

제주지역에서 사육중인 더러브렛 말 호흡기로부터 분리된 병원성 *Streptococcus* spp.의 생화학성상 및 약제감수성 양상

최성균 · 김성국¹ · 조길재*

경북대학교 수의과대학 말의학연구소, ¹경상북도가축위생시험소

(접수 2011. 8. 1; 수정 2011. 9. 1; 게재승인 2011. 9. 2)

Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of pathogenic *Streptococcus* spp. isolated from respiratory tract of Thoroughbred horses in Jeju, Korea

Seong-Kyoon Choi, Seong-Guk Kim¹, Gil-Jae Cho*

College of Veterinary Medicine and Institute of Equine Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-911, Korea

(Received 1 August 2011; revised 1 September 2011; accepted 2 September 2011)

Abstract

This study carried out to investigate the pathogenic *Streptococcus* spp. isolated from respiratory tract of Thoroughbred in Jeju province. The specimens were collected from nasal mucosa using a culture swab from 113 Thoroughbred horses. Suspected colonies were selected onto blood and MacConkey agar plate, and identified by standard biochemical properties using Vitek 2 system and PCR method. In this study, we isolated *S. equi* (n=6), *S. zooepidemicus* (n=31), *S. equisimilis* (n=5), *S. dysgalactiae* (n=2), *S. agalctiae* (n=1), non identified β -hemolytic *Streptococcus* spp. (n=1) from Thoroughbred horses. In antimicrobial susceptibility test, it showed a high sensibility in the most of antimicrobial except for neomycin, streptomycin, spectinomycin, erythromycin and clindamycin. These results will provide the basic information to establish control measures for the treatment and prevention of respiratory disease by pathogenic *Streptococcus* spp. in Thoroughbred horses in Korea.

Key words : *Streptococcus* spp., Thoroughbred, Antimicrobial susceptibility

서 론

전 세계적으로 여러 국가에서 경주마로 활용하고 있는 더러브렛 말은 아랍종 씨수말과 영국의 재래종 씨암말을 근간으로 탄생하여 1793년 영국에서 최초로 혈통등록을 시작한 이후 우리나라를 비롯하여 세계 곳곳에서 생산되고 있다. 국내는 지난 1970년대는

주로 일본이나 호주 등지에서 수입된 더러브렛 또는 앵글로 아랍종 말로 경마 및 승마에 활용하였으나 국적 있는 경마시행을 위해 생산 및 개량을 통하여 경주마의 국제화와 축산 발전 및 농가 소득에 기여할 목적으로 1980년대 초부터 국내에서도 말의 생산을 시작한 이래 현재는 제주를 포함하여 전국적으로 말을 생산하는 팔목할 만한 발전을 이루었다(최 등, 2007). 농수산식품부 기타가축통계 자료를 보면 현재

*Corresponding author: Gil-jae Cho, Tel. +82-53-950-5978,
Fax. +82-53-950-5955, E-mail. chogj@knu.ac.kr

국내 사육되고 있는 말은 더러브렛 말과 같은 개량마 혹은 경종마가 약 10,000여 두, 제주마를 포함한 재래 말이 약 17,000여 두 등으로 총 27,000여 두 정도로 추정하고 있다.

우수한 형질의 말을 생산과 육성에 오랜 시간 동안 가장 중요한 문제로 대두하여온 것 중 하나가 호흡기 질병 때문에 자마의 폐사 및 경주마, 승용말의 운동 능력 및 훈련의 효율성 저하이다. 말 호흡기 질병은 바이러스와 세균에 의한 감염 때문에 주로 발생하지만, 면역기능 이상으로 인한 알레르기성 기관지 점액 과다분비, 과민성 호흡기도 증후군 등의 비감염성 호흡기 질병 또한 발생하기도 한다(Arthur, 1990; Mason 등, 1994; Stephen 등, 2009).

말의 바이러스 감염에 의한 호흡기 질병은 equine herpes virus type 4, equine influenza, equine viral arteritis 등이 주로 관여하며, 발열, 식욕부진, 기침, 과다한 비즙 분비, 악하 림프절의 염증 등의 증상을 유발한다(Reed와 Toribio, 2004; MacLachlan과 Balasuriya, 2006; Elton과 Bryant, 2011). 또한, reovirus (Imagawa 등, 1989), hendra virus (Defang 등, 2010) 감염에 의한 폐렴 발생도 보고되었으며, adenovirus (Giles 등, 2010) 감염의 경우 면역기능이 저하된 증상이 있는 자마에서는 치명적인 증상을 유발하기도 한다.

