

제주도내 유산자마에서 마비페렴 바이러스 4의 분리

김두남, 이두식, 손원근*

제주대학교 수의학과

Isolation of Equine Herpesvirus Type-4 from Aborted Fetuses of Horses in Jeju

Doo-nam Kim, Du-Sik Lee, Won-Geun Son*

Dept. of Veterinary Medicine, College of Applied Life Sciences, Cheju National University

ABSTRACT : Equine Rhinopneumonitis(ERP) is a major disease of horse's abortion and respiratory disease in worldwide. ERP has made big economic losses in horse breeding farms of Jeju island. This study indicates that equine herpesvirus type-4 (EHV-4) has played an important role in abortion of horses. To isolate the virus, spleen and liver samples were collected from the aborted fetuses and inoculated into MDBK-cell after preparation of tissue extracts. In the cell line, viral cultures were observed by cytopathic effect and EHV-4 gB gene was amplified by polymerase chain reaction. The PCR product showed a 580bp in size, indicating specific to EHV-4.

열, 비루의 분비와 식욕감퇴 및 악하 임파절의 종대가 일어나며, 세균 특히 연쇄상구균의 2차 감염 시 기침을 동반한 인후두염, 폐렴 등을 일으키며, 임신마에 감염 시 유·사산을 일으키고 태아에게 치명적인 손상을 주는 질병이다.

이 질병은 Dimock 과 Edwards(1933)가 미국의 켄터키 주에서 말의 바이러스성 유산 증으로 보고하였고, 말의 유산 증 바이러스와 호흡기 감염증의 원인체가 서로 다른 것으로 인식되기도 하였으나 그 후 두 증세에서 분리된 바이러스의 성상이 동일하여 equine herpesvirus 에 의해 호흡기 증상 및 유산이 일어날 수 있음이 증명되었다. 따라서 본 바이러스에 대한 감염증은 말 비 폐렴(equine rhinopneumonitis: ERP)으로 불려지고 있다(Duxburyed, 1968; O'Callaghan 등, 1983; Timoney 등, 1988; Telord 등, 1992)

EHV는 dsDNA 바이러스로서 핵내 봉입체를 형성하고, 사람을 비롯한 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 subtype1은 EHV-1로 subtype2는 EHV-4로 불려지며, 그 외에 EHV-3는 다른 항원 특성을 가지는 strain으로 분류되고 있다(Vail, 1993) .EHV-4는 말에 감염 시 호흡기 질환에 관여하고 있고, EHV-1은 호흡기 질환

서 론

말의 비페렴 (equine rhinopneumonitis)은 Herpesviridae의 alphaherpesviridae에 속하는 herpesvirus가 일으키는 바이러스성 전염병으로 성마에는 큰 영향이 없으나 자마에 감염되었을 경우에는 말

Corresponding author: Won-Geun Son, 제주시 아라1동 1번지 제주대학교 Tel : 064-754-3373
E-mail : wonson@cheju.ac.kr

및, 유·사산, 자마의 폐사 및 신경증상을 일으키며, EHV-3는 비뇨생식기 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다(Jakson 등, 1971; Henry 등, 1981)

말 비폐렴에 대한 실험실 진단은 혈청중화시험, 면역확산법, 보체 결합반응, 효소면역측정법, 형광항체법과 단 클론 항체를 이용한 ELISA방법 등의 혈청학적 방법과 비강분비물, buffy coat 및 유산 태아의 조직으로부터 바이러스 분리, 전자 현미경적 관찰 및 병리조직학적 검사방법이 있다(Hartley 등, 1979; Masumura 등, 1992) EHV는 대개 감염된 말의 인두, 폐, 태반, 신장, 부고환, 하악하, 서혜림프절, 비즙, 유산 태아의 조직에서 분리가 용이하며 가끔 위 내용물에서도 분리된다(Telord 등, 1992). EHV-4와 EHV-1은 주로 equine fetal kidney cells 혹은 RK2 rat kidney cell에서 분리하며 두 바이러스는 유사한 세포변성을 일으킨다. EHV-4는 EHV-1과 공통항원(260kD, 87kD)을 가지고 있기 때문에 감별 진단하기가 어려워 초기에는 하나의 질병으로 인식하거나 복합감염을 일으키는 것으로 생각되었다.

