

Characteristics on Equine Herpesvirus Type 3 from Korea

Jaehyuk Yang¹ and Yoon-Kyu Lim^{2*}¹Jeju Race Park, Korea Racing Authority, Jeju 690-794, Korea²College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received May 11, 2011 / Revised July 28, 2011 / Accepted July 28, 2011

Equine coital exanthema caused by equine herpesvirus type 3 (EHV-3) is a venereal disease which seriously drops horse reproduction rates. Here, we isolated EHV-3 from infected horses and investigated their biological characteristics. Initial cytopathic effects such as rounding of cells were detected 48 hours post infection of the virus into RK-13 cells. The infected cells were going to detach from the surface of culture flasks 72 hours post infection. The type of isolated viruses from swabbed samples was EHV-3 by PCR analysis. Glycoprotein G (gG) of isolated EHV-3 has a 99.25 percent similarity rate to that of EHV-3 334/74 control strain. The isolated EHV-3 was named Georo strain. Georo strain consisted of four major proteins including 145 kD, 60 kD, 45 kD and 40 kD, as shown by SDS-PAGE analysis. We hope the newly isolated Georo strain of EHV-3 can be used for studying various aspects of Korean equine coital exanthema.

Key words : Characteristics, equine coital exanthema, equine herpesvirus type 3, Korea

서 론

Equine herpesvirus type 3 (EHV-3)는 말[馬]에서 생식기질 병 중의 하나인 말구진(equine coital exanthema)을 유발하고 말산업에 치명적인 악영향을 끼치는 매우 중요한 병원체이다[19]. 말구진은 일반적으로 교배를 통한 생식기 접촉으로 전파되지만 말을 관리하는 과정 중의 접촉, 파리와 같은 곤충, 직장 검사용 장갑, 의료기구 등의 매개물 및 비말감염으로도 전염이 가능하고 수의사에 의해서도 전파된다[23]. EHV-3는 생물학적 특성에 근거하여 herpes simplex virus처럼 Alphaherpesvirinae의 varicellovirus 속(屬)에 속하고, 동물의 신체 이외의 장소에서는 생존하기가 어렵다[23,24]. Genome 은 96.2±0.48 MDa를 함유하는 linear double stranded DNA이고 크기는 148 kb이며 염기구성은 G+C 함량이 66 mol%로서 각각 57 mol%인 EHV-1, 2, 4 및 5에 비해서 가장 높다[18,23]. EHV-3가 암말의 질의 점막표면에 심한 병변을 발생시키지만 생식기도(reproductive track)의 상피표면에는 병변이 없다는 데 이는 바이러스의 온도민감도와 연관된 것으로 알려져 있다[11]. 세포배양에서, 39°C 이상의 온도는 EHV-3의 복제를 허용하지 않지만 34°C에서는 바이러스를 최대로 획득할 수 있다. 이는 EHV-3가 viremia를 유발하지 않고 또한 자연감염에서의 유산과 연관이 없는 이유를 설명해준다[10]. EHV-1은 말, 사람, 원숭이, 토끼, 햄스터 및 마우스 유래세포에서 증식하지만 EHV-3는 말 유래세포에서만 증식한다[22].

국내에서 EHV-1에 대한 보고[3]는 있었으나 처음으로

EHV-3에 의한 말구진이 발생하였고(Fig. 1), 말 생산농가에 경제적 피해를 입혔으나 다행히 원인바이러스 분리에 성공하였다. 본 논문은 EHV-3의 특성을 파악한 후 향후 기초연구에 응용하기 위하여 배양세포접종을 통한 증식여부를 관찰과 바이러스의 gG protein을 coding하는 DNA Sequencing 분석을 통한 표준주와의 상동성(homology)의 조사 및 전기영동을 통한 단백질의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스 배양

세포배양

토끼 신장유래 RK-13 cell (ATCC 174)을 10% FBS, penicillin (100 IU/ml), streptomycin sulfate (100 µg/ml), amphotericin B (2.5 µg/ml), 0.1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5 g/l sodium bicarbonate가 첨가된 α-MEM, 플라스틱 배양병(Corning, Mexico)을 이용하여 5% CO₂ 분압, 37°C 환경 하에서 배양하였다.

