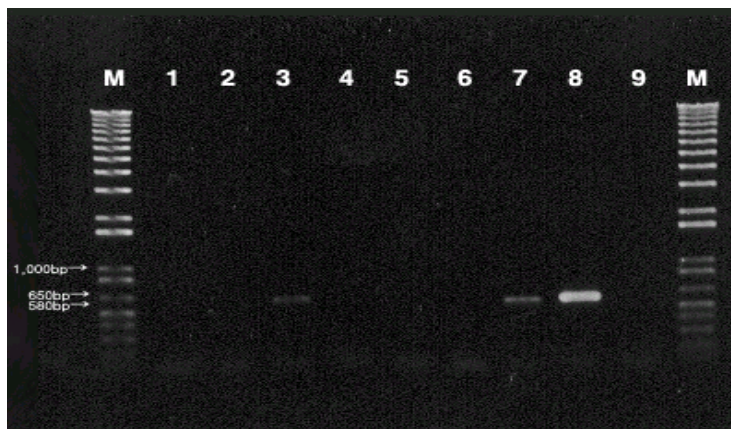


Fig. 8. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from lungs of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-4. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Lung. Lane 8, Positive control (T252) Lane 9, Negative control (AustIV)



Fig. 9. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from hydrothorax of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-1. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Hydrothoraxg. Lane 8, Positive control (AustIV) Lane 9, Negative control (T252)

세주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

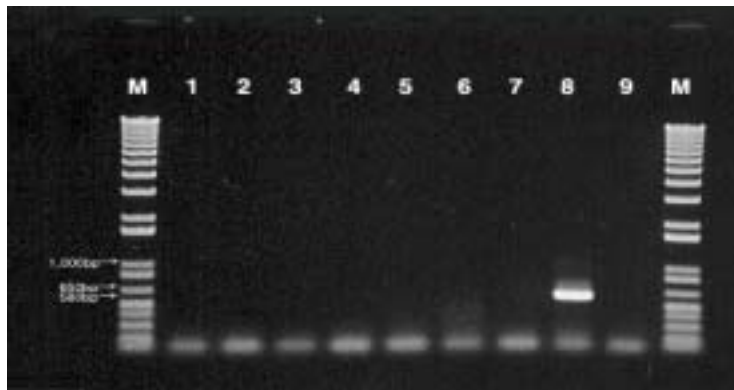


Fig. 10. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from hydrothorax of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-4. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Hydrothorax. Lane 8, Positive control (T252) Lane 9, Negative control (AustIV)

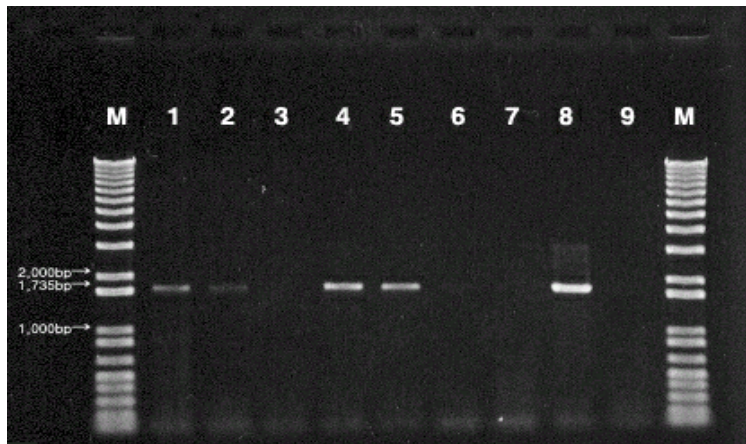


Fig. 11. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from livers of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-1. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Livers. Lane 8, Positive control (AustIV) Lane 9, Negative control (T252)