그러나 두 바이러스를 감별하기 위한 단클론 항체가 보고 된 바 있고 O'Keefe 등(1991)과 Welch 등(1992)은 restriction endonuclease digestion 에 의해 EHV-1과 EHV-4의 gB gene을 구분하였고, 최근에는 바이러스의 분리배양을 하지 않고 가검물에서 직접 항원을 검출하여 두 type 의 바이러스를 감별하는 연구가 다각도로 진행되고 있다. Kirisawa 등(1993)은 EHV-1과 EHV-4의 gB gene의 DNA가 83% 정도의 상동성이 있지만 nested primer를 이용한 PCR에서 잠복바이러스를 검출 할 수 있었고, nested PCR이 first PCR보다 1000배 정도 민감성이 있다고 보고하였다. 또한 Borcher 등(1993)도 nested PCR기법이 EHV-1과 EHV-4에서 first 보다 각각 100배와 1000배정도 더 민감성이 있다고 보고하였다.

1992-1995년 국내 말 생산 및 사육농가에 대해 질병발생 상태를 조사한 결과 말에서는 산통, 감기, 폐렴 등 소화기 및 호흡기성 질병으로 손해를 많이 보고 있으며 산과 질환의 경우 유 사산의 약 30%가 질병에 기인하여 폐사 된다. 그리고 1970년대 후반에 국내의 말에서 비 폐렴의 발생이 확인된 바 있으나, 그 원인체

인 말 비 폐렴 바이러스에 대한 국내 연구는 거의 없으므로 이 질병에 대한 연구가 시급히 요구되고 있다. 따라서 본 실험은 말에서의 큰 경제적 손실을 일으키는 말의 비폐렴의 원인체인 EHV-4를 감염 조직으로부터 분리해내고, PCR와 CPE법을 통해 빠르게 진단하여, 제주마에 대한 말의 비폐렴의 확산을 저지하는데 있다. 그리고 감염마를 신속히 밝혀내, 적절한 방역대책과 치료진행을 수립하는데 그 의의가 있다.

재료 및 방법

검사재료: 2003년 12월 말 비폐렴 증상을 나타내어 제주대학교 수의학과 미생물학 교실에 병성감정 의뢰된 자마의 폐와 비장조직 절편을 이용하였다. 무균적으로 채취된 조직을 분쇄하여 항생제와 항진균제가 첨가된 D-MEM배지(Gibco, USA)에 10% 유제액을 만들어 2500rpm에서 20분간 원심분리하여 바이러스가 부유된 후 micro filter(0.2 μ m)에 여과하여 사용하였다.

바이러스 배양: 표준주는 독일 베를린 자유대학교 수의과 대학 Dr.Lugwig로부터 분양받은 T252주를 EHV-4의 감별을 위한 양성 대조군으로 사용하였다. 소 신장유래의 MDBK-cell을 이용하였다. 세포가 배양된 플라스크로부터 배지를 제거한뒤 적당량의 바이러스를 접종하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간동안 흡착시킨 다음, 우태아 혈청(Jeil biotechservice Inc.) 과 MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 50X lactalbumin을 각각 5%, 1%, 1%를 첨가하여 배양한 다음 CPE가 70~80%정도 나타나면 감염세포를 얼린 다음 해동하는 과정을 3회 반복하고 8000rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 영하70 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였다.