바이러스 배양 및 분리정제

위의 세포를 배양하여 계대 24시간 후에 약 80% sheet를 확인하고 변병에서 채취한 면봉을 α-MEM에 담근 후 배지 1 ml를 접종하여 세포가 변성, 탈락되는 것을 확인 하였다. 바이러스의 회수는 배양병을 동결과 해동을 3 회 반복하고, 8,000×g 30 분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 20,000 rpm에서 2시간 동안 고속원심분리를 실시하였다. 고속원심분리를 통해 얻은 침전물은 phosphate buffered saline (PBS)에 하룻밤 동안 다시 부유시키고 sucrose gradient ultra centrifuge

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3367, Fax : +82-64-754-3354

E-mail : yklim@jejunu.ac.kr

(SGUC, 148,000× g)를 2 시간동안 실시하여 바이러스를 정제하였다. 회수된 분획은 당도계를 이용하여 당도를 확인하고 PCR을 통해 type을 확인한 후 각 실험에 사용하였다.

PCR 분석

QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 제한회석방법으로 EHV-3 DNA를 추출하였다. 감별진단을 위하여 EHV-1 및 EHV-4의 primer는 Borchers와 Slater [1]의 방법으로 제작하였고 glycoprotein B (gB)의 특이적인 nucleotide sequence를 사용하였다. 그리고 EHV-3를 확진하기 위하여 primer는 Hartley 등[9]의 방법으로 제작하였고 glycoprotein G (gG)의 특이적인 nucleotide sequence를 사용하였다(Table 1). PCR primer x (2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 μM Taq polymerase, 0.5 unit, Bioneer, Korea)에 PCR grade sterile water, 0.4 μM의 forward primer와 reverse primer를 각각 1 μl, 5 μl DNA를 첨가하여 총용량이 50 μl가 되도록 하였다. Cycling은 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 수행하였다. Initial denaturing은 95°C에서 10 분간 반응시키고 denaturation은 95°C에서 1 분, annealing은 60°C에서 1 분, extension은 72°C에서 1 분씩 40 cycles 하였으며 final extension은 72°C에서 10 분간 실시하였다.

PCR로 증폭된 products 10 μl를 TAE (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0) buffer를 running buffer로 하는 2% agarose gel에 로딩 후 100 mV, 30 분간 mini-gel electrophoresis unit(MUPID-2)에서 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, 0.5 μg/ml)로 염색하여 UV transilluminator로 EHV-3의 gG gene에 대한 증폭산물의 크기를 관찰하였다.

DNA 염기서열분석

Cell에서 분리한 EHV-3 gG의 DNA 염기서열 분석은 ABI 3730XX (Big Dye Chemistry, USA)를 이용하였으며 미국립보건원 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에 등록되어 있는 EHV-3 334/74 strain과 비교하였다.

단백질 분석(SDS-PAGE)

SDA-polyacrylamide gel을 제조하기 위한 시약은 SDS-PAGE를 위해 Laemmli [14]의 방법을 이용하여 Table 2와 같이 준비하였다. Separating gel은 Table 3과 같이 조성하

Table 1. Nucleotide sequence of primers

Primer (P)	Sequence (5-3)	Position
EHV-1	TCTACCCCTACGACTCCTTC	1869
EHV-1	GCTTTCTTTTCCTGCTTTTC	3749
EHV-3	GCGCTCTCTCGGCCTTGCCAG	792
EHV-3	GCGTCTCGAAAAGCGAGAG	1309
EHV-4	TCTATTGAGTTTGCTATGCT	1974
EHV-4	TCCTGGTTGTTATTGGGTAT	2906

여 APS와 TEMED를 혼합하고 gel plate에 분주하였다. Palte와 glass plate 사이에 기포발생 없이 분주하고 well의 끝에서 1 cm 정도의 stacking gel을 위한 공간을 남겨두고 DDW를 채워서 gel이 수평이 되게 하였다. Separating gel이 굳은 후 DDW를 제거하고 stacking gel을 Table 2와 같은 조성으로 하되 분주 전 10% APS와 TEMED를 혼합한 후 plate 상단까지 분주하고 well을 기포발생이 없도록 주의하여 comb을 삽입하였다. Gel이 굳어지도록 30-35 분 정도 실온에서 정치한 후 comb을 뽑아서 well 내를 DDW로 3회 세척하고 gel caster를 떼어내었다. Gel 밖에 묻어있는 acrylamide를 완전히 제거하고 gel running tank에 장착한 후 upper tank와 lower tank에 running buffer를 채웠다.