말의 세균성 호흡기 감염증은 원발성 바이러스 감염에 의한 호흡기 방어기능 상실 및 개체의 면역기능을 저하시킬 수 있는 다양한 원인 때문에 주로 2차감염의 형태로 발생한다. 일반적으로 세균성 호흡기 감염 시 농성비즙의 분비, 기력상실, 발열, 비정상적 호흡기 청진음, 백혈구 증가 등의 특징을 보이며, 증상이 호전되지 않을 시에는 패혈증으로 폐사되기도 한다(Mason 등, 1994; Wood 등, 2005). 말의 호흡기질병에서 세균성 2차감염의 가장 일반적인 원인은 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*)로 알려졌으며, *S. equi* subsp. *equi* (*S. equi*), *Rhodococcus equi* (*R. equi*), *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* 등도 관여하는 것으로 알려졌다.

또한, 선역의 원인체인 *S. equi*와 화농성 자마 폐렴의 원인체인 *R. equi*는 말에서 면역력 저하, 호흡기 방어기능 저하 등의 호발 요인없이 원발성 호흡기 감염을 유발하기도 한다(Choi 등, 2010; Pusterla 등, 2011). 특히 기존의 연구를 따르면 말의 세균성 호흡기 감염을 유발하는 많은 세균 중에서 병원성 strepto-

cocci가 주요 원인체로 알려졌다(Timoney, 2004).

Streptococcus spp.는 그람 양성의 연쇄상 배열을 보이는 세균으로 운동성이 없으며 catalase 음성, oxidase 음성의 특징을 가지는 통성혐기성균으로 직경이 약 1 μm 의 구균이다. 일반적으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 동물과 사람의 피부면과 점막면, 특히 상부기도, 소화기, 생식기 등에서 주로 분리되며 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려졌다(Quinn 등, 1993). 면양 혈액 5% 첨가배지에서 발육 증식하며, 대부분은 용혈성을 나타내지만 혈액배지 상의 용혈 양상에 따라 α , β , γ 용혈성 streptococci로 분류하기도 한다. 또한, streptococci의 균체 항원성을 나타내는 C 다당체의 특성에 따라 혈청학적으로 Lancefield group A부터 T까지의(I, J 제외) 18종의 균으로 한다(Whitworth, 1990). 말에서 주로 호흡기 감염증을 유발하는 병원성 streptococci는 용혈성의 Lancefield group C로 분류되는 선역의 원인체인 *S. equi*와 호흡기 감염과 자궁내막염 등의 생식기 질병을 유발하는 *S. zooepidemicus* 등이 가장 일반적이며 특히 세균성 호흡기 질병의 40% 이상이 *S. zooepidemicus*에 의해 발생하는 것으로 알려졌다. 또한, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*)는 드물게 림프절염, 호흡기감염, 태반염 등을 유발하는 것으로 알려졌다. 또한, α -hemolytic streptococci로 분류되는 *S. pneumoniae* capsule type III는 자마의 호흡기 감염을 유발한다(Timoney, 2004).

이번 연구에서는 말의 세균성 호흡기 질환의 주요 원인체인 streptococci에 대한 효율적인 치료와 예방에 활용하기 위해 제주지역에서 사육 중인 더러브렛 말을 대상으로 호흡기 내 병원성 streptococci의 분리를 하였고 분리균의 항균제 감수성 시험을 하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

2007년 5월부터 2009년 3월까지 제주지역에서 사육 중인 건강한 더러브렛 말 86두와 호흡기 증상을 나타내는 27두로부터 비즙을 채취하여 균분리에 이용하였다. 시료의 오염방지를 위해 공시축의 비공 주변을 외부소독제를 적신 멸균된 가제로 외부 오염물질을 최대한 제거하고 미리 준비한 멸균 면봉으로 비

강에 10초간 삽입하였다. 채취한 시료는 Thioglycolate broth (BD, USA)에 넣어 냉장상태로 48시간 내에 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다(Hoffman과 Viel, 1997; 최 등, 2007).

병원성 streptococci의 분리

Nasal swab이 함유된 Thioglycolate broth를 37°C, 16 시간 증균 배양한 후, 5% 면양혈액 배지와 MacConkey agar (MA, BD, USA)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 동안 배양하였으며, 배양된 집락들을 대상으로 집락형태와 용혈성, Gram stain, OF-test, catalase test, oxidase test 등의 실험을 통해 streptococci로 의심되는 균주를 1차 분리하였으며, 비동화 말혈청 5%를 첨가한 Tryptic soy agar (TSA, BD, USA)에 계대하여 -70°C에 보관하면서 생화학적 성상, 항균제 감수성시험 등 추가 실험을 하였다(Luque 등, 2006; Newton 등, 2008).

Vitek 2 system을 이용한 동정

분리한 streptococci 의심균주에 대하여 미생물 자동 동정 장비인 Vitek 2 system (Biomerieux, France)의 GP card (Biomerieux, France)를 이용하여 1차 동정을 하였으며, Vitek 2 system의 GP card의 각 well별 반응 결과를 바탕으로 생화학적 성상을 분석하였다(우 등, 2001).

