

## 제주도내 자연발생한 말유산태아에서 PCR을 이용한 Equine Herpesvirus Type-1 검출

문 혁, 강완철, 김은주, 김진희, 고현주\*, 양재혁\*\*, 손원근\*, 이두식\*

제주도축산진흥원, 제주대학교 수의학과\*, 한국마사회\*\*

(접수 2001. 4. 3, 게재승인 2001. 4. 25)

## Detection of equine herpesvirus type-1 in naturally aborted equine fetuses in Jeju by polymerase chain reaction

Hyuk Moon, Wan-Cheul Kang, Eun-Joo Kim, Jin-Hoe Kim  
Hyun-Joo Ko\*, Jae-Hyuk Yang\*\*, Won-Geun Son\*, Du-Sik Lee\*

*Jeju Livestock Promotion Institute, Jeju, 690-802, Korea*

*Department of Veterinary Medicine, Jeju National University\*, Jeju, 690-756, Korea*

*Korea Racing Association\*\*, Kwachen, 427-711, Korea*

*(Received 3 April 2001, accepted in revised form 25 April 2001)*

### Abstract

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, one of the frequent pathogens to abortion, using polymerase chain reaction. Six fetuses to be aborted at nine to ten months in pregnancy reared in six herds were used in the study. Two primers in the PCR were made from glycoprotein B gene of EHV-1. The primers specific for EHV-1 amplified 1880 bp of PCR products from DNA extracts from thorax fluids, livers, lungs, and spleens of four in six aborted fetuses. Consequently, PCR could be applied to diagnose the abortion of EHV-1 and also confirmed to play a major role of the viral pathogen associated with equine abortion in Jeju island.

Key words : Equine, EHV-1, Abortion, PCR, Equine rhinopneumonitis.

Corresponding author : Hyuk Moon, Jeju Livestock Promotion Institute, Jeju, 690-802, Korea.  
Tel) 064-741-3550, Fax) 064-741-3572

## 서 론

말 비폐렴(Equine rhinopneumonitis: ERP)은 Herpesviridae의 Alphaherpesviridae에 속하는 equine herpesvirus(EHV)가 원인체로, 큰 말에 감염시에는 특별한 임상증상없이 내과하는 불현성 감염이 많으나, 임신말기에 태아 감염을 일으킬 경우 유산을 유발하거나 출생 후 24시간 이내에 폐사하는 경우가 많다. 어린 말에 감염시 발열, 비루의 유출과 동시에 식욕감퇴 및 악하 임파절의 종대가 일어나며 특히 연쇄상구균의 2차 감염시 기침을 동반한 인후두염, 폐렴 등을 일으킨다. 또 모든 연령과 성별에 관계없이 허약, 광증, 후구마비, 기립불능 등의 신경성 질환을 유발시킬 수도 있다. 말에서 문제시되는 herpesvirus의 아형은 EHV-1 subtype 1(EHV-1), EHV-1 subtype 2 (EHV-4), EHV-3 등으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

EHV-1(일명 F strain)은 말에 감염시 호흡기질환, 유사산, 갓난 말의 폐사, 신경증상을 일으키며, EHV-4(일명 R strain)는 대개 호흡기질환에 관여하고 있고, EHV-3는 비뇨생식기 질환을 유발함으로써 전세계적으로 말 산업에 경제적 손실을 주고 있는 것으로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. 이 질병은 Dimock와 Edwards가<sup>4)</sup> 미국 켄터키주에서 발생한 말의 바이러스성 유사산증의 보고에서, 말의 유사산증 바이러스와 호흡기 감염을 일으키는 바이러스의 성상이 동일하기 때문에 두 질병은 EHV-1에 기인된다고 증명되었으며, Doll et al<sup>5)</sup>의 제안에 따라 오늘날까지 ERP로 불리워지고 있다<sup>6,7)</sup>.

말 비폐렴의 실험실 진단은 혈청중화시험, 면역확산법, 보체결합반응, 효소면역측정법, 형광항체법 등의 혈청학적 방법과 비강분리물, buffy coat 및 유사산 태아의 조직으로부터 바이러스 분리, 전자현미경적 관찰 및 병리조직학적 검사방법 등이 있으나<sup>8,9,10)</sup>, 이 진단법들은 시간이 많이 소요될 뿐만아니라 정확하고 신속한 가검재료내 항원의 검출이 어렵다는 단점이 있다. 이를 보완하고자 근래에 분자생물학적 기법을 이용한 PCR기법이 개발되어 단기간에 신속한 검출이 가능해졌으며, 항원의 감수성과

민감성, 그리고 특이적 검출에 큰 장점이 있어 최근 진단에 많이 이용되고 있다.