DNA추출: 환축의 폐와 비장에서 채취한 시료와 표준주인 T252주를 QIAamp mini kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출한 다음 끓는 물에 5분간 정치 한뒤 영하 20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

Primer 제작: EHV-4의 확인을 위해 PCR primer

를 제작하였다. Primer는 Moon등이 2001년에 보고한 primer조합을 이용하였으며, EHV-4에 특이적인 glycoprotein B gene에 특이적인 Nucleotide sequence를 사용하였다

PCR: DNA를 증폭하기 위한 PCR의 반응조건은 PCR용 premix(40mM KCl, 10mM tris-HCl (pH9.0), 1.5mM MgCl₂, 250µg dNTP, 2.5U Taq DNA polymerase, Bioneer)에 DEPC 43µl를 첨가한 것에, forward primer, reverse primer 각 1µl를 첨가하고 5µl의 DNA를 첨가하여 총용량이 50µl가 되도록 만든후 PCR을 실시 하였다. PCR의 반응조건은 Pre-denaturation: 94°C 4 분, denaturation: 94°C 2 분, annealing: 58°C 2 분 extension: 72°C 2 분씩 33cycle을 반복한 후 post-extension 72°C 10 분 실시하였다 (Gene PCR system 2400, Perkin Elmer 9600, USA)

전기영동: PCR산물을 확인하기 위하여 100bp ladder를 5µl 넣고 PCR product를 10µl씩 loading 한 후 TAE(0.04M tris-acetate, 0.001M EDTA, pH8.0) buffer를 running buffer로 하는 2% agarose gel에 loading 한후 100V에서 30분간 mini gel electrophoresis unit(MUPID-2)에서 전기영동을 실시한 뒤 EtBr용액(0.5 µg/ml)으로 염색한 후 UV transilluminator로 EHV-4에 특이적인 gB gene에 대한 관찰을 하였다.

결 과

제주도내에서 말 비페럼증상으로 의심된 자마에서 채취한 폐와 비장조직에서 EHV-4를 감별하기 위해 조직 유제액을 제작하여, EHV-4에 민감성이 있는 MDBK-cell 에 접종한 결과 세포변성효과가 관찰되었다. 세포변성효과가 관찰된 세포에서 해동과 동결과정을 3회 반복하여 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 바이러스 부유액에서 DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다.

자마의 폐와 비장에서 채취한 시료를 MDBK-cell에 접종하여 분리한 바이러스를 EHV-4의 특이적인 gB gene을 목적으로 하는 primer인 P(3), P(4)을 조합하여 얻어낸 결과는 Fig.1과 같다. 두 자마에서 채취한 비장과 폐의 DNA를 이용하여 각각의 primer에 의해 나타난 PCR결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 EHV-4의 표준주인 T252와 같은 580bp를 나타내었다. 각각의 시료에서 별다른 비특이 반응은 나타나지 않았고 Band의 색도 비교적 균일하게 나타난 것으로 보아 바이러스의 분포의 차이가 그리 크지않은 것으로 생각해 볼 수 있다. 즉 채취된 조직에서 EHV-4가 양성을 나타내었다.

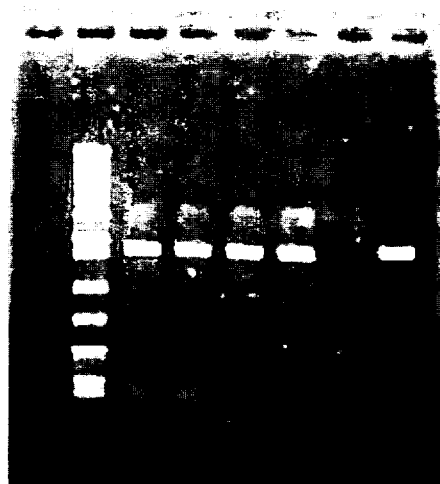


Fig. 1. Amplification of gB gene fragment of Equine Herpesvirus-4 by PCR. Lane 1: 100bp ladder, lane 2: horse1 lung, lane 3: horse1 spleen, lane 4: horse2 lung, Lane 5: horse2 spleen, lane 6: cell control, lane 7: T252(reference strain)

PCR을 통해 EHV-4로 판명된 바이러스 부유액을 단층의 MDBK-cell에 접종하여 바이러스가 일으키는 특이적인 세포변성효과를 볼 수 있었고, 떨어져 나간 세포조각도 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2).