전기영동 sample

단백량이 lane마다 20 μg이 되게 희석한 후 항원과 4× sample buffer 1:3 정도의 비율로 100°C에서 3 분간 끓인 후 전기영동하였다. 이를 원심분리하여 뚜껑에 증발된 수증기를 모으고 sample을 준비하였다. 준비된 gel의 1번 well에는 standard marker (Biorad, USA)를 5 μl, 나머지 well에는 각 sample을 6 μl씩 loading하였다.

전기영동

전기영동의 조건은 100 mA/gel로 영동장치에 전원을 50 mV로 조정하고 bromphenol blue dye가 stacking gel을 벗어날 때까지 영동하였다. 이 후, 100 mV로 승압하여 약 1 시간 동안 bromphenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다.

염색

전기영동이 끝난 gel은 DDW로 세척하고 Coomassie gel staining solution으로 약 2 시간 동안 염색하였다. 탈색은 Coomassie gel destaining solution으로 세척하고 staining solution으로 약 4 시간 동안 하였다.

결 과

바이러스 분리

RK-13 cell의 EHV-3 접종 전(A), 접종 48시간 후(B) 그리고 접종 72 시간 후(C)의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 접종 48 시간부터 세포변성효과가 나타남을 확인하였고 접종 72 시간부터는 세포박리가 일어남을 알 수 있었고(Fig. 2), 임상증상과 실험실검사서 본 질병은 말구진임을 확진하였다.

PCR 검사 및 민감도 검사

세포를 수확하여 바이러스 DNA를 추출한 후 PCR 검사를 수행하였다. 그 결과 EHV-3에만 양성되었고 EHV-1 및 EHV-4에는 음성이었다(Fig. 3). Swab에서 바이러스 DNA를 추출하여 10배씩 serial dilution을 한 후 PCR 검사를 실시한 결과

Table 2. Compositions of reagents used for SDS-PAGE

Medium	Contents	Quantity
40% Acrylamide stock	Acrylamide	38.67 g
	bis-acrylamide	1.33 g
		In 100 ml DDW
Lower gel buffer (4X LGB)	1.5 M Tris	90.855 g
	0.4% SDS	10 ml of 20% SDS
	pH 8.8 adjust with HCl	Total 500 ml
Upper gel buffer (4X UGB)	0.5 M Tris	30.77 g
	0.4% SDS	10 ml of 20% SDS
	pH 6.8 adjust with HCl	Total 500 ml
10% APS	Ammonium persulfate	100 mg/ml
4X loading dye	100% glycerol	5 ml
	4X UGB	4.4 ml
	0.5% bromophenol blue	0.4 ml
Loading buffer	4X loading dye	350 µl
	20% SDS	126 µl
	2% MESH	14 µl
		Total 490 µl
Coomassie gel staining solution	Coomassie blue	1 g
	Methanol	450 ml
	Acetic acid	100 ml
	DDW	450 ml
Coomassie gel destaining solution	Methanol	100 ml
	Acetic acid	100 ml
	DDW	800 ml

Table 3. Compositions of reagents used for SDS-PAGE gel

Medium	12.5% separating	15% separating	4% stacking
40% Acrylamide	9.35 ml	9.38 ml	500 µl
4X LGB	6.25 ml	6.25 ml	
4X UGB			1.25 ml
DDW	9.07 ml	9.04 ml	3.18 ml
10% APS	300 µl	300 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	3 µl

10⁴까지 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

염기서열

국내분리 EHV-3의 gG 특정부위에 대한 염기서열은 Fig. 5에 나타내었다. 400개의 염기에서 국내분리 EHV-3는 EHV-3 334/74 strain과 397개가 일치하여 99.25%의 상동성을 보였고 분리된 바이러스는 EHV-3 거로주(Georo strain)라 명명하였다.