PCR을 이용한 streptococci의 동정

균 동정을 위해 기존의 연구 방법에 따라 streptococci의 특이 유전자부위의 primer를 제작하여 PCR을

실시하였으며 균종별 동정 primer의 염기서열 및 PCR 조건은 Table 1과 같다(Alber 등, 2004; Newton 등, 2008; Imperi 등, 2010). 분리주의 PCR을 위해 genomic DNA 추출은 18시간 순수 분리하여 증균 계대 한 균주를 백금이로 1회선 채취하여 멸균증류수 300 µl를 첨가한 microtube에 접종하고 99°C에서 30분간 증탕 가열한 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 균체성분을 침전시킨 후 상층액 200 µl를 새로운 microtube에 옮겨 냉동보관하면서 PCR을 위한 template DNA로 이용하였다. PCR은 Accu-Power® HF PCR premix [1U Taq DNA polymerase, 250 µM each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, stabilizer and tracking dye, Bioneer, Korea]에 template DNA 1 µl와 제작한 forward, reverse primer를 각각 1 µl씩 첨가하여 T-gradient thermoblock (Biometra, Germany)내에서 실시하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 유전자 부위의 확인을 위해 ethidium bromide가 함유된 1.5% agar gel에 PCR 반응물 5 µl를 취하여 한천 사이에 점적한 후 110 V, 30분간 전기영동을 실시하고 자외선조사 하에서 증폭산물을 확인하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) 기준에 따라 디스크 확산법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 분리주를 5% 면양혈액배지 37°C, 18시간 동안 배양한 후 멸균 면봉으로 집락을 채취하여 5 ml 멸균생리식염수에 균희석 농도를 표준탁도(McFarland No. 0.5)로 희석하

Table 1. Oligonucleotide primers used in present study

Strain	Gene	Sequence (5'→3')	PCR condition	Size of product (bp)	Reference
<i>S. equi</i> and <i>S. zooepidemicus</i>	<i>SodA</i> *	F-CAGCATTCCTGCTGACATTCGTCAGG R-CTGACCAGCCTTAITTCACAACCAGCC	1**	235	Alber et al (2004)
	<i>Seel</i> †	F-GAAGGTCGCCAATTTTCAGGTACTTTG R-GCAIACTCTCTCTGTACCATGTCCTG			
<i>S. equisimilis</i>	<i>Skp</i> ‡	F-TCAAATCGGTTGGCACAGAC R-CGTCCTTAGCATAGAAGGATTGG	2††	279	Preziuso et al (2010)
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>ISR</i> §	F-GGCTCAACCACTGTACGCTT R-ATCTCTAGACCGGTCAGGA	3‡‡	401	Imperi et al (2010)
<i>S. agalactiae</i>	<i>Cps</i>	F-CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT R-TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC			

*Superoxide dismutase A, †Pyrogenic mitogen SePE-I, ‡Streptokinase precursor gene, §16S rRNA intergenic space region, || Capsular polysaccharide, **1× (94°C 180 s), 30× (94°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 40 s), 1× (72°C 180 s), ††1× (94°C 180s), 35× (94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 40 s), 1× (72°C 300 s), ‡‡1× (95°C 300 s), 30× (94°C 60 s, 54°C 60 s, 72°C 120 s), 1× (72°C 180 s).

고 희석액을 멸균면봉으로 채취하여 5% 면양혈액배지에 균등하게 희선 도말한 다음 항생제 디스크를 배지당 8개를 접종하고 37°C, 18시간 배양한 후 디스크 주위에 나타난 발육저지대를 caliper를 이용하여 측정하였고, 항생제에 대한 감수성 결과는 디스크 제조사에서 제시한 기준에 따랐다. 공시한 항균제는 BBL sensi-disc (BD[®], USA) 제품인 penicillin (P, 10 U), amoxycillin/clavulanic acid (Amc, 20/10 µg), ampicillin (Am, 10 µg), cephalothin (Cf, 30 µg), cefoperazone (Cfp, 75 µg), cefepime (Fep, 30 µg), kanamycin (Km, 30 µg), gentamicin (Gm, 10 µg), amikacin (An, 30 µg), neomycin (Nm, 30 µg), streptomycin (St, 10 µg), norfloxacin (Nor, 10 µg), erythromycin (Em, 15 µg), clindamycin (Cc, 2 µg), ciprofloxacin (Cip, 5 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), doxycycline (D, 30 µg), tetracycline (Te, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt,

1.25/23.75 µg)과 Oxoid[®] (UK)제품인 enrofloxacin (Eno, 5 µg), Ceftiofur (Xnl, 30 µg), tilmicosin (Til, 15 µg), spectinomycin (Spt, 100 µg), florfenicol (Ffc, 30 µg) 등 24종을 사용하였다.