Fig. 2. Cytopathic Effect(CPE) of Equine Herpesvirus-4 isolates in MDBK-cell. $\times 100$

고 찰

EHV는 말의 비폐렴을 일으키는 원인체로써, 1981년 국내에서 Bak 등이 말의 비폐렴의 발생을 처음으로 보고 하였다. 제주지역의 경우 이 등(1986)이 혈청 검사를 실시하여, 제주마의 양성률이 24.3%라고 보고한적 있으며, 1995년 조 등이 제주내 EHV의 양성률이 80.5%임을 발표한바 있다. 최근 EHV가 Vail 등(1993)에 의해 EHV-1과 EHV-4로 분류되었고, PCR기법을 이용한 이들의 구분법이 광범위하게 연구되고 있는 (Turtinen & Allen, 1982; Sharma 등, 1992; R. kirisawa 등, 1993; McCann 등, 1995; Carvalho 등, 2000) 가운데, 문 등(2001)이 Borchers와 Slater 방법에 준하여 여러 primer를 조합하여 가장 민감성이 있는 진단법을 제시한 바 있다.

본 실험은 지금까지 알려진 Primer조합을 통하여 제주지역의 말에 심각한 손해를 입히며, 임신마에 감염시 유사산을 일으켜 경제적으로 많은 피해를 안겨주고 있는 말의 비폐렴을 신속하고 빠르게 진단해내어 초등대응을 신속하게 하고 아울러 치료와 예방을 효과적으로 확립하고자 하였다. 그리하여 MDBK-cell을 이용하여 의심 축으로부터 virus를 분리해 낼 수 있었고, PCR기법을 통해 EHV-4를 진단해 낼 수 있었다.

말의 비폐렴 바이러스는 태아에 감염시 거의 모든 실질장기로 전파되는 것으로 알려져 있고, 내부장기의

친화성도 아주 높아서 감염이 성립되면 광범위하게 걸쳐서 바이러스가 검출되는 것으로 알려져 있다 (Catherine Walker 등, 1999) 본 실험에서도 채취한 말의 폐와 비장에서 빠짐없이 바이러스가 검출되어 이를 단적으로 나타내 주었다.

EHV에 의한 말 비폐렴은 방역대책은 주로 백신에 의해서 이루어지고 있다. 백신의 적용은 임신마에 이루어지는데 임신 5개월, 6개월, 7개월에 각각 투여를 하여 총 3회 예방접종을 하고 있다. 그러나 이도 제대로 행하여지지 않아서 질병이 지속적으로 발생하고 있으며, 국내에서 분리된 바이러스로 된 백신은 현재로는 없는 실정이다. 그나마 존재하는 백신도 3회에 걸쳐서 놓아야 하기 때문에 1~2회 접종을 하고선 추가접종이 제대로 이루어지지 않고 있다. 그리하여 본 질병은 지속적으로 발생하고 있으며 지금도 여전히 말의 산업에 커다란 손실을 끼치고 있는 현실이다.

바이러스의 특성상 전파속도가 빠르고 치료가 쉽지 않으므로, 무엇보다도 질병이 의심되는 환축을 빠르게 진단하여 그에 따른 적절한 방역대책을 세우는 것이 중요하다. 그리고 국내에서 원인체를 분리하여 쉽게 적용할 수 있는 백신을 생산하여 공급하는 것이 요구되어지며, 사육농가에 대한 철저한 교육도 필요하다. 바이러스의 감염이 심하게 나타나는 폐와 비장조직을 통해 EHV를 분리해 내고 PCR을 통해 진단함으로써 질병에 대한 대응시간을 최대한으로 단축시킬 수 있고, 나아가 말비폐렴의 전파억제에 큰 도움이 될 것이라 생각된다.