단백질 분석(SDS-PAGE)

전기영동 결과에서는 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 국내 분리주 EHV-3 거로주의

단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 단백 밴드를 관찰하였다.

고 찰

Herpesvirus 무리에는 사람을 포함하여 동물에 중요한 질병을 일으키는 바이러스들이 다수 있고 말과동물[馬科動物]에서는 현재까지 총 9 종류가 확인되었다[7]. EHV-1에서 EHV-5까지는 말에 질병을 유발하고, EHV-6, 7 및 8은 asinine herpesviruses (AHV) 1, 2 및 3라고도 명명하며 당나귀의 생식기 질환이나 비염 등의 문제를 일으킨다[15].

생식기 피부에 미약한 수포형성에서부터 심각한 궤양에 이



Fig. 1. Pustules on urethral process and ulcers on a glans of penis of the stallion with equine coital exanthema.

1. Pustules on urethral process and ulcers on a glans of penis of the stallion with equine coital exanthema.
2. Cytopathic effects by equine herpesvirus type 3.
3. PCR products of EHV-3 gG gene from RK-13 cell inoculated with specimen.
4. PCR products of EHV-3 gG gene after serial dilution of template DNA purified from field specimen.
5. Comparison of the nucleotide sequences of gG gene from EHV-3 Georo strain with those of EHV-3 334/74strain.
6. SDS-PAGE of EHV-3 purified from RK-13 cell.

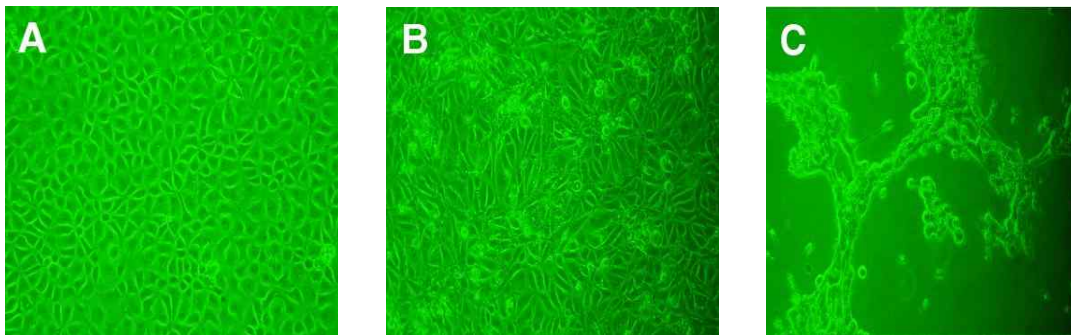


Fig. 2. Cytopathic effects by equine herpesvirus type 3. A: Normal RK-13 cell. B: Day 2 after inoculation, C: Day 3 after inoculation.



Fig. 3. PCR products of EHV-3 gG gene from RK-13 cell inoculated with specimen. lane M: DNA ladder, Lane 1: EHV-3, Lane 2: EHV-1, Lane 3: EHV-4.

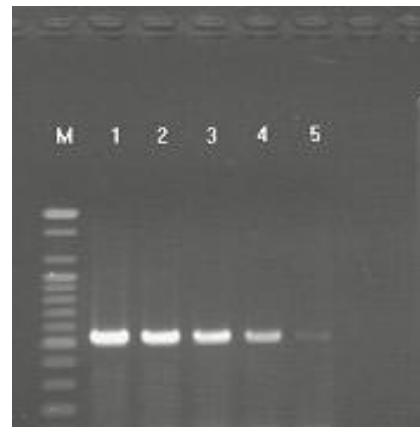


Fig. 4. PCR products of EHV-3 gG gene after serial dilution of template DNA purified from field specimen. lane 1 to 5; dilution rate of 10^1 to 10^5

르기까지 다양한 임상증상을 나타내는 급성 생식기 감염증이며 말 생산성에 직접적인 영향을 미친다[4,13].