결 과

균 분리 및 동정

2007년 5월부터 2009년 3월까지 제주지역에서 사육 중인 더리브렛 말의 비강 내에서 채취한 시료에서 분리한 streptococci를 미생물 자동동정장비를 이용하여 동정한 결과는 Table 2와 같다. 건강한 말 86두와 호흡기 증상을 보이는 27두의 말에서 *S. equi*가 6주, *S. zooepidemicus*가 31주, *S. equisimilis* 5주, *S. dysgalactiae* 2주, *S. agalactiae* 1주, 동정 되지 않은 streptococci 1주를 포함하여 총 6종 46주의 streptococci가 분

Table 2. The results of *Streptococcus* spp. isolated in this study

Isolates	No. of isolates/ No. of tested horses (%)		Total (%)
	Healthy	Diseased respiratory	
<i>S. equi</i>	1/86 (1.2)*	5/27 (18.5)	6/113 (5.3)
<i>S. zooepidemicus</i>	11/86 (12.7)	20/27 (74.1)	31/113 (27.4)
<i>S. equisimilis</i>	4/86 (4.7)	1/27 (3.7)	5/113 (4.4)
<i>S. dysgalactiae</i>	2/86 (2.3)	-/27 (0.0)	2/113 (1.8)
<i>S. agalactiae</i>	1/86 (1.2)	-/27 (0.0)	1/113 (0.88)
Unknown	1/86 (1.2)	-/27 (0.0)	1/113 (0.88)
Total	20/86 (23.3)	26/27 (96.3)	6/113 (40.7)

*No. of isolates/No. of examined horses.

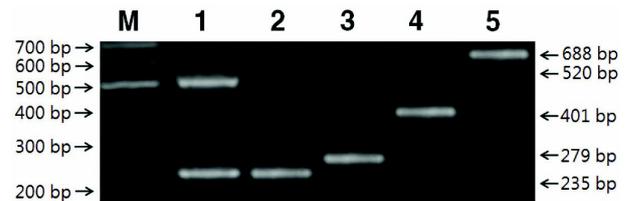


Fig. 1. Identification *Streptococcus* spp. isolated from Thoroughbred horses by PCR. Lane M: molecular size marker (100 bp ladder, Elpis, Korea), lane 1: *S. equi*, lane 2: *S. zooepidemicus*, lane 3: *S. equisimilis*, lane 4: *S. dysgalactiae*, lane 5: *S. agalactiae*.

Table 3. Biochemical properties of 46 *Streptococcus* spp.

Strains	Lancefield group	Biochemical characteristics						
		Lactose	Mannitol	Raffinose	Salicin	Sorbitol	Trehalose	6.5% NaCl
<i>S. equi</i> (6)	C	-* (0/6) [‡]	- (0/6)	- (0/6)	+ [†] (6/6)	- (0/6)	- (0/6)	- (0/6)
<i>S. zooepidemicus</i> (31)	C	+ (31/31)	- (0/31)	- (0/31)	+ (31/31)	+ (31/31)	- (0/31)	- (0/31)
<i>S. equisimilis</i> (5)	C	(+) (3/5)	- (0/5)	- (0/5)	(+) (4/5)	- (0/5)	+ (5/5)	- (0/5)
<i>S. dysgalactiae</i> (2)	C	+ (2/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	+ (2/2)	- (0/2)
<i>S. agalactiae</i> (1)	B	+ (1/1)	- (0/1)	- (0/1)	+ (1/1)	- (0/1)	+ (1/1)	- (0/1)
Unknown (1)	D	- (0/1)	- (0/1)	+ (1/1)	+ (1/1)	- (0/1)	+ (1/1)	- (0/1)

*Negative reaction, [†]Positive reaction, [‡]No. of positive isolates/No. of tested isolates.

리되었다. 각 균종별로 임상증상유무에 따른 분리율은 *S. equi*가 건강한 말에서 1주(1.2%), 호흡기 증상을 보이는 말에서 5주(18.5%)가 분리되어 5.3%의 분리율을 나타내었으며, *S. zooepidemicus*는 건강한 말에서 11주(12.7%), 호흡기 증상이 있는 말에서 20주가 분리되어 74.1%의 상대적으로 매우 높은 분리율이 관찰되었다.

한편, *S. equi*와 *S. zooepidemicus*를 제외한 기타 분리주에서는 *S. equisimilis* 1주를 제외한 모든 균주가 건강한 말에서 분리되었으며 *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae* 및 *S. agalactiae*는 각각 4.4%, 1.8%, 0.9%의 비교적 낮은 분리율이 관찰되었다. PCR법을 이용하여 streptococci 46주의 특이유전자 부위를 증폭하여 확인한 결과 Fig. 1과 같이 균종별로 검출부위가 확인되었다.