요 약

제주도내에서 비폐렴 증상으로 의뢰된 자마 2두에서 채취한 폐와 비장 조직으로부터 EHV-4를 감별하기 위해 gB gene에 대해 민감성이 있다고 밝혀진 primer를 이용하여 PCR을 실시하고 MDBK-cell을 이용한 CPE를 관찰하였다.

1. 채취한 시료로 생성한 유제액을 통해 EHV의 존재 여부를 알아내기 위해 3회 계대한 MDBK-cell에 바이러스를 접종한 결과 CPE가 확인되었다.

2. CPE를 나타낸 MDBK-cell에서 순수한 바이러스를 분리해내기 위해 -70 freezer와 상온에서 동결과 해동을 3회 반복한 뒤 8000RPM에서 10분간 원심분리 하여 바이러스가 들어있는 상층액을 분리하였다.
3. 얻어진 상층액에 EHV-4에 특이적인 gB gene을 목적으로 하는 EHV-4(P3), EHV-4(P4)의 primer를 이용하여 증폭 하였을때 민감도가 높은 PCR product가 자마2두의 비장과 폐에서 모두 관찰되었고, 이는 EHV-4의 표준주인 T252와 같은 580bp의 band를 나타내었다.
4. PCR로 존재가 밝혀진 상층액을 MDBK-cell에 접종 하였을 때 EHV-4의 특이적인 CPE 모습을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 제주도내에서 발생한 시료로부터 바이러스를 분리, 동정하는데 성공하였고, 분리된 바이러스를 통해 PCR과 CPE를 실시한 결과 EHV-4의 특이적인 유전자를 확인할 수 있었고, CPE가 확인되었다. 이를 통해 EHV-4의 분리와 확인이 바르게 이루어 졌으며, 비교적 빠른 시간에 말의 비페럼을 감별 할 수 있었다.

참고문헌

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

Dimock, W.W., Edwards, P.R., 1933. Is There a filterable virus of abortion ion mares. Ky. agr. sta. bull. 297-301.

Duxbury, A.E. path Mc and Dyer, D.T. 1968. Isolation of equine rhinopneumonitis virus from an epidemic of acute respiratory disease in horses. Aust VET

J. 44:58-68.

Jackson, T and Kendrick, J.W. 1971. Paralysis of horse associated with equine herpesvirus 1 infection. Jam Vet Med assoc. 158: 1351-1357.

Matsumura, T., Smith Rl and O'Callaghan, D.J. 1993. DNA sequence and transcriptional analyses of the region of the equine herpesvirus type1 kentucky A strain genome encoding glycoprotein C. Virol.: 193: 910-923.

O'Callaghan, D.J. Hartry, R.N. 1993. Equine herpesviruses: encyclopedia of virology. Academic press. 1:423-429.

Sharma, P.C., Cullinane, A.A., Onions, D.E., et. al. 1992. Diagnosis of equine herpesvirus-1 and 4 by polymerase chain reaction. Equine Vet J. 24(1): 20-25.

Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., et. al. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and infectious Diseases of Domestic Animals. 8th. Comstock Publishing Associates. p591- 614.

문혁 중합효소 연쇄반응 기법에 의한 Equine Herpesvirus Type-1과 Equine herpesvirus type-4의 감별 제주대학교 대학원. 2002: 4-22.

이영옥, 허영, 박봉균. '85년도 마필전염병 검진사업 실시결과 보고서. 대한 수의사회지 1986. 22: 51-56.

조길재, 김봉환, 이두식, 오문유, 고미희. 1995. 국내 말로부터 비페럼바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구 대한수의학회지. 35:735-758.