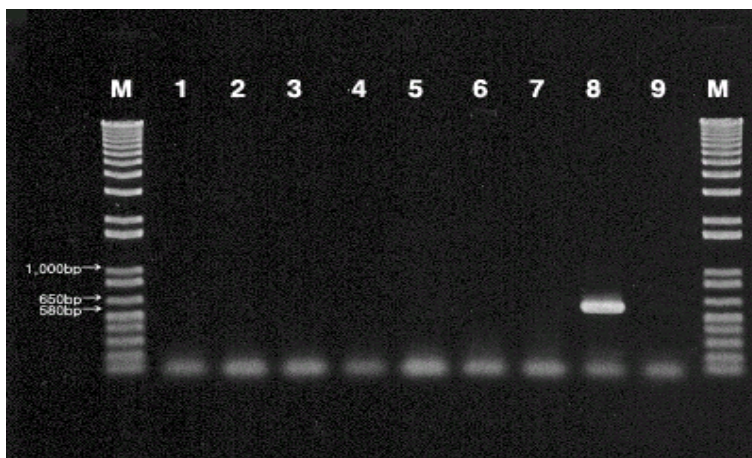


Fig. 12. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from livers of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-4. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); Lane 1 to 7, Livers. Lane 8, Positive control (T252) Lane 9, Negative control (AustIV)

Table 3. Distribution by organs of viral antigen for EHV-1 and 4

Sample		EHV-1	EHV-4
Number	Organs	1st	1st
1	Lung	P *	N**
	Liver	P	N
	Hydrothorax	P	N
2	Lung	N	N
	Liver	P	N
	Hydrothorax	N	N
3	Lung	P	P
	Liver	N	N
	Hydrothorax	P	N
4	Lung	P	N
	Liver	P	N
	Hydrothorax	P	N
5	Lung	P	N
	Liver	P	N
	Hydrothorax	P	N
6	Lung	P	N
	Liver	N	N
	Hydrothorax	N	N
7	Lung	P	P
	Liver	N	N
	Hydrothorax	P	N

*Positive

** Negative



Fig. 13. PCR of serial 10-fold dilution(lane 1 to 6; 10ng to 0.1pg) of purified chromosomal DNA extracts obtained from AustIV strain(first 6 lanes) and T252 strain(last 6 lanes). The PCR products were electrophoresed on a 0.7% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, molecular size standard (1-kb DNA ladder: US 73321); 1 to 6. 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg and 0.1pg, respectively.

VI. 고 찰

EHV에 의한 말의 유산은 전세계적으로 발생하고 있으며 국내에서도 Bak 등 (1981)이 비장 및 간의 증혈과 종대 그리고 흉강내 다량의 황갈색 흉수로 증만된 소견을 나타내는 말에 대해 병리조직학적 연구를 수행하여 말 비폐렴의 발생을 처음 보고하였고, 그 후 이 등(1986)은 혈청학적 조사를 실시하여 양성율이 서울 지역 말은 11.7%, 제주지역 말은 24.3%라고 보고한 바 있다. 조 등(1995)은 서울 및 제주지역에서 사육중인 말 혈청 651례에 대한 CELISA법과 중화시험에서 항체양성율이 각각 82.8%와 80.5%임을 확인했고, 유산태아에서 분리된 EHV주(LC1, LC2)를 시험백신으로 말에 투여한 결과 면역원성은 1차접종시 상승했다가 2차접종시 하강하였다고 보고하였다. 신 등(1996)은 면역조직화학적 및 Immunogold기법에 의한 전자현미경적 진단으로 신속하게 EHV를 동정하였다. 양(1998)은 EHV-1 국내분리주(LC1, LC2)를 유전자원으로 유전자 재조합 기술을 이용하여 EHV-1의 중요 방어 항원인 gD 유전자를 cloning하였고, baculovirus system에 의한 재조합 유전자의 발현을 보고 한 바 있다. 한편 Sugiura 등(1988)은 일본의 두 경마장에서 사육중인 말 669두중 EHV-1에 491두(73.4%), Equine rhinovirus type 1(ERhV-1)에 91두(13.6%), Equine rotavirus(ERoV)는 64두(9.6%), Equine adenovirus(EAdV)는 23두(3.4%)가 감염되었음을 보고하면서 EHV가 말에서 가장 문제시되는 바이러스성 병원체 중의 하나라고 주장한 바 있다. 이렇듯 국내외 보고에서 볼 수 있듯이 EHV감염증이 말에 중요한 질병임에도 불구하고 국내 실정에 맞는 진단방법이나 예방에 대한 연구가 미비한 실정이다. 그러나, 최근에는 Vail 등 (1993)에 의해 EHV-1과 EHV-4가 분류되었고, PCR기법을 이용한 EHV-1과 EHV-4에 대한 진단법이 광범위하게 연구되고 있다(Turtinen 과 Allen, 1982; Sharma 등, 1992; R. Kirisawa 등, 1993; O'Keefe 등, 1991; Welch 등, 1992; Borchert 등, 1993; McCann 등, 1995; R. Carvalho 등, 2000). 그러나, 이러한 PCR기법들은 EHV-1과 EHV-4의 높은 염색체 동질성 때문에 hybridization이나 nested PCR을 요구하며 비교적 많은 시간을 요구한다.