생화학 성상검사

이번 연구에서 분리한 streptococci의 Vitek 2 system의 반응결과를 토대로 균주별 생화학적 성상을 확인한 결과는 Table 3과 같다. 전체 분리한 6종의 strepto-

cocci 46주에서 D-amygdalin, L-lactate alkalization, growth in 6.5% NaCl, D-xylose, urease, α-mannosidase 반응에서 모두 음성을 나타내었으나 Ala-Phe-Pro arylamidase, leucine arylamidase, alanine arylamidase, tyrosine arylamidase, mannitol 등에는 모든 균주가 양성 반응을 나타내었다. 균종간 유의적인 차이가 관찰된 당 분해능은 lactose의 경우 *S. equi*를 제외한 균주에서 분해능이 있으며, raffinose는 모든 균주에서 분해능이 관찰되지 않았다. Salicin은 *S. dysgalactiae*를 제외한 대부분의 균주에서 분해능이 관찰되었으며, sorbitol은 *S. zooepidemicus*에서만 분해능이 있었다. 또한, trehalose는 *S. equi*와 *S. zooepidemicus*에서는 분해능이 없었지만 *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae* 및 *S. agalactiae*에서는 분해능이 관찰되었다.

항균제 감수성 시험

디스크 확산법에 의한 항균제 감수성 시험 결과는 Table 4와 같다. 분리된 6종의 streptococci 46주는 aminoglycoside계 항균제를 제외한 대부분의 항균제에 비교적 높은 감수성을 나타내었으며, penicillin계,

Table 4. Antimicrobial susceptibility test of 46 *Streptococcus* spp. isolated in this study

Antimicrobial drugs	No. of susceptible streptococci (%)					
	<i>S. equi</i>	<i>S. zooepidemicus</i>	<i>S. equisimilis</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	Non-identified
Penicillin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Ampicillin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Amoxycillin/clavulanic acid	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Cephalothin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Cefoperazone	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Cefepime	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Ceftiofur	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Norfloxacine	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Enrofloxacin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Ciprofloxacin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Gentamicin	2 (33.3)	28 (90.3)	3 (60.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Kanamycin	2 (33.3)	16 (51.6)	1 (20.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Amikacin	6 (100.0)	31 (100.0)	4 (80.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Neomycin	1 (16.7)	20 (64.5)	1 (20.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Streptomycin	2 (33.3)	8 (25.8)	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Spectinomycin	2 (33.3)	11 (35.5)	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Erythromycin	2 (33.3)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Clindamycin	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Chloramphenicol	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Florfenicol	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Tilmicosin	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Doxycycline	6 (100.0)	31 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Tetracycline	6 (100.0)	10 (32.3)	5 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	0 (0.0)

cephalosporine계, qinolone계 항생제에 특히 높은 감수성을 나타내었다. 분리된 6주의 *S. equi*는 penicillin, cephalothin, enrofloxacin, sulfamethoxazole 등의 항생제에 높은 감수성을 나타내었지만, gentamycin, kanamycin, streptomycin 등의 약제에는 33.3%, neomycin은 16.7% 감수성을 나타내었으며 clindamycin에는 모든 분리주가 내성을 나타내었다. 분리된 31주의 *S. zooepidemicus*는 gentamycin (90.3%), neomycin (64.5%), kanamycin (51.6%), spectinomycin (35.3%), tetracycline (32.3%) 및 streptomycin (25.8%) 등의 항생제에 일부 분리주가 내성을 나타내었으며, erythromycin과 clindamycin에는 분리된 모든 균주가 내성을 나타내었다.

분리된 *S. equisimilis* 5주와 *S. dysgalactiae* 2주는 aminoglycoside계 항균제를 제외한 대부분의 약제에 높은 감수성을 나타내었으며, *S. agalactiae* 1주는 이번 연구에서 분리된 다른 균종과는 달리 모든 약제에 감수성을 나타내었다. 또한, 분리된 세균에 대한 약제 내성패턴을 이용한 약제 내성형에 따른 streptococci의 분류 결과 *S. zooepidemicus*는 7개의 내성형으로 분류되었으며, CcEmTe (19.4%), KmStSptEmCcTe (19.4%), KmNmStSptEmCcTe (19.4%)의 내성형이 각각 6주씩 분리되었다. *S. equi*는 3개의 내성형으로 분류

되었으며 GmKmNmStSptEmCc의 내성형이 4주 (66.6%)로 가장 높은 분리율을 나타내었다. *S. equisimilis*의 경우 4개의 약제 내성형으로 분류되었으며, KmNmStSptEmCc의 내성형이 2주(40.0%)로 관찰되었다(Table 5).