말구진은 19세기와 20세기 초반에 유럽에서 발생하고 있었고[23] 1968년 캐나다[8]와 미국에서 처음으로 EHV-3를 분리하였다[2,5]. 그 후 전 세계에서 발생하고 있으며[17,23], 일본에서도 발생되었으나[20] 아직 국내의 보고는 없었다.

EHV-3는 150 nm의 크기와 162개의 capsomers로 구성되고, 대칭형 정20면체의 envelope 바이러스이다. 전사효소는 없으며 지질용해제나 56°C에 30분간 노출되면 신속히 불활화된다[23,24]. EHV-3는 높은 숙주 특이성을 가지고 있는데[23], Pascoe 등[16]은 primary fetal equine kidney (EK) cell, equine embryo fibroblasts, fetal bovine kidney, calf testis, chicken

Georo	1	CAATGAGGCCGATGAGGAGACACACTCCCA	30
334/74	1234	1205
Georo	31	AGATGAGAAAGCCGATACCCGCGTAGTTGG	60
334/74	1204	1175
Georo	61	TCCCCTTCTGCTGTCCGCACTCAGGACCGG	90
334/74	1174	1145
Georo	91	ACACGAGAATGCCGCCGGTGTACCACGGAG	120
334/74	1144	1115
Georo	121	ATCCGTCTCCGGCGGCAGGTGCGTCTTGCT	150
334/74	1144 T	1115
Georo	151	CGTCGCATCCCGGGGCCGGTGGCGCTGGGG	180
334/74	1084	1085
Georo	181	TTGGCTCGTTATCCCCGTTTTCTCTTCTT	210
334/74	1054	1055
Georo	211	CTTTCTCCTCGTCATCGGTGGGAGAAGCGG	240
334/74	1024	1025
Georo	241	GGGTTTTTCCGAAGGCTTTTCTTCGGGTT	270
334/74	994	965
Georo	271	CTGTTACGTCGGCCGCGGATTCCCTGTCTG	300
334/74	964	935
Georo	301	CGCCGCGGGCAGACCCTCTGGAATTTTGCC	330
334/74	934	905
Georo	331	TCAGCTGGTCGTACGTCTCGCCCGGCAGCA	360
334/74	904	G..... T	875
Georo	361	TGTACCAGCGCTGGCTCAGGATGCGAAGTC	390
334/74	874	845
Georo	391	CCAGGGCGCC	400
334/74	844	835

Fig. 5. Comparison of the nucleotide sequences of gGene from EHV-3 Georo strain with those of EHV-3 334/74strain. (Accession number AF081188).

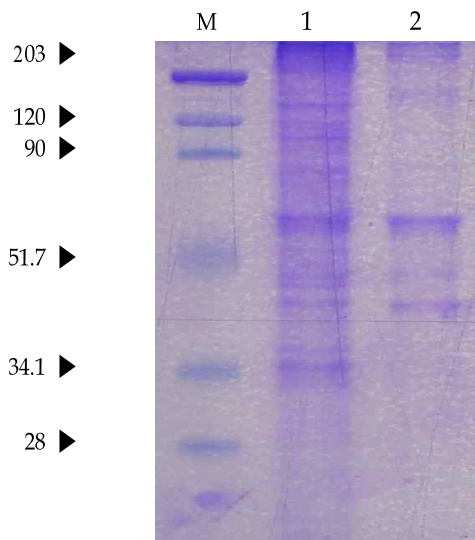


Fig. 6. SDS-PAGE of EHV-3 purified from RK-13 cell. M: Molecular marker, Lane 1: EHV-1, Lane 2: EHV-3.

cell line에 병변에서 분리한 바이러스를 접종한 결과, 세포변성효과는 오직 말 유래의 세포에서만 나타남을 보고하였고 Kamada와 Studdert [12]도 말 유래세포에서만 세포변성효과가 나타났다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 EHV-3 배양에서 RK-13 cell에서도 EHV-3 증식이 나타났고 접종 48시간 후에 세포변성효과를 확인하였기에 상기에 언급한 주장과 달랐다. 말 유래세포가 아닌 토끼 유래세포인 RK-13 cell에서도 증식된 이유는 배지조성과 배양온도 등이 오래전의 실험조건과의 차이로 이런 결과가 도래된 것으로 추정된다. 이는 논문화되지는 않았지만 일본중앙경마회 분자질병역학진단센터에서도 동일한 결과를 얻었고 배지조성이 발전하였다는 잠정결론을 내렸다. 말 유래세포는 구하기가 매우 어렵고 고가이기 때문에 이와 같은 사실로 EHV-3 연구는 보다 더 경제적이고 손쉽게 이루어질 것으로 생각된다.