따라서 본 실험에서는 제주지역에서 발생한 말의 유산 원인을 규명할 목적으로 EHV-1과 EHV-4를 감별할 수 있는 PCR 기법을 Borchers와 Slater(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 그러나 이들이 보고한 방법으로는 EHV-1과 EHV-4에 의한 유산을 감별할 수 없었기 때문에 이들이 보고한 primer의 조합을 변형하여 EHV-1과 EHV-4를 신속하고 정확하게 감별할 수 있는 진단 방법을 확립하고자 하였다.

EHV-1 또는 EHV-4의 특이적인 8개 glycoprotein B gene primer의 조합에 의하여 EHV-1과 EHV-4에 특이성과 민감성이 있는 primer를 선택하였다. 비록 8개의 primer가 glycoprotein B gene의 다른 곳에 위치해 있을 지라도 일부 primer의 염기 서열이 유사하여 비특이 반응이 나타난 것으로 사료된다. 이들 중 가장 우수한 primer를 사용하여 실시한 PCR에서 EHV-1은 유산된 말 태아 7두의 폐, 흉수, 간에서 각각 6두, 5두, 4두에서 EHV-1에 특이적인 1735bp의 DNA의 증폭을 확인 할 수 있었고, EHV-4는 폐, 간, 흉수중 폐에서 2두만이 EHV-4에 특이적인 580bp의 DNA의 증폭을 확인 할 수 있었다. 이는 국내에서 여전히 EHV-1에 기인한 유산이 다발하고 있음을 보여주며 더불어 EHV-4와 혼합감염이 일어났음을 확인할 수 있었고, 본 실험에서 적용한 PCR 기법은 EHV-1에 의한 유산과 EHV-4에 의한 호흡기 감염 등의 혼합감염을 조기에 진단하는 데 널리 활용할 수 있음을 나타낸다. 또한 AustIV와 T252주의 PCR 민감성 검사에서 이들 모두 1ng까지 검출 할 수 있었다. 각종 장기에서 나타난 PCR 산물의 증폭 정도는 유사하였는데 이는 EHV-1과 EHV-4가 태아에 감염시 거의 모든 실질장기로 전파되는 것으로 알려져 있으나(Catherine Walker 등, 1999) 본 질병을 PCR로 진단하거나 원인 바이러스를 분리하기 위해서는 유산 태아의 흉수, 간 및 폐조직의 유제를 사용하는 것이 적당할 것으로 사료된다(조 등, 1995).