고 찰

S. equi, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae*를 포함하는 pathogenic streptococci는 말 산업과 관련된 대부분 국가에서 발생하는 세균성 호흡기질환의 중요 원인체이며 주로 신생자마에서 잘 발생하는 경향이 있으나 3세 이상의 번식말 또는 경주말에 이르기까지 다양한 연령층에서 광범위하게 발생하여 가벼운 호흡기 증상에서부터 패혈증으로 인한 폐사를 유발하기도 한다(Timoney, 2004). 기존의 연구를 따르면 *S. equi*는 말의 호흡기 질병 및 악하 림프절의 농양을 동반하는 선역의 원인체로 알려졌으며, *S. zooepidemicus*는 말의 기회감염세균으로 호흡기 감염 및 생식기 감염을 유발하며 세균성 호흡기 감염의 가장 중요한 원인체로 인식되며 전체 감염의 40% 정도가 *S. zooepidemicus*와 관련이 있는 것으로 알려졌다(Bagust, 1972; Newton 등, 2008).

이번 연구에서는 *S. zooepidemicus*가 임상증상이 없는 정상 개체에서 12.7%, 호흡기 증상을 나타내는 개체에서는 74.1%의 분리율을 나타내었으며, 이 연구에서 분리된 기타 streptococci에 비해서는 비교적 높은 분리율이 관찰되었다. 이러한 결과는 *S. zooepidemicus*가 말의 호흡기 감염 발생에 직접적 또는 간접적으로 높은 상관관계가 있을 것으로 판단된다. 따라서 말의 세균성 호흡기 질환의 효과적인 예방 및 치료를 위해서 *S. zooepidemicus*에 의한 질병발생의 역학적 특성에 대한 구체적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

한편, *S. dysgalactiae*는 드물게 말의 호흡기 감염과 림프절염, 태반염을 유발하는 것으로 알려졌으나 발병 기전 및 역학적 특성에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다(Timoney, 2004; Preziuso 등, 2010). 이번 연구에서 분리된 *S. equisimilis*는 말의 호흡기 감염 및 림프절 감염 등의 보고가 있으나 높은 빈도로 감염을 유발하는 원인체는 아닌 것으로 알려졌으며, *S. equisimilis*는 건강한 개체로부터 분리되어 감염증 발생과의 상관관계는 확인할 수 없었다. 하지만 더러브렛 암말의 생식기 내 분포세균에 관한 최 등

Table 5. Antimicrobial resistance patterns among 46 *Streptococci* isolated from Thoroughbred horse

<i>Streptococci</i>	Resistance pattern	No. of isolates (%)
<i>S. zooepidemicus</i> (31)	CcEmTe	6 (19.4)
	CcEmSt	3 (9.6)
	CcEmNm	2 (6.5)
	StSptEmCc	5 (16.1)
	KmStSptEmCcTe	6 (19.4)
	KmNmStSptEmCcTe	6 (19.4)
	GmKmNmStSptEmCcTe	3 (9.6)
<i>S. equi</i> (6)	Cc	1 (16.7)
	NmCc	1 (16.7)
	GmKmNmStSptEmCc	4 (66.6)
<i>S. equisimilis</i> (5)	-	1 (20.0)
	KmNmStSptEmCc	2 (40.0)
	GmKmNmStSptEmCc	1 (20.0)
	GmKmAnNmStSptEmCc	1 (20.0)
<i>S. dysgalactiae</i> (2)	StSptCc	1 (50.0)
	GmKmNmStSptEmCc	1 (50.0)
<i>S. agalactiae</i> (1)	-	1 (100.0)
Non-identified (1)	GmKmAnNmStSptEmCcTe	1 (100.0)
Total	18 pattern	46

Gm: gentamicin, Km: kanamycin, An: amikacin, Nm: neomycin, St: streptomycin, Spt: spectinomycin, Em: erythromycin, Cc: clindamycin, Te: tetracycline.