RK-13 cell에서 분리한 바이러스를 PCR 검사에서 확인한 결과 EHV-3만 검출되었고 EHV-1 및 EHV-4는 검출되지 않아서 말구진은 EHV-1 및 EHV-4와 무관함을 확인하였다.

염기서열분석에서는 본 실험에서 분리한 EHV-3 거로주와 EHV-3 334/74 strain의 상동성을 확인하기 위해 DNA se-

embryo 및 rabbit kidney cell과 pig kidney cell 및 Hep 2

quencing 한 결과 99.25%의 상동성을 나타내어 점돌연변이가 있었음을 알 수 있었다. 그리고 단백질 분석을 위한 전기영동에서 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 나타내었고 국내 분리주 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD 및 40 kD에서 밴드를 관찰하였다.

Herpesvirus의 envelope에 있는 당단백질은 감염과정과 병원성 및 strain 변이의 중요한 결정기이고 체액 및 세포매개면역 반응을 이끌어낸다[21]. 당단백질은 흡착, 침입, 방출 및 세포융합과 같은 바이러스-숙주세포 상호작용에 깊은 관여를 하고 있다. 게다가 감염세포의 표면에도 위치하기 때문에 숙주면역반응의 주요한 목표이다[6].

2011년 말산업육성법의 제정으로 인하여 국내 말산업규모가 증가하고 이와 병행하는 말생산의 위험요소도 증가할 것으로 예상된다. 그러므로 말 생산성 향상 및 말구조의 예방을 위하여서는 추후 이에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 농림수산식품부의 농림기술개발사업(TDPAF-20050531)의 일환으로 수행된 연구이며 지원에 감사드립니다. 실험지도와 논문제작 등 많은 도움을 주신 제주대학교 수의과대학 황규계 교수님과 이기정 선생님께 감사드립니다.