한편, 말 비폐렴의 예방은 백신접종을 통하여 이루어지며 국내에서 사용하고 있는 백신은 임신마에 있어서 임신 5, 6개월 및 7개월에 3회 접종해야 하는 번거로움이 있다. 본 실험에 사용된 유산 말의 경우 백신투여 횟수가 공통적으로 1회였으며, 유산이 발생한 농장들이 서로 인접하여 있었다. 따라서 앞으로 EHV-1에 의한 유산피해와 EHV-4에 의한 호흡기 질병피해를 줄이기 위해서는 백신의 철저한 추가접종이 이루어져야하며 국내에서 분리된 바이러스에 대한 백신의 개발이 시급할 것

이다. 또한 PCR은 앞으로 EHV-1과 EHV-4에 대한 동정에 유용하게 응용될 것으로 보이며, 더불어 유산된 말의 각 장기에서 EHV-1과 EHV-4를 쉽게 검출할 수 있도록 단클론 항체를 이용한 면역조직화학법과 함께 두 진단기법을 통한 신속한 확진이 이루어 질 수 있도록 노력할 필요가 있다고 생각된다.



V. 결 론

자연 발생한 말 유산태아에서 말의 Equine herpesvirus type-1과 -4를 감별하기 위한 PCR 검출 방법을 개발하기 위해 두 바리러스의 gB gene에 대한 primer를 조합하여 특이성과 민감성이 나타난 primer를 선택하여 유산태아의 체액과 폐, 간, 그리고 표준주로부터 gB gene 일부를 증폭하는 PCR를 실시하였다.

1. EHV-1과 EHV-4의 공통적인 gB gene에서 8개의 primer를 조합한 PCR에서 EHV-1의 경우 EHV-1(P1)과 EHV-1(P2), EHV-1(P1)과 EHV-1(P4)로, EHV-4의 경우 EHV-4(P1)과 EHV-4(P2), EHV-4(P3)와 EHV-4(P4)로 증폭하였을 때 특이성이 높은 PCR 산물이 관찰되었다.
2. 특이성이 나타난 2쌍의 primer로, 유산태아의 폐에서 추출한 DNA를 template로 한 PCR에서 EHV-1은 EHV-1(P1)과 EHV-1(P2)보다는 EHV-1(P1)과 EHV-1(P4)가, EHV-4는 EHV-4(P1)과 EHV-4(P2)보다는 EHV-4(P3)와 EHV-(P4)가 높은 민감성을 보였다.
3. 민감성이 확인된 primer의 특이성을 검증하기 위한 실험에서 AustIV주는 EHV-1 P(1)과 P(4)에, T252주는 EHV-4 P(3)와 P(4)에 특이성을 보였고, BHV-4는 전부 음성으로 나타났다.
4. 특이성과 민감성이 확인된 primer를 이용한 각 장기별 PCR 실험에서 EHV-1은 폐와 흉수에서 6두, 5두가, 간에서는 4두의 양성율을 보여 gB gene의 특이적인 1735bp의 유전자가 검출되었고, EHV-4는 폐에서 2두만이 특이적인 580bp의 유전자가 검출되었을 뿐 나머지 장기에서는 검출이 안 되었다.

5. EHV-1과 EHV-4의 표준주인 AustIV주와 T252주의 민감도 검사에서 10배씩 단계희석한 DNA희석액은 1ng까지 확인 할 수 있었다.

이상의 결과로, EHV-1과 EHV-4의 gB gene을 특이적으로 증폭할 수 있는 PCR기법이 확립되었으며 실제 가검물에 적용하여 EHV-1과 EHV-4의 특이 유전자를 확인 할 수 있었다. 또한 EHV-1과 EHV-4간의 감별진단이 가능하여 혼합감염시에도 빠르고 신속한 진단이 가능하게 되었다.



VI. 참고문헌

Antonie neubauer et al. 1997. Analysis of the Contribution of the Equine herpesvirus 1 glycoprotein gB Homology to virus Entry and Direct Cell to Cell Spread. *Virology*. 227(281-294).