한편, 현재 국내·외의 여러 연구자들에 의하여 PCR기법을 이용한 EHV-1의 검출 기술의 개발이 진행되고는 있으나 아직까지 국내에서 자연 발생된 종빈마의 유산에 대한 EHV-1의 검출 보고는 없었다. 따라서 본 연구는 최근에 유산된 말의 흉수 및 장기를 이용하여 EHV-1의 DNA를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 PCR 진단기법을 개발하고, EHV-1에 대한 민감성과 감수성을 조사하여 최근 제주지역에서 발생한 종빈마의 유산 원인을 규명하고 이에 대한 적절한 방역대책을 수립하기 위한 기초자료를 수집하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 검사재료

2001년 1월에서 2월사이에 제주지역의 말 사육농가의 EHV에 의한 유산으로 의심되는 유사산태아 6두에서 채취한 실질장기와 체내 삼출물 등을 실험에 사용하였다.

### 바이러스

독일 베를린 자유대학교 수의과대학 Dr. Ludwig으로부터 분양받은 Aust IV주를 EHV-1 양성 대조균으로 사용하였다.

### DNA 추출

유산된 새끼 말의 흉수를 비롯 삼출물과 폐, 간, 비장 등 실질장기의 검사재료와 더불어 표준 균주인 Aust IV 주로부터 QIAamp DNA mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출한 다음 끓는 물에 5분간 끓인 후에 -20℃ 냉장고에 보관하였다.

### Primer제작

EHV-1의 감염을 확인하기 위한 PCR primer는 Borchers와 Slater<sup>11)</sup>가 보고한 primer를 사용하였다. EHV-1의 glycoprotein B중에서 EHV-1에 특이적인 1869~1888 nucleotide sequence인

5'-TCTACCCCTACGACTCCTTC-3'를 Forward Primer로 사용하였고, 3749~3768 nucleotidesequence인 5'-GCTTTCTTTTCCTGCTTTTC-3'를 Reverse primer로 사용하였다. 예상되는 PCR 산물의 크기는 1880bp이었다.

#### Polymerase chain reaction

EHV-1 DNA를 증폭하기 위한 PCR은 Borchers와 Slater<sup>11)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 간단히 기술하면, PCR용 premix(40 mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250 $\mu$ m dNTP, 2.5U Taq DNA polymerase, Bioneer)에 43 $\mu$ l PCR grade sterile water, 1 $\mu$ l forward primer, 1 $\mu$ l reverse primer, 5 $\mu$ l DNA를 첨가하여 총 용량이 50 $\mu$ l가 되도록 하여 PCR을 실시하였다. PCR의 반응 조건은 pre-denaturation을 94 $^{\circ}$ C에 4분간 실시한 다음, 94 $^{\circ}$ C에 2분, 56 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C에 2분씩 33회를 반복한 후, post-extension을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하였다. 모든 PCR은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer 9600, USA)에서 반응시켰다.

#### PCR 증폭산물의 확인

PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 10 $\mu$ l의 PCR 산물을 TAE(0.04M tris-acetate, 0.001M EDTA, pH8.0) buffer를 running buffer로 하는 2% agarose gel에 loading 한 후 100V에서 30분간 mini-gel electrophoresis unit에서 전기영동한 다음 ethidium bromide (EtBr, 0.5 $\mu$ g/ml) 용액으로 염색하여 UV transilluminator로 특이적인 증폭산물의 band를 확인하였다.

### 결 과

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

EHV-1의 표준주인 Aust IV와 유산된 말의 흉수에서 추출한 DNA에서 약 1880bp의 EHV-1의 glycoprotein B gene에 특이적인 유전자 증폭산물이 관찰되었다. 유산된 6두의 말흉수에서 추출한 DNA중 4두에서 EHV-1에 특이적인 PCR 산물이 검출되었으나, 나머지 2두에서는 band가 검출되지 않아 75%(4두/6두)의 양성율을 보였다(Fig 1).

Table 1. Main clinical history of pregnant mare with abortion used

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

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

\*\* Not detected.

EHV-1에 기인된 유산을 증명하기 위한 효과적인 시료채취 부위를 선정하기 위하여 흉수 이외에 일부 실질장기로부터 DNA를 추출하여 PCR 분석한 결과는 표 2에서와 같다. 흉수의 예도 간, 폐, 비장에서도 동일한 크기의 EHV-1 특이 PCR 산물이 관찰되었으며, PCR 산물의 육안적인 양은 간, 흉수, 폐에서 유사하였으나, 비장에서는 다소 낮은 농도를 나타내었다. 그리고 흉수에서 PCR 음성이었던 유산 태아는 다른 장기에서도 음성을 나타내었다.