References

- Borchers, K. and J. Slater. 1993. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods* **45**, 331-336.
- Bryans, J. T. and G. P. Allen. 1973. *In vitro* and *in vivo* studies of equine coital exanthema, pp. 322-336, In Bryans, J. T. and H. Gerber (eds.), *Equine Infectious Diseases III*. S. Karger, New York.
- Cho, G. J., B. H. Kim, D. S. Lee, M. Y. Oh, and M. H. Ko. 1995. Studies on characters and immunogenicity of equine herpesvirus isolated from Korean horses. *Korean J. Vet. Res.* **35**, 743-752.
- Colahan, P. T., A. M. Merritt, J. N. Moore, and I. G. Mayhew. 1999. *Equine medicine and surgery*. pp. 1071-1921, 5th eds., Mosby, Missouri.
- Crandell, R. A. and E. R. Davis. 1985. Isolation of equine coital exanthema virus (equine herpesvirus 3) from the nostril of a foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **187**, 503-504.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, R. M. Chanock, P. M. Howley, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus. 1995. *Fundamental virology*. pp. 1043-1107, 3rd eds., Lippincott-Raven, New York.
- Fukushi, H., A. Tanaiguchi, K. Yasuda, T. Yanai, T. Masegi, T. Yamaguchi, and K. Hirai. 2000. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. *J. Neurovirol.* **6**, 314-319.
- Girard, A., A. S. Greig, and D. Mitchell. 1968. Virus associated with vulvitis and balanitis in the horse—a preliminary report. *Can. J. Comp. Med.* **32**, 603-604.
- Hartley, C. A., H. E. Drummer, and M. J. Studdert. 1999. The nucleotide sequence of the glycoprotein G homologue of equine herpesvirus 3 (EHV3) indicates EHV3 is a distinct equid alphaherpesvirus. *Arch. Virol.* **144**, 2023-2033.
- Jacob, R. J. 1986. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema: Temperature-sensitive function(s) in cells infected with equine herpesviruses. *Vet. Microbiol.* **11**, 221-237.
- Jacob, R. J. and M. R. Steiner. 1986. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema (ECE): Identification and expression of infected cell polypeptides at the restricted temperature during equine herpesvirus 3 infection. *Vet. Microbiol.* **18**, 363-371.
- Kamada, M. and M. J. Studdert. 1983. Analysis of small and large plaque variants of equine herpesvirus type 3 by restriction endonucleases. *Arch. Virol.* **77**, 259-264.
- Kobluk, C. N., T. R. Ames, and R. J. Geor. 1995. *The horse diseases & clinical management*. pp. 557-985, 1st ed., Saunders, Philadelphia.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **15**, **227**, 680-685.
- Ostlund, E. N. 1993. The equine herpesvirus. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **9**, 283-294.
- Pascoe, R. R., P. B. Spradbrow, and T. J. Bagust. 1969. An equine genital infection resembling coital exanthema associated with a virus. *Aust. Vet. J.* **45**, 166-170.
- Reed, S. M. and W. M. Bayly. 1998. *Equine internal medicine*. pp. 545-546, 1st ed. Saunders, Philadelphia.
- Roizman, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert. 1992. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425-449.
- Samper, J. C. 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. pp. 103-161, 2nd eds., Saunders, Missouri.
- Seki, Y., T. M. Seimiya, G. Yaegashi, S. Kumagai, H. Sentsui, T. Nishimori, and R. Ishihara. 2004. Occurrence of equine coital exanthema in pastured Draft horses and isolation of equine herpesvirus 3 from progenital lesions. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 1503-1508.
- Spear, P. G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars Virol.* **4**, 167-180.
- Studdert, M. J., T. Simpson, and B. Roizman. 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* **214**, 562-564.
- Studdert, M. J. 1996. *Virus infections of equines*. pp. 39-46, 1st ed., Elsevier, Amsterdam.
- Sullivan, D. C., S. S. Atherton, J. Staczek, and D. J. O'Callaghan. 1984. Structure of the genome of equine herpesvirus type 3. *Virology* **132**, 352-367.

초록 : 국내분리 말구진 원인병원체(Equine herpesvirus type 3)의 특징

양재혁¹ · 임윤규^{2*}

(¹한국마사회, ²제주대학교 수의과대학 및 수의과학연구소)

Equine herpesvirus type 3 (EHV-3)는 말[馬]에서 말구진을 유발하고 말산업에 치명적인 악영향을 끼치는 매우 중요한 병원체이다. 국내에서 처음으로 말구진이 발생하였고, 말 생산농가에 경제적 피해를 입혔으나 다행히 원인바이러스 분리에 성공하였다. 이에 원인바이러스의 생물학적 특징을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. EHV-3를 RK-13 cell에 접종한 결과 접종 48 시간부터 세포변성효과가 나타남을 확인하였고 접종 72 시간부터는 세포박리가 일어났다. 세포를 수확하여 바이러스 DNA를 추출한 후 PCR 검사를 수행하였다. 그 결과 EHV-3에만 양성하였고 EHV-1 및 EHV-4에는 음성이었다. Swab에서 바이러스 DNA를 추출하여 10배씩 serial dilution을 한 후 PCR 검사를 실시한 결과 10⁴까지 밴드를 확인할 수 있었다. 국내분리 EHV-3의 gG 특정부위에 대한 염기서열 표준주인 EHV-3 334/74 strain과 397개가 일치하여 99.25%의 상동성을 나타내었고 국내분리주를 EHV-3 거로주(Georo strain)라 명명하였다. 전기영동 결과에서는 EHV-3가 EHV-1보다 적은 수의 밴드를 확인할 수 있었다. 국내 분리주 EHV-3 거로주의 단백질을 분석한 결과 145 kD, 60 kD, 45 kD, 40 kD에서 단백 밴드를 관찰하였다.