(2007)의 연구를 따르면 *S. equisimilis*의 경우 5.2%의 분리율을 보고한 바 있으나 병원성 유발과의 상관관계는 확인되지 않았다. 따라서 *S. equisimilis*에 의한 감염증 발생 여부에 대해서는 병원성 유발과 관계된 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

한편, 드물게 말의 호흡기 감염을 유발하는 것으로 알려진 *S. pyogenes*, *S. haemolyticus*, *S. pneumoniae* 등은 이번 연구에서는 분리되지 않았으나 이 연구에서 사용한 호흡기 증상을 나타내는 개체의 시료 수가 제한적인 한계가 있으므로 향후 세균성 호흡기 감염증상을 나타내는 말에 대한 연구에는 더 많은 개체 수를 통해 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

이번 실험에서는 상용화된 균동정 장비인 Vitek 2 system을 이용하여 균을 동정하고 각 well별 반응결과를 비교하여 생화학적 특성을 분석하였다. 이 연구에서 분리된 균종에 대한 생화학 성상에 대해 보고된 기존 연구가 없어 광범위한 생화학적 특성의 비교는 어렵지만 이 연구에서 균종별로 lactose, mannitol, raffinose, salicin, sorbitol, trehalose 분해능에서는 유의적인 결과가 관찰되었다. 특히 말의 호흡기 감염에서 가장 큰 문제가 되고 있는 *S. equi*와 *S. zooepidemicus*의 경우 lactose와 sorbitol 분해능에서 *S. zooepidemicus*는 모두 분해능이 있지만 *S. equi*는 모두 분해능이 관찰되지 않아 *S. zooepidemicus*와 *S. equi*의 감별에서 lactose와 sorbitol 분해능의 비교는 유용할 것으로 판단된다. 또한, 혈액 배지 상에서 집락의 형태가 거의 유사하여 감별이 쉽지 않은 *S. dysgalactiae*와 *S. zooepidemicus*는 sorbitol과 trehalose 분해능에서 차이가 관찰되어 균 동정에 활용 가능할 것으로 판단된다.

최 등(2007)과 Choi 등(2010)은 국내 사육 중인 말에서 분리한 세균을 대상으로 항생제 감수성 시험을 하여 말에서 분리된 대부분의 균주가 비교적 높은 항생제 감수성을 가지는 것을 보고한 바 있다. 이 실험에서 분리된 streptococci 대부분이 amikacin을 제외한 대부분의 aminoglycoside계 항생제에 비교적 높은 내성을 가지는 것으로 나타났으며, 이러한 결과를 바탕으로 약제 내성 패턴을 분석한 결과 aminoglycoside계 항생제에 다재내성을 나타내는 균주가 다수 관찰되었다. 이러한 결과를 통해서 streptococci 감염증 발생 시 치료제의 선택에 있어 aminoglycoside계 항생제의 단독 치료는 기타 항생제의 투여에 비해 비교적 낮은 치료 효과가 예상되며 약물의 분포 및 부작용 등을 고려한 기타 항생제와 aminoglycoside계 항생제의 병용 투여가 필요할 것으로 판단된다. 또한, 기타

항생제에 비해 aminoglycoside계 항생제에 비교적 내성을 나타내는 것에 대한 명확한 원인에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 한편, 동일한 tetracycline계 항생제이지만 tetracycline보다는 doxycycline에 비교적 높은 감수성을 가지는 것이 관찰되어 streptococci 감염증에 대한 항생제 치료시 doxycycline을 투여할 경우 더 높은 치료효과가 기대된다. Luque 등(2006)과 Newton 등(2008)은 말에서 분리한 streptococci의 항생제 감수성 결과를 보고하면서 β -lactam계 항균제를 이용하여 치료목적으로 우선 투여를 보고한 바 있다. 이번 실험에서도 penicillin, ampicillin, cephalothin, cefoperazone, cefepime 및 ceftiofur에 대한 감수성 조사결과 모든 분리주가 높은 감수성을 가지는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 국내사육 산업 동물 중에서 말의 경우 항생제의 사용이 제한적인 것과 관련이 있을 것으로 생각하며 치료 및 예방적 항생제 사용 시에 항생제 선택의 폭이 넓으므로 항생제 적용에 효과가 높을 것으로 판단된다.

세균성 호흡기 질병의 중요한 원인체인 *S. equi*와 *S. zooepidemicus*의 높은 분리율이 관찰된 이번 연구를 통해서 국내에서 사육 중인 더러브렛 말의 호흡기 질병을 예방하기 위해서는 가능한 이들 원인체에 의한 호흡기의 감염기회를 줄이는 것이 중요하며 말 호흡기의 면역학적 연구, 역학적 특성 연구 및 주기적인 항생제 감수성 검사를 하여 발병할 때 치료효율을 극대화하고 효과적인 예방을 할 수 있도록 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 이번 연구에서는 제주지역에서 사육 중인 더러브렛 말의 호흡기 내 병원성 streptococci의 종류 및 분리율을 조사하고 약제감수성 양상을 조사하였으며, 이 결과는 적절한 항생제 선택을 통한 말의 호흡기 감염에서 가장 문제가 되는 streptococci 감염증의 효율적인 치료 및 예방에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

결 론

2007년 5월부터 2009년 3월까지 제주지역 사육 더러브렛종 말의 비강에서 채취한 검사 대상물에서 streptococci를 분리하고 균의 동정, 생화학적 성상 및 항균제감수성 시험을 한 결과는 다음과 같다.