Bak UB, Lim CH, Kang BH. 1993. A pathological survey on equine viral rhinopneumonitis occurred in korea. *Korean J Vet Res.*, 21:11-19.

Ballagi-Pordany, A., Klingeborn, B. et al. 1990. Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequence in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 22: 373-381.

Borchers K, Slater J. 1993. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods.*, 45:331-336.

Catherine Walker et al. 1999. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1(EHV-1) infection in the horse and the most model. *Veterinary microbiology* 3-13.

C. Van Maanen et al. 2000. Development and validation of a monoclonal antibody blocking elisa for the detection of a antibodies against both equine herpesvirus type 1(EHV1) and equine herpesvirus type 4(EHV4). *Vet. Microbiology* 71(37-51).

Dimock WW, Edwards PR. 1933. Is there a filterable virus of abortion in mares *Ky Agr Exp Sta Bull.*, 297-301.

Doll ER, Bryans JT, MaCollum WH, et al. 1957. Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion in mares. Its differentiation from equine abortion(influenza)virus. *Cornell Vet.*, 47:3-31.

Duxbury AE, Path Mc, Dixer DT. 1968. Isolation of equine rhinopneumonitis virus from an epidemic of acute respiratory disease in horses. *Aust Vet J.*, 44:58-63.

Hartley Wj, Dixon RJ. 1979. An outbreak of focal per-inatal mortality due to equine herpesvirus type 1; Pathological observations. *Equine vet J.*, 11:215-218.

Henry BE, Robinson RA, Dauenhauer SA, et al. 1981. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Viol.*, 115:97-114.

Jackson T, Kendrick JW. 1971. Paralysis of horse associated with equine herpesvirus 1 infection. 1971. *J. Am. Vet. Med Assoc.*, 158:1351-1357.

Judith baumeister et al. 1995. Pseudorabies Virus and Equine herpesvirus 1 Share a Nonessential Gene Which is Absent in other Herpesviruses and Located Adjacent to a Highly Conserved Gene Cluster. *Journal of Virology.*, 5560-5567.

Matsumura T, Smith RI, O'Callaghan DJ. 1993. DNA sequence and transcriptional analyses of the region of the equine herpesvirus type 1 kentucky A strain genome encoding glycoprotein C. *Viol.*, 193: 910-923.

Matsumura T, Sugiura T, Imagawa H, et al. 1992. Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. *J Vet Med Sci.*, 54:207-211.

Merchant LA, Packer RA. Veterinary Bacteriology and Virology. 7th. 1967.

The Iowa State University Press., 626-627.

Merkt H, Jochle. 1993. Abortion and twin pregnancies in thoroughbreds; Rate of occurrence, treatments and prevention. *J Equine Vet Sci.*, 13:690-694.

O'Callaghan DJ, Gentry GA, Randall CC. 1983. The Equine herpesviruses; In Roizman, the herpesviruses. *New York: Plenum Press.*, 2: 215~318.

O'Callaghan DJ, Harty RN. 1993. Equine herpesviruses. encyclopedia of virology. *Academic press.*, 1:423-429.

O'Keefe, J.S. et al. 1991. Amplification and differentiation of the DNA of an abortigenic(type 1) and a respiratory(type 4) strain of equine herpesvirus by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, 50: 349-351.

Pauli G, Gregerson JP, Ludwig H. 1984. Plaque/focus immunoassay; A simple method for detecting antiviral monoclonal or other antibodies and antigens in cells. *Immunol Meth.*, 74: 337-344.

Perdue ML, Kemp MC, Randall CC. et al. 1974. Studies of the molecular anatomy of the L-M cell strain of equine herpesvirus type 1: Proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Viol.*, 59:201-216.

R. Carvalho, A. M. Oliveria et al. 2000. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Arch Virol.*, 1773-1787.

R. Carvalho, L. M. F. Passos et al. 2000. Development of a Differential Multiplex PCR Assay for Equine herpesvirus 1 and 4 as a Diagnostic Tool. *Journal of Veterinary Medicine.*, 47(5), 351-359.