### 고 찰

전 세계적으로 분포되어 말 산업계에 큰 경제적 손실을 초래하는 EHV에 대한 국내의 연구는 Bak 등(1981)<sup>12)</sup> 서울경마장의 말 유산

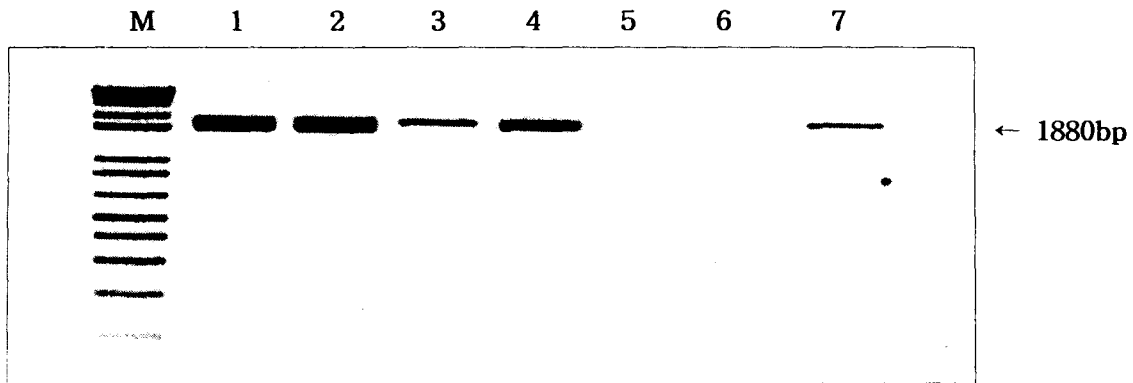


Fig 1. PCR products of purified chromosomal DNA extracts obtained from thoracic fluids of aborted fetuses and from reference strains of EHV type-1. PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, molecular size standard(1-kb DNA ladder : US 73321) ; Lane 1, positive control (AustIV) ; Lane 2 to 7, fluid of thorax.

Table 2. Amounts of PCR products of equine herpesvirus-1 against different materials collected from aborted fetuses

Case No	Amounts of PCR product			
	Liver	Hydrothorax	Lung	Spleen
1	+++	+++	+++	++
2	+++	+++	+++	++
3	+++	+++	+++	+++
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	+++	+++	+++	+++

+++ , abundant signal ; ++ , moderate ; + , weak signal ; - , negative signal.

태아 6두에서 병리조직학적으로 조사하여 국내에서도 EHV의 감염에 기인된 유산이 있음을 처음으로 보고한 바 있으나, 병인학적으로는 확인이 되지 않았다. 이 등(1986)<sup>13)</sup> 중화시험법을 이용하여 실시한 결과, 서울지역 말은 614두중 72두(11.7%), 제주지역의 말은 423두중 103두(24.3%)에서 EHV에 대한 항체를 보유한 것으로 보고하였고, 조 등은(1994)<sup>14)</sup> 서울 및 제주지역에서 사육중인 말 혈청 651두에 대한 ELISA와 중화시험법을 이용하여 EHV-1

의 항체 양성율이 각각 539두(82.8%)와 524두(80.5%)임을 보고하면서 양성으로 판정된 유산 말에서 바이러스 2주(LC1과 LC2)를 분리한 바 있다.

한편 Sugiura et al은<sup>15)</sup> 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 EHV-1가 말에서 가장 문제시되는 바이러스성 병원체중의 하나라고 주장한 바 있다.

이렇듯 국내의 보고에서 볼 수 있듯이 EHV-1감염증이 말에 중요한 질병임에도 불구하고 국내 실정에 맞는 진단방법이나 예방에 대한 연구가 미비한 실정이다. 그러나 최근 분자생물학적으로 PCR기법을 이용한 EHV-1의 진단법이 광범위하게 연구되고 있다<sup>16,17)</sup>. 따라서 본 연구에서도 국내 말 산업에 막대한 영향을 미치는 EHV-1을 신속하고 정확하게 진단하는 방법을 확립하여 질병의 전파를 빠른 시간내에 차단하고자 PCR기법으로 임신마의 유산 원인을 규명하였다. 그 결과 EHV-1의 glycoprotein B gene primer를 사용하여 실시한 PCR에서 유산된 말 태아 6두의 흉수중 4두에서 EHV-1에 특이적인 DNA의 증폭을 확인 할 수 있었고, 폐, 간, 비장에서도 동일한 결과를

얻을 수 있었다. 이는 국내에서 여전히 EHV-1에 기인한 유산이 다발하고 있음을 보여주며 본 실험에서 적용한 PCR 기법은 EHV-1에 의한 유산을 조기에 진단하는 데 널리 활용할 수 있음을 나타낸다.