1. 총 113두의 말에서 6종 46주의 streptococci가 분리되었으며 균종별로 *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, 및 non-identi-

fied *Streptococci*로 분류되었다.

2. 46주의 streptococci는 6.5% NaCl 함유배지에서 성장능력이 없으며, urease, xylose, mannosidase 분해 능력이 없고, leucine, alanine, tyrosine, mannitol은 모두 분해하였다.

3. 항균제감수성시험과 결과 penicillin, ampicillin, amoxycillin/clavulanic acid, cephalothin, cefoperazone, cefepime, ceftifur, norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin 에 모두 감수성이 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품기술평가원 연구사업 (과제번호: 108175-03-1-CG000)의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- 우희연, 남명현, 이남용. 2001. 폐렴구균의 항균제 감수성 검사를 위한 VITEK-2 system의 평가. 대한임상병리학지 21: 129-134.
- 최성균, 이수길, 양재혁, 조길재. 2007. 더러브렛 씨암말의 생식기내 세균의 분포 및 항생제 감수성 양상. 한국임상수의학회지 24: 19-25.
- Alber J, El-sayed A, Lammler C, Hassan AA, Weiss R, Zschöck M. 2004. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 51: 455-458.
- Arthur RM. 1990. Respiratory problems in the racehorse. Vet Clin North Am Equine Pract 6: 179-196.
- Bagust TJ. 1972. A review of viral infections of horses. Aust Vet J 48: 520-523.
- Choi SK, Park YS, Cho KH, Cho GJ. 2010. RAPD analysis and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from thoroughbred horses. Journal of Life Science 20: 649-654.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard. 10th ed. 29, M02-A10. <http://www.clsi.org/source/orders/free/m02-a10.pdf>.
- Defang GN, Khetawat D, Broder CC, Quinnan GV Jr. 2010. Induction of neutralizing antibodies to Hendra and Nipah glycoproteins using a Venezuelan equine encephalitis virus in vivo expression system. Vaccine 29: 212-220.
- Elton D, Bryant N. 2011. Facing the threat of equine influenza. Equine Vet J 43: 250-258.
- Giles C, Cavanagh HM, Noble G, Vanniasinkam T. 2010. Prevalence of equine adenovirus antibodies I in horses in New South Wales, Australia. Vet Microbiol 143: 401-404.
- Hoffman AM, Viel L. 1997. Techniques for sampling the respiratory tract of horses. Vet Clin North Am Equine Pract 13: 463-745.
- Imagawa H, Matsumura T, Kamada M, Fukunaga Y, Hasegawa A, Ohishi H, Matumoto M. 1989. Isolation of reovirus type 3 from foals. Nippon Juigaku Zasshi 51: 652-655.
- Imperi M, Pataracchia M, Alfaroni G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. J Microbiol Methods 80: 212-214.
- Luque I, Fernández-Garayzábal JF, Blume V, Maldonado A, Astorga R, Tarradas C. 2006. Molecular typing and anti-microbial susceptibility of clinical isolates of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* from equine bacterial endometritis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53: 451-454.
- MacLachlan NJ, Balasuriya UB. 2006. Equine viral arteritis. Adv Exp Med Biol 581: 429-433.
- Mason DE, Ainsworth DM, Robertson JT. 1994. Respiratory emergencies in the adult horse. Vet Clin North Am Equine Pract 10: 685-702.
- Newton JR, Laxton R, Wood JL, Chanter N, Newton JR, Laxton R, Wood JL, Chanter N. 2008. Molecular epidemiology of *Streptococcus zooepidemicus* infection in naturally occurring equine respiratory disease. Vet J 175: 338-345.
- Preziuso S, Laus F, Tejada AR, Valente C, Cuteri V. 2010. Detection of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in equine nasopharyngeal swabs by PCR. J Vet Sci 11: 67-72.
- Pusterla N, Kass PH, Mapes S, Johnson C, Barnett DC, Vaala W, Gutierrez C, McDaniel R, Whitehead B, Manning J. 2011. Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. Vet Rec 169: 12.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 1993. Clinical Veterinary Microbiology. 9th ed. pp. 127-136. Mosby, London.
- Reed SM, Toribio RE. 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. Vet Clin North Am Equine Pract 20: 631-642.
- Stephen M, Warwick M, Debra C. 2009. Equine Internal Medicine. 3rd ed. pp. 290-313. Saunders, Philadelphia.
- Timoney JF. 2004. The pathogenic equine streptococci. Vet Res 35: 397-409.
- Whitworth JM. 1990. Lancefield group F and related streptococci. J Med Microbiol 33: 135-151.
- Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. 2005. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. J Clin Microbiol 43: 120-126.