R. Kirisawa, A. Endo, H. et al. 1993. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiology*, 36:57-67.

R. Sinclair and J. A. Mumford. 1992. Rapid detection of equine herpesvirus type-1 antigens in nasal swab specimens using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 39(299-310).

Telford EAR, Watson MS, McBride K, et al. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Viol.*, 189:304-316.

Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, et al. 1976. Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet J.*, 8(2): 58-65.

Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th. *Comstock Publishing Associatet.*, 591-614..

Turtinen LW, Allen GP. 1982. Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus Type 1. *Gen Virol.*, 63:481-485.

Sharma, P.C. Cullinane, A.A. et al. 1992. Diagnosis of equid herpesviruses-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Equine Vet. J.*, 24: 20-25.

S.H.E. McCann et al. 1995. Development of PCR assays to genetic variation amongst equine herpesvirus-1 isolates as an aid to epidemiological investigation. *Journal of Virological Methods*, 52(183-194).

Sugiura T, Matsumura T, Hirano S. 1988. Field surveillance of equine herpesvirus

type infection in racehorse by agar gel immunodiffusion test. *Bull Equine Res Inst.*, 15-19.

Vail CD. 1993. Herpesvirus infection of horse. *Equine practice.*, 15:19-22.

Welch, HM Bridges, C.G. Lyon, A.M. et al. 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, 73: 261-268.

양용수. “국내 분리 Equine Herpesvirus Type 1구조단백질을 구성하는 gD유전자의 cloning과 발현” 석사논문연구.

이영옥, 허영, 박봉균. 1986. '85년도 마필 전염병 검진사업 실시결과 보고서. *대한수의사회지.*, 22:51-56.



신태균, 이두식, 진재광, 임운규, 조길재. 1996. “유산망아지에서 말 herpesvirus의 면역조직학적 및 immunogold기법에 의한 전자현미경적진단” *J.Res.Ins.Anim.Sci.*, 12:111-118.

조길재, 김봉환, 이두식, 오문유, 고미희. 1995. “국내 말로부터 비페럼바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구 I, II, III” *대한수의학회지.*, 35(4):735-758.

Differentiation of Equine Herpesvirus Type-1 and Equine Herpesvirus Type-4 by Polymerase Chain Reaction

Hyuk Moon

(Supervised by Professor Du-sik Lee)

Abstract

Equine herpesvirus-type 1(EHV-1) is a major cause of respiratory disease, abortion, perinatal foal mortality and neurological disease in horsees. EHV-1 infection causes severe economic losses in the horse breeding industry. Equine herpesvirus-type 4(EHV-4) is primarily a causative agent of respiratory disease and, occasionally, abortion. It is impotent to identify the causative agents of abortion in equine for minimizing the loss of breeding costs in equine industry. Recently, the abortion has often occurred in equine herds and thus the purpose of the study was aimed at the identification of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4, one of the frequent pathogens to abortion, using polymerase chain reaction. Seven fetuses to be aborted at nine to ten months in pregnancy reared in two herds were used in the study. Two primers in the PCR were made from glycoprotein B gene of EHV-1 and EHV-4 to amplify specific common regions for EHV-1 or EHV-4. The primers specific for EHV-1 were amplified at 1735bp of PCR products from six, five, and four DNA extracts, respectively, from ,lungs, hydrothorax and

livers of seven aborted equine fetuses. The primers specific for EHV-4 were amplified at 580bp of PCR products only 2 DNA extracts from lungs of seven aborted fetuses, whereas not from other organs. Consequently, PCR could be applied for differential diagnosis of EHV-1 and EHV-4, indicating that the former play a major role of the viral pathogen associated with equine abortion in Jeju island.

Key words: equine herpesvirus infection, equine herpesvirus type 1 and 4, polymerase chain reaction, abortion