각종 장기에서 나타난 PCR 산물의 증폭 정도는 유사하였는데 이는 EHV-1이 태아에 감염 시 거의 모든 실질장기로 전파됨을 보여주고 있으나<sup>18)</sup>, 본 질병을 PCR로 진단하거나 원인 바이러스를 분리하기 위하여 유산 태아의 흉수, 간 및 폐조직의 유체를 사용하는 것이 적당할 것으로 사료된다<sup>14)</sup>. 유산 말 태아의 6두중 4두는 EHV-1의 감염으로 확인되었으며 나머지 2두는 동일한 원인체의 감염으로 인한 유산으로 의심되었으나 PCR에서 음성을 나타내었다. 또한 세균 및 곰팡이에 대한 검사를 시도하였지만 모두 음성이어서 원인체를 규명할 수 없었다. 따라서 이들의 유산이 또다른 원인에 의해서 일어난 것인지 아니면 항원 DNA추출법과 관련이 있는지는 차후의 연구과제라 생각한다.

한편, 말 비폐렴의 예방은 백신접종을 통하여 이루어지며 국내에서 사용하고 있는 백신은 임신마에 있어서 임신 5, 6개월 및 7개월에 3회 접종해야 하는 번거로움이 있다. 이번 유산된 말 농장의 백신투여 횟수를 조사한 결과 공통적으로 1회만 투여했으며, 유산이 다발한 농장들이 서로 인접해 있는 것으로 조사되었다. 따라서 앞으로 EHV-1에 의한 유산피해를 줄이기 위해서는 사용중인 백신의 철저한 추가접종이 되어야 하겠으나 국내에서 분리된 바이러스를 사용한 유용한 백신의 개발이 시급하게 이루어져야 할 것이라 사료된다.

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

## 결 론

임신마의 유산을 일으키는 원인 바이러스로

막대한 영향을 미치는 EHV-1을 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 glycoprotein B 유전자를 증폭하는 PCR기법으로 표준균주 및 야외 유산태아의 검사재료에 대해 진단을 실시한 결과 검사의뢰된 6두중 4두에서 1880bp의 EHV-1의 DNA 특이분절이 확인되었을 뿐만 아니라, 유산된 4두의 태아에서 채취한 흉수, 간, 폐, 비장에서 표준균주와 동일한 항원유전자의 증폭을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Vail CD. 1993. Herpesvirus infection of horse. *Equine practice* 15:19~22.
2. Jackson T, Kendrick JW. 1971. Paralysis of horse associated with equine herpesvirus 1 infection. *J Am Vet Med Assoc* 158:1351~1357.
3. Matsumura T, Smith R1, O'Callaghan DJ. 1993. DNA sequence and transcriptional analysis of the region of the equine herpesvirus type 1 kentucky A strain genome encoding glycoprotein C. *Virology* 193:910~923.
4. Dimock WW, Edwards PR. 1933. Is there a filterable virus of abortion in mares *Ky Agr Exp Sta Bull* 297~301.
5. 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.
6. Duxbury AE, Path Mc, Dixer DT. 1968. Isolation of equine rhinopneumonitis virus from an epidemic of acute respiratory disease in horses. *Aust Vet* 44:58~63.
7. Telford EAR, Watson MS, McBride K, et al. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189:304~316.
8. Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, et al. 1992. Serological detection of equine

- herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet J* 8(2) : 58~65
9. Abodeely RA, Lawson LA, Randall CC. 1970. Morphology and entry of enveloped equine abortion virus. *J Virol* 5:513~523.
  10. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, et al. 1993. An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by equine herpesvirus 1. *Equine Vet J* 25 : 36~40.
  11. 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.
  12. Bak UB, Lim CH, Kang BH. 1993. A pathological survey on equine viral rhinopneumonitis occurred in Korea. *Korean J Vet Res* 21 : 11~19.
  13. 이영옥, 허영, 박봉균. 1986. '85년도 마필 전염병 검진사업 실시결과 보고서. *대한수의사회지* 22 : 51~56.
  14. 조길재, 김봉환, 이두식, 오문유, 고미희. 1986. "국내 말로부터 비페럼바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구 I, II, III" *대한수의학회지* 35(4) : 735~758.
  15. Sugiura T, Matsumura T, Hirano S. 1988. Field surveillance of equine herpesvirus type 1 infection in racehorse by agar gel immunodiffusion test. *Bull Equine Res Inst* 15~19.
  16. 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).
  17. R. Carvalho, A. M. Oliveira et al. 2000. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Arch Virol* 1773~1787.
  18. Catherine Walker et al. 1999. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1(EHV-1) infection in the horse and the mouse model. *Veterinary microbiology* 3